

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA CECILIA AMADO XAVIER DE OLIVEIRA

**Modulação da atividade das enzimas de biotransformação de xenobióticos
na malária murina letal e não-letal**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências

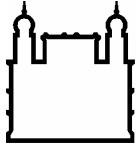
Orientador (es): Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten
Prof. Dr. Fernando de Queiros Cunha

RIO DE JANEIRO
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANA CECILIA AMADO XAVIER DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE
BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS NA MALÁRIA MURINA
LETAL E NÃO-LETAL**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten
Prof. Dr. Fernando de Queiros Cunha

Aprovada em: 30/04/2008

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Dalma Maria Banic (Presidente)
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Profa. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Rio de Janeiro, 30 de abril de 2008

Dedicatória

Aos meus filhos queridos, Gabriel e Julia, razão de tudo, pelo incentivo e compreensão com a
minha ausência.

Ao meu pai, Onaldo Xavier de Oliveira, eterno incentivador do meu trabalho.

À minha mãe, Bernadette Amado Xavier de Oliveira, que em silêncio, sei que olha por mim.

À minha irmã, Maria Adelia Amado Xavier de Oliveira, pela amizade e carinho.

Dedicatória Especial

Ao Professor Leonidas de Mello Deane, que erradicou o *Anopheles gambiae* do Brasil e a
quem tive a honra de conhecer pessoalmente, pelo trabalho de uma vida dedicado à
compreensão e ao estudo da malária.

À memória do meu avô, Francisco Xavier de Oliveira, o Dr. Chiquinho, que como médico
atuante no início do século XX, combateu a malária no sul da Bahia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Francisco José Roma Paumgartten pelo exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa científica.

Ao Prof. Fernando de Queirós Cunha pelo apoio e orientação neste trabalho.

À mestranda Anndressa Camillo da Matta, apoio de muitos fins-de-semana, pela amizade e companheirismo de muitos anos. Orientá-la desde o PROVOC foi um enorme prazer. Valeu muito a pena.

Agradecimentos especiais vão para um trio muito especial de jovens do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LTA), DCB/ENSP/FIOCRUZ, que não mediram esforços para me acompanhar nesta trajetória longa e trabalhosa: Flavio Henrique Paixão, que no último ano e meio foi o responsável pelas infecções - obrigada pelo carinho e precisão na análise das lâminas; Hellen da Silva Tavares, responsável, recentemente, pela preparação e organização dos microssomos – obrigada pela organização e assiduidade ao trabalho e Luciana Soares Gueiros, a mais jovem de todas, obrigada pelo apoio nos testes bioquímicos.

Ao Renan da Silva Costa, do LTA, responsável pelos animais, sempre pronto para o trabalho a qualquer dia e hora. Obrigada pela lealdade.

Ao Jefferson Lellis Cruz e Tamiris Vasconcellos, do LTA, pelo capricho no cuidado com a vidraria e soluções.

À Katia Soares da Poça, do LTA, pela precisão na análise dos micronúcleos.

Ao Renato Sampaio de Carvalho, recém-chegado ao laboratório, LTA, obrigada pelas análises de RT-PCR da NOS2.

À Dra. Graziela Zanini, do Laboratório de Pesquisas em Malária, IOC/FIOCRUZ, pelo auxílio no preparo das distensões sanguíneas para a contagem das taxas de parasitemia: a sua ajuda no início deste estudo foi imprescindível para que este trabalho prosseguisse.

Ao Dr. Leonardo de Carvalho, do Laboratório de Pesquisas em Malária, IOC/FIOCRUZ, pelo fornecimento do *Plasmodium berghei* (ANKA), tornando possível esta pesquisa.

À Dra. Dalma Banic, do Laboratório de Pesquisas em Malária, IOC/FIOCRUZ, pelo fornecimento do *Plasmodium chabaudi chabaudi*, possibilitando, com isto, que fosse traçado um novo caminho neste estudo.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS NA MALÁRIA MURINA LETAL E NÃO-LETAL

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira

Durante as últimas três décadas, um expressivo número de estudos experimentais e clínicos mostrou que várias infecções e inflamações assépticas modulam a expressão e a atividade de enzimas citocromo P450 (CYP). Nesta linha de investigação, alguns estudos sugeriram que as atividades de CYP e a cinética de xenobióticos são alteradas também na malária. Não é claro, entretanto, que enzimas do metabolismo de fármacos são alteradas e se as modificações ocorrem apenas no estágio terminal da malária grave. Faltam dados também sobre os mecanismos pelos quais a malária altera o metabolismo de xenobióticos. Este estudo foi conduzido como um esforço para preencher algumas dessas lacunas de pesquisa. Na primeira parte do estudo, verificamos que a malária letal (estágio eritrocítico) causada pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 e DBA-2 (fêmeas) deprimiu as atividades de CYP1A e 2B (EROD e BROD) e induziu a atividade mediada por 2A5 (COH) no fígado. Uma diminuição dos níveis de apoproteínas CYP1A também foi encontrada em camundongos infectados. As enzimas hepáticas de conjugação, quer na fração microsomal (UGT e GST), quer na citosólica (GST), não foram alteradas pela malária. Os níveis de glutathiona reduzida (GSH), todavia, foram diminuídos nos camundongos C57BL/6 infectados. Além disso, constatamos que a genotoxicidade (micronúcleos em células de medula óssea) da ciclofosfamida (ativada por CYP2B e 3A) e do DMBA (ativado por CYP1A) foi atenuada, enquanto a de um clastógeno de ação direta (EMS) foi exacerbada nos camundongos infectados com *P. berghei*. Na segunda parte, investigamos o curso temporal das alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 nos C57BL/6 e DBA-2 infectados com um parasita letal (*P. berghei*), ou com um não letal (*P. chabaudi*). Na malária não letal, a depressão de CYP1A e 2B (C57BL/6) e a indução de CYP2A5 (DBA-2) ocorreram apenas nos dias pós-infecção (5 e 6) em que foram registradas as taxas mais elevadas de parasitemia. Em conjunto, os resultados obtidos nessas duas partes do estudo indicaram que, tanto a malária letal como a não letal deprimiram as atividades de isoformas CYP1A e 2B e induziram CYP2A5 no fígado dos camundongos. Como uma hipótese foi levantada sugerindo que o NO desempenha papel decisivo na regulação negativa de CYP por estímulos inflamatórios (e.g., LPS), investigamos se a depressão de CYP1A e 2B pela malária poderia ser atribuída à uma elevação do óxido nítrico (NO). Exceto por uma concentração de NO ligeiramente aumentada por volta do dia de parasitemia máxima nos camundongos infectados com *P. chabaudi*, nenhum outro aumento dos níveis séricos de NO foi registrado durante a evolução da infecção malárica letal e não letal. Para investigar se a NO-sintase (NOS2 ou iNOS) hepática estaria induzida na malária, determinamos (RT-PCR quantitativo) os níveis do mRNA da NOS2 no fígado (e também baço e cérebro) dos DBA-2 e C57BL/6 infectados com *P. berghei*. Os resultados mostraram que a NOS2 do fígado e baço foi acentuadamente induzida pela malária nos DBA-2 e, em menor grau, também nos C57BL/6. Portanto, não foi possível descartar a hipótese de que níveis aumentados de NO seriam eventos necessários para a depressão de CYP pela malária.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS NA MALÁRIA MURINA LETAL E NÃO-LETAL

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira

During the last three decades, a number of experimental and clinical studies have shown that several infections as well as aseptic inflammatory conditions modulate the expression and activity of cytochrome P450 enzymes (CYP). Along this line, a few studies have suggested that activities of CYP and kinetics of xenobiotic compounds are altered in malaria infections as well. It is not clear, however, what drug metabolizing enzymes are altered and whether or not changes occur only at a terminal stage of severe malaria. Data are also missing on the mechanisms by which malaria modulate xenobiotic metabolism. This study was undertaken as an attempt to bridge some of these research data gaps. In the first part of the study, we found that a lethal (blood stage) malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA in C57BL/6 and DBA-2 (female) mice depressed the activities of CYP1A and 2B (EROD and BROD) while induced 2A5-mediated activity (COH) in the liver. A decreased level of CYP1A apoproteins was also found in infected mice. No malaria-caused change was noted either in microsomal (UGT and GST) or in cytosolic (GST) conjugation liver enzymes. Levels of reduced glutathione (GSH), however, were depressed by infection in C57BL/6 mice. Moreover, we found that genotoxic effects (micronuclei in bone marrow cells) of cyclophosphamide (activated by CYP2B and 3A) and DMBA (activated by CYP1A) were attenuated, while effects of a direct-acting clastogen (EMS) were enhanced in *P. berghei*-infected mice. In the second part, we investigated the time-course of changes of CYP1A-, 2B- and 2A5-mediated activities in C57BL/6 and DBA-2 mice infected with a lethal (*P. berghei*) and with a non-lethal (*P. chabaudi*) malaria parasite. In the non-lethal malaria, depression of CYP1A and 2B (C57BL/6), and induction of CYP2A5 activities (DBA-2) were noted only on the post-infection days (5-6) of highest parasitemia rate. Taken together, results from these two parts of the study indicated that both lethal and non-lethal malaria depressed the activities of CYP1A and 2B isoforms and induced the activity of CYP2A5 in the mouse liver. Since a hypothesis has been advanced suggesting that NO plays a decisive role in the down-regulation of CYP by inflammatory stimuli (*e.g.*, LPS), we also evaluated whether malaria-caused depression of CYP1A and 2B activities could be attributed to an elevation of nitric oxide (NO) levels. Except for a slightly higher NO concentration around the day of the highest parasitemia rate in *P. chabaudi*-infected mice (DBA-2 and C57BL/6), no other increase of serum levels of NO over the background range was noted during lethal and non lethal malaria infection. To verify whether hepatic NO synthase (NOS2 or iNOS) was induced by malaria, we measured (by quantitative RT-PCR) the levels of NOS2 mRNA in the liver (and also in the spleen and brain) of DBA-2 and C57BL/6 mice infected with *P. berghei*. Results showed that liver and spleen NOS2 were both markedly induced by malaria in DBA-2, and to a lesser extent, in C57BL/6 mice as well. Therefore, it can not be ruled out that increased NO levels are necessary for malaria-induced depression of CYP activities.

ÍNDICE GERAL

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Metabolismo de xenobióticos	1
1.2 Estimulação do sistema imunológico e metabolismo de xenobióticos	2
1.2.1 Modulação do metabolismo de xenobióticos nas infecções parasitárias	4
1.2.2 Modulação do metabolismo de xenobióticos nas infecções bacterianas	7
1.2.3 Modulação do metabolismo de xenobióticos nas infecções virais	10
1.2.4 Modulação do metabolismo de xenobióticos em modelo experimental de artrite e de doença inflamatória do intestino	11
1.2.5 Modulação do metabolismo de xenobióticos por endotoxinas, vacinas e citocinas pró-inflamatórias	13
1.2.6 Hipóteses sobre os mecanismos pelos quais estímulos inflamatórios modulam a expressão e a atividade de isoformas CYP	21
1.3 Malária	27
1.3.1 Malária humana	27
1.3.2 Modelos experimentais de malária	32
1.3.3 Alterações do metabolismo de xenobióticos na malária	34
1.4 Evidências da regulação da transcrição gênica de CYP por estímulos inflamatórios	42
1.4.1 Mecanismos envolvidos na regulação da transcrição dos genes <i>CYP</i>	42
1.4.2 Regulação da transcrição de CYP por estímulos inflamatórios	44
2 OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo geral	50
2.2 Objetivos específicos (metas)	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Animais	51
3.1.1 Hospedeiros	51
3.1.2 Parasitas	51
3.2 Procedimentos	51
3.2.1 Infecção dos hospedeiros	51
3.2.2 Tratamentos com LPS e aminoguanidina	52
3.2.3 Eutanásia, coleta de sangue e remoção de órgãos	53
3.2.4 Preparação das frações subcelulares	53
3.2.5 Quantificação de proteínas das frações subcelulares	54
3.2.6 Atividades enzimáticas	55
3.2.7 Determinações realizadas no soro sanguíneo	62

3.2.8 Determinação da proteína CYP1A1 por <i>immunoblotting</i>	63
3.2.9 Determinação do mRNA da NOS2 por RT-PCR	65
3.2.10 Ensaio do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos	67
4 RESULTADOS	68
4.1 Alterações da biotransformação em C57BL/6 e DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	68
4.1.1- Quadro clínico dos camundongos infectados com <i>P. berghei</i> (ANKA)	68
4.1.2 – Atividades catalíticas e expressão da proteína CYP1A1 nos camundongos infectados com <i>P. berghei</i> (ANKA)	71
4.1.3 – Atividades de enzimas de conjugação em camundongos infectados com <i>P. berghei</i> (ANKA)	75
4.1.4 – Níveis hepáticos da glutathione reduzida em camundongos infectados com <i>P. berghei</i>	77
4.2 - Modulação da genotoxicidade de xenobióticos pela infecção com <i>P. berghei</i> (ANKA)	77
4.2.1 Alteração da genotoxicidade da ciclofosfamida na infecção com <i>P. berghei</i> (ANKA)	79
4.2.2 Alteração da genotoxicidade do DMBA na infecção com <i>P. berghei</i> (ANKA)	82
4.2.3 Alteração da genotoxicidade do EMS na infecção com <i>P. berghei</i> (ANKA)	82
4.3 – Modulação da atividade de enzimas citocromo P450 hepáticas durante a evolução temporal da malária letal e não-letal em camundongos	85
4.3.1 – Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção letal em camundongos DBA-2	85
4.3.2 – Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção letal em camundongos C57BL/6	87
4.3.3 – Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção não letal em camundongos C57BL/6	89
4.3.4 - Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção não letal em camundongos DBA-2	92
4.4. – Elevação dos níveis de óxido nítrico e alterações da atividade de citocromos P450 no fígado de camundongos (DBA-2) tratados com LPS de <i>Escherichia coli</i>	98
4.4.1 – Curso temporal da elevação dos níveis de óxido nítrico no soro e das alterações de CYP no fígado, após o tratamento com LPS	98
4.4.2 – Indução da NOS2 (mRNA) em fígado, baço e cérebro de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i> (ANKA) e tratados com LPS	106

4.4.3 – Efeitos do bloqueio da NOS2 sobre as alterações de atividade de CYP induzidas pelo LPS	111
5 DISCUSSÃO	114
6 CONCLUSÃO	130
7 PERSPECTIVAS	133
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
ANEXO 1 Citocromos P450	161
ANEXO 2 Tabelas	163
ANEXO 3 Trabalhos Publicados	185
ANEXO 4 Certificado CEUA	198

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Ciclos exo-eritrocítico e eritrocítico da malária	30
Figura 1.2 - Ciclo sexuado do <i>Plasmodium</i> no mosquito <i>Anopheles</i>	31
Figura 1.3 – Mecanismo de regulação negativa de <i>CYP3A4</i>	46
Figura 1.4 – Interação cruzada entre o receptor PXR e o NF- κ B	47
Figura 4.1 – Alterações dos pesos dos baços das fêmeas DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>Plasmodium berghei</i>	70
Figura 4.2 – Alterações dos pesos dos fígados das fêmeas DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>Plasmodium berghei</i>	70
Figura 4.3 - Alterações dos níveis séricos das transaminases AST e ALT na linhagem DBA-2 infectada com <i>P. berghei</i>	71
Figura 4.4 - Atividade de EROD nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	73
Figura 4.5 – <i>Immunoblotting</i> de CYP1A em DBA-2 infectado com <i>P. berghei</i>	73
Figura 4.6 - Atividade de BROD nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	74
Figura 4.7 - Atividade de COH nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	74
Figura 4.8 - Atividade de PNPB nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	74
Figura 4.9 - Atividade de UGT nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	76
Figura 4.10 - Atividade da GST microsomal nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	76
Figura 4.11 – Atividade de GST citosólica em camundongos DBA-2 e C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	76
Figura 4.12 - Concentração da glutathiona reduzida (GSH) no sobrenadante hepático nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	77
Figura 4.13 – (A) Efeito da ciclofosfamida sobre a frequência de MN-PCE e razão PCE/NCE na medula óssea de C57BL/6	81
(B) Efeitos da ciclofosfamida (25 mg/kg ip) sobre a frequência de MN-PCE e razão PCE/NCE na medula óssea de C57BL/6 infectado com <i>P. berghei</i>	81

Figura 4.14 – Efeitos do dimetilbenzo[a]antraceno sobre a frequência de MN-PCE e razão PCE/NCE na medula óssea de fêmeas C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	83
Figura 4.15 – Efeitos do etilmetanosulfonato sobre a frequência de MN-PCE e razão PCE/NCE na medula óssea de fêmeas C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	84
Figura 4.16 – Atividades de EROD e BROD na linhagem C57BL/6 infectada com 10 ⁶ hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i>	84
Figura 4.17 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	86
Figura 4.18 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	91
Figura 4.19 – Evolução da parasitemia em fêmeas C57BL/6 e DBA-2 após infecção com <i>P. chabaudi</i>	95
Figura 4.20 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	96
Figura 4.21 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYPs em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	97
Figura 4.22 – Alterações da concentração sérica de nitrito e das atividades de COH, EROD e BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (6 h)	100
Figura 4.23 – Alterações da concentração sérica de nitrito e das atividades de COH, EROD e BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (12 h)	101
Figura 4.24 – Alterações da concentração sérica de nitrito e das atividades de COH, EROD e BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	102
Figura 4.25 – Alterações da concentração sérica de nitrito e das atividades de COH, EROD e BROD em DBA-2 tratado com doses baixas de LPS de <i>E. coli</i>	105
Figura 4.26 – Indução do mRNA da NOS2 nos fígados, baços e cérebros de fêmeas DBA-2 infectadas com <i>P. berghei</i>	108
Figura 4.27 – Indução do mRNA da NOS2 nos fígados baços e cérebros de fêmeas C57BL/6 infectadas com <i>P. berghei</i>	109
Figura 4.28 – Indução do mRNA da NOS2 nos fígados, baços e cérebros de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS 5 mg/kg, 12 horas após o tratamento	110
Figura 4.29 - Alterações da concentração sérica de nitrito e das atividades de COH, EROD e BROD após bloqueio farmacológico com a aminoguanidina	113

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.1 – Estudo sobre a modulação das enzimas hepáticas de metabolismo na malária em roedores

41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1 – Evolução temporal das taxas de parasitemia de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	164
Tabela 4.2 – Pesos do fígado e baço (média±EPM) de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	164
Tabela 4.3 – Evolução temporal das concentrações de nitrito no soro de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	164
Tabela 4.4 – Evolução temporal da atividade de EROD em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	165
Tabela 4.5 – Evolução temporal da atividade de BROD em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	165
Tabela 4.6 – Evolução temporal da atividade de COH em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. berghei</i>	166
Tabela 4.7 – Evolução temporal das taxas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	166
Tabela 4.8 – Pesos do fígado e baço de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	166
Tabela 4.9 – Evolução temporal das concentrações de nitrito no soro de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	167
Tabela 4.10 – Evolução temporal da atividade de EROD em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	167
Tabela 4.11 – Evolução temporal da atividade de BROD em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	168
Tabela 4.12 – Evolução temporal da atividade de COH em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i>	168
Tabela 4.13 – Evolução temporal das taxas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	169
Tabela 4.14 – Evolução temporal das taxas de parasitemia de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	170
Tabela 4.15 – Pesos do fígado e baço de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	170
Tabela 4.16 – Evolução temporal das concentrações de nitrito no soro de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	170
Tabela 4.17 – Evolução temporal da atividade de EROD em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	171

Tabela 4.18 – Evolução temporal da atividade de BROD em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	171
Tabela 4.19 – Evolução temporal da atividade de COH em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. chabaudi</i>	172
Tabela 4.20 – Evolução temporal das taxas de parasitemia de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	173
Tabela 4.21 – Evolução temporal das taxas de parasitemia de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	174
Tabela 4.22 – Pesos do fígado e baço de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	174
Tabela 4.23 – Evolução temporal das concentrações de nitrito no soro de camundongos DBA-2	174
Tabela 4.24 – Evolução temporal da atividade de EROD em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	175
Tabela 4.25 – Evolução temporal da atividade de BROD em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	176
Tabela 4.26 – Evolução temporal da atividade de COH em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 infectados com <i>P. chabaudi</i>	176
Tabela 4.27 - Concentração de nitrito em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (6 h)	176
Tabela 4.28 – Atividade de EROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (6 h)	177
Tabela 4.29 - Atividade de BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (6 h)	177
Tabela 4.30 - Atividade de COH em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (6 h)	177
Tabela 4.31 - Concentração de nitrito em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (12 h)	178
Tabela 4.32 - Atividade de EROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (12 h)	178
Tabela 4.33 - Atividade de BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (12 h)	178
Tabela 4.34 - Atividade de COH em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (12 h)	179
Tabela 4.35 - Concentração de nitrito em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	179
Tabela 4.36 - Atividade de EROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	179
Tabela 4.37 - Atividade de BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	180
Tabela 4.38 - Atividade de COH em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	180
Tabela 4.39 - Concentração de nitrito em DBA-2 tratado com doses baixas de LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	181
Tabela 4.40 - Atividade de EROD em DBA-2 tratado com doses baixas de LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	181

Tabela 4.41 - Atividade de BROD em DBA-2 tratado com doses baixas de LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	182
Tabela 4.42 - Atividade de COH em DBA-2 tratado com doses baixas de LPS de <i>E. coli</i> (24 h)	182
Tabela 4.43 - Concentração de nitrito em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> e aminoguanidina	183
Tabela 4.44 – Atividade de EROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> e aminoguanidina	183
Tabela 4.45 - Atividade de BROD em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> e aminoguanidina	184
Tabela 4.46 - Atividade de COH em DBA-2 tratado com LPS de <i>E. coli</i> e aminoguanidina	184

Lista de Siglas e Abreviaturas

- AG – aminoguanidina
- AH – anilina hidroxilase
- AHH – *aryl hydrocarbon hydroxylase*
- AhR – receptor Ah
- ALT – alanina aminotransferase
- AMPD – aminopirona desmetilase
- AP-1 – *activator protein 1*
- ARE - *antioxidant responsive element*
- Arnt – *AhR nuclear translocator*
- AST – aspartato aminotransferase
- AUC – área sob a curva
- AZT – 3'-azido-3'-desoxitimidina
- B[a]P - benzo[a]pireno
- BCG – Bacillus Calmette Guérin
- BPH – benzo[a]pireno hidroxilase
- BR - bilirrubina
- BROD – benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase
- BSO – butionina sulfoximina
- CAR – *constitutive androstane receptor*
- C/EBP – *CCAAT enhancer binding protein*
- CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cit b5 – citocromo b5
- CITCO - 6-(4-clorofenil)imidazol[2,1-b][1,3]tiazol-5-carbaldeído-*O*-(3,4-diclorobenzil)oxima
- cGMP – guanosina monofosfato cíclica
- CLP – *cecal ligation and puncture*
- C_{max} – concentração máxima
- COH – cumarina 7-hidroxilase
- CON - controle
- COX2 – ciclooxigenase 2
- CCRP - *cytoplasmic CAR retention protein*
- CPA - ciclofosfamida
- CYP – citocromo P450

DEPC – dietil-pirocarbonato
DII – doença inflamatória do intestino
DMBA – dimetilbenzo[a]antraceno
DMSO - dimetilsulfóxido
DNA- ácido desoxiribonucleico
DO – densitometria óptica
DPT – difteria, pertussis e tétano
DQHS - dihidropqinghaosu
DSS – dextran sulfato de sódio
DTT – ditioneitol
DTT_{ox}- *trans*-4,5-dihidroxi-1,2-ditiano
ECOD – etoxicumarina-*O*-desetilase
EMS – etilmetanosulfonato
EP – erro padrão
EPM – erro padrão da média
ERBMT – *erythromycin breath test*
Erit-d – eritromicina desmetilase
EROD –etoxiresorufina-*O*-desetilase
EROS – espécies reativas de oxigênio
FCS – soro fetal bovino
FoxA2 - *forkhead transcription factor A2*
FoxO1 - *forkhead transcription factor O1*
GLC – glutamil cisteína ligase
GSH – glutationa reduzida
GSH-Px – glutationa peroxidase
GSSG – glutationa oxidada, dissulfeto de glutationa
GSNO - S-nitrosoglutationa
GST - glutationa S transferase
Hb - hemoglobina
HbsAg - antígeno s do vírus da hepatite B
HBV – vírus da hepatite B
HCV – vírus da hepatite C
Hepa 1c1c7 – células de hepatoma murino
HepG2 – linhagem de células de hepatocarcinoma humano
HNF - *Hepatocyte Nuclear Factor*

HO-1 – heme oxigenase 1
HP – hemáceas parasitadas
Hsp90 - *heat shock protein 90*
HTLV – vírus T-linfotrópico humano
ICAM1 – gene da molécula de adesão intercelular 1
ICG – verde de indocianina
i.c.v. – intra-cérebro ventricular
IFN- γ – interferon γ
IL - interleucina
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
i.p. – intra-peritoneal
Km – constante de Michaelis
KO – *knockout*
LAP – C/EBP β de comprimento normal
LIP - C/EBP β deficiente na atividade de transativação
L-NAME - N⁰-nitro-L-arginina metil éster
LNMA - N⁰-metil-L-arginina
LPS – lipopolissacarídeo
LTB4 – leucotrieno B4
MAL - malária
MDR – *multidrug-resistance*
MN-PCE – eritrócito policromático micronucleado
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
MROD – metoxiresorufina-O-desmetilase
MRP – *multidrug-resistance protein*
NAC – N-acetilcisteína
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCE – eritrócito normocromático
NEED – N-1-naftilenodiamino
NF- κ B – fator nuclear kappa-B
NMDA-d – N-nitrosodimetilamina-desmetilase
NMMA - N⁰-monometil-L-arginina
nmol - nanomoles
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase

NOS2 – óxido nítrico sintase 2
Nrf2 - *NF-E2-related factor 2*
NR1I – subfamília de receptores nucleares de hormônios
OECD - *Organisation for Economic Co-operation and Development*
p160 - *steroid receptor coactivator p160*
p300/CBP - *p300/CREB binding protein*
PAH – hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PBREM - *phenobarbital responsive enhancer module*
PCE – eritrócito policromático
PCN – pregnenolona-16 α -carbonitrila
PGC-1 - *peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta*
pmol -picomoles
P-gp – glicoproteína P
PNPH – *p*-nitrofenol hidroxilase
PPAR α - *peroxisome proliferator-activated receptor α*
PROD – pentoxiresorufina-*O*-despentilase
PXR - *pregnane X receptor*
RE – retículo endoplasmático
RFA – resposta de fase aguda
RIF - rifampicina
RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
RXR – *retinoid X receptor*
SDS – dodecil sulfato de sódio
SFM – sistema fagocítico mononuclear
SNAP - S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SPF - *specific pathogen free*
SRC-1 – *steroid receptor coactivator-1*
SIN-1 – 3-morfolinossidnonimina N-etilcarbamida
SOD – superóxido desmutase
SRI κ B – super repressor I κ B do NF- κ B
 $t_{1/2}$ – meia vida de eliminação
TBS – Solução Tampão Tris
TCDD – 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina
TCPOBOP - 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benzeno
Test6 β H – testosterona 6 β hidroxilase

TGF – fator de crescimento tumoral

TGI – trato gastrointestinal

TNBS – ácido sulfônico trinitrobenzênico

TNF – fator de necrose tumoral

UDPGA - ácido uridina difosfoglicurônico

UI – unidade internacional

UGT – uridina difosfo-glicuroniltransferase

XRE – *xenobiotic responsive element*

1- INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo de xenobióticos

Há 50 anos Bernard Brodie, James Gillette e Bert La Du (1958), em memorável artigo de revisão, salientaram que a maioria dos fármacos, e dos outros compostos estranhos ao organismo, não era excretada pela urina, senão em quantidades muito pequenas, antes de sofrerem uma modificação da sua estrutura química. Naquela ocasião, os autores destacaram que, se não existissem no organismo enzimas que catalisam essas transformações, a eliminação dos medicamentos seria muito lenta e os seus efeitos excessivamente prolongados, o que tornaria a terapia farmacológica perigosa ou mesmo inviável. No mesmo artigo, Brodie e colaboradores (1958) introduziram o termo compostos estranhos (*foreign compounds*) para designar “*os compostos orgânicos encontrados em plantas ou sintetizados (pelo homem) que normalmente não estão presentes no corpo*”. A palavra xenobiótico, significando literalmente estranho à vida, foi introduzida um pouco mais tarde por Mason *et al.* (1965), e é hoje amplamente empregada para designar composto (químico) estranho (ao organismo), tal como originalmente definido por Brodie *et al.* (1958).

O processo pelo qual os compostos lipofílicos são convertidos, por reações enzimáticas seqüenciais, em moléculas mais hidrofílicas, é conhecido como metabolismo ou biotransformação de xenobióticos, embora hormônios e outras substâncias endógenas também sejam substratos para essas enzimas. O metabolismo de xenobióticos compreende dois tipos de reações enzimáticas que são conhecidas como reações de fase 1 e 2. As reações da fase 1 incluem hidrólises, reduções ou oxidações, que adicionam ou expõem um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH) pré-existente na molécula. As reações da fase 2, por outro lado, envolvem a conjugação dos metabólitos produzidos na fase 1, ou do próprio xenobiótico ainda não transformado, com uma molécula endógena (*i.e.*, reações de metilação, acetilação, sulfatação, glicuronidação, com a glutatona (*i.e.*, síntese de ácido mercaptúrico) ou com aminoácidos (*e.g.*, glicina, taurina, ácido glutâmico)). Embora as reações da fase 1, expondo ou adicionando grupos funcionais que possibilitam a conjugação, tipicamente antecedam as da fase 2, há exceções a esta regra, e reações da fase 1 podem, eventualmente, ocorrer após a conjugação a moléculas endógenas (*e.g.*, hidroxilação de esteróides sulfatos). Neste processo sequencial de transformações da estrutura química do xenobiótico que conduz a um aumento da hidrofiliidade, o maior incremento da solubilidade aquosa se dá, via de regra, na fase 2. Os produtos das reações de conjugação (conjugados) são, geralmente, encontrados nos meios aquosos de excreção, (*i.e.*, nas fezes, via bile e na urina).

Facilitando a eliminação de moléculas lipofílicas e, portanto, a desintoxicação, pode-se dizer que o metabolismo ou a biotransformação dos xenobióticos constitui, conjuntamente

com os processos de transporte transmembrana (MDR, *Multi Drug Resistance*, resistência a múltiplas drogas mediada por glicoproteína P), a base do sistema de defesa do organismo contra a ameaça representada pelos agentes químicos presentes no ambiente. Esta percepção fez com que Daniel W. Nebert salientasse, em instigante artigo publicado em 1979, as semelhanças funcionais entre o metabolismo de xenobióticos e o sistema imunológico, ou sistema de defesa do hospedeiro contra infecções. Segundo Nebert (1979), os dois sistemas compreendem um conjunto de mecanismos regulados por genes que são capazes de responder de forma rápida a modificações ambientais adversas. Em ambos os casos, os sistemas respondem a um número aparentemente infindável de especificidades químicas e estas respostas podem ser moduladas pela exposição prévia ao estímulo, o que é exemplificado pela indução enzimática, no caso do metabolismo, e pela imunização e sensibilização, no caso do sistema imunológico.

Evidências acumuladas nos últimos 30 anos sugerem que além desta analogia, há também uma integração funcional entre os dois sistemas de defesa do organismo contra adversidades ambientais. Neste sentido, foi observado que a estimulação do sistema imunológico (sistema de defesa do hospedeiro contra infecções) modula a atividade de enzimas do metabolismo de xenobióticos e também, possivelmente, a expressão de proteínas transportadoras transmembrana (sistema de defesa do organismo contra a ameaça química). Situado no contexto anteriormente delineado, este trabalho é parte de um esforço de pesquisa voltado para a compreensão de como se dá a relação funcional entre os dois sistemas, e das suas consequências para a cinética, o efeito terapêutico e a toxicidade de fármacos e outros xenobióticos.

1.2 Estimulação do sistema imunológico e metabolismo de xenobióticos

Em uma breve nota publicada há mais de 50 anos, Samaras e Dietz (1953) relataram que a injeção do azul de tripan, corante que interfere com o sistema fagocítico mononuclear (SFM) hepático, prolongava, após uma única dose, ou encurtava, após múltiplas doses, o tempo de sono barbitúrico em ratos. Posteriormente, Wooles e Borzelleca (1966) verificaram que o zimosan, outro estimulante do SFM, também prolongava o tempo de sono induzido por barbitúricos em camundongos, o que é consistente com o que havia sido descrito para o azul de tripan em ratos. Como a duração do sono induzido depende da depuração hepática do barbitúrico, estes achados são, possivelmente, as primeiras evidências experimentais de que a estimulação/bloqueio do sistema imunológico pode alterar o metabolismo e a eliminação de fármacos e de outros xenobióticos.

A observação de Samaras e Dietz (1953), entretanto, foi inicialmente interpretada como um fenômeno isolado. A hipótese de que a estimulação do sistema imunológico modula o metabolismo de xenobióticos só veio à tona décadas mais tarde, quando as enzimas citocromo P450 (CYP) já haviam sido caracterizadas por Omura e Sato (1964) e a atividade catalítica dessas monooxigenases era alvo de grande interesse (Anexo 1).

O marco inicial dos estudos que começaram a desvendar as relações entre o metabolismo de xenobióticos e o sistema de defesa contra infecções pode ser atribuído à observação de que a administração de tilorona, um agente indutor de interferon gama (INF- γ), deprimia a atividade de monooxigenases hepáticas de ratos (Leeson *et al.*, 1976, Renton e Mannering, 1976_a). A tilorona, entretanto, não inibiu a atividade das monooxigenases quando os microsossomos foram expostos *in vitro*, o que indica que o fármaco não inibe diretamente a enzima (Renton e Mannering, 1976_a). Em seguida, Renton e Mannering (1976_b) demonstraram que um conjunto de tratamentos diferentes (endotoxina de *Escherichia coli*, vírus Mengo, vacina pertussis, e outros agentes), que tinha em comum a propriedade de induzir o INF- γ , deprimia também os níveis totais de citocromos P450 e a atividade de várias monooxigenases no fígado de ratos. Diante desses resultados, Renton e Mannering (1976_b) sugeriram que doses terapêuticas de medicamentos de uso continuado, antes bem toleradas pelo paciente, poderiam tornar-se tóxicas durante infecções virais ou bacterianas, em virtude da maior lentidão de metabolização e eliminação. Estudos posteriores em humanos demonstraram que os autores estavam certos quanto a esta possibilidade. Chang *et al.* (1978) estudaram a cinética da teofilina em seis crianças asmáticas durante, e um mês após, um episódio agudo de infecção viral do trato respiratório superior (confirmado sorologicamente), e verificaram que a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) do fármaco era bem mais longa durante a doença (419,8 min) do que após a recuperação (249,9 min). As implicações clínicas desta alteração farmacocinética tornaram-se evidentes por ocasião de um surto de gripe (influenza) que ocorreu no estado de Washington (EUA) em 1980 (Kraemer *et al.*, 1982). Durante a infecção viral, onze crianças asmáticas que recebiam regularmente uma dose estável e bem tolerada de teofilina, exibiram uma redução da depuração do fármaco e passaram a apresentar sintomas tais como convulsões, náuseas, vômitos e cefaléia (Kraemer *et al.*, 1982). Esses sintomas eventualmente aparecem em estados gripais e febris, mas podem também ser manifestações de toxicidade da teofilina, fármaco de margem terapêutica estreita cuja eliminação, como os autores verificaram, torna-se muito mais lenta em consequência da infecção viral (Kraemer *et al.*, 1982).

Aproximadamente na mesma época em que Renton e Mannering (1976_{a,b}) constataram que os indutores de IFN- γ modulavam o metabolismo de xenobióticos, Ghazal *et al.* (1974) e,

posteriormente, Cha e Edwards (1976) verificaram que em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* ocorria uma acentuada depressão dos níveis totais de CYP e da atividade de monooxigenases hepáticas. Estudo subsequente mostrou que o sono induzido pelo pentobarbital era muito mais prolongado nos camundongos infectados com *S. mansoni* do que nos respectivos controles não infectados (Coelho *et al.*, 1977). Essas alterações não ocorreram nos casos em que os hospedeiros foram infectados com cercárias de um único sexo (*i.e.*, que não originam casais de vermes adultos produtores de ovos) e nas infecções de camundongos atímicos (*nude mice*) que apresentavam ovos no fígado, mas não desenvolviam reações inflamatórias ao redor deles (Cha *et al.*, 1980_a; Cha *et al.*, 1980_b). Os resultados dos dois estudos sugeriram que a depressão do metabolismo de fármacos observada na esquistossomose mansônica murina estava associada à formação de reações inflamatórias (granulomas) ao redor dos ovos do verme retidos no fígado.

Ao longo dos últimos 30 anos, uma série de outros estudos mostrou que a expressão e a atividade de isoformas citocromo P450 no fígado e em tecidos extra-hepáticos de animais de laboratório podem ser moduladas por diferentes tipos de infecções virais, bacterianas e parasitárias.

1.2.1 Modulação do metabolismo de xenobióticos nas infecções parasitárias

1.2.1.1 Helmintoses

As observações de Ghazal *et al.* (1974) e Cha e Edwards (1976), em modelos murinos de esquistossomose mansônica, foram confirmadas por estudos posteriores que também encontraram acentuada depressão dos níveis totais de citocromos P450 e da atividade de monooxigenases no fígado de camundongos infectados há 30 ou mais dias, e que apresentavam granulomas ao redor dos ovos do *S. mansoni* (Sheweita *et al.*, 2002; El-Lakkany *et al.*, 2004; Conte *et al.*, 2007). Os estudos sobre as alterações que ocorrem nas quatro semanas iniciais (fase aguda) da infecção, etapa em que os vermes ainda não atingiram a maturidade sexual e não começaram a oviposição, forneceram resultados até certo ponto conflitantes. Dois estudos egípcios relataram que as atividades da aminopirona desmetilase, da anilina hidroxilase e da N-dimetilnitrosamina desmetilase (NDMA-d) aumentavam em camundongos infectados com *S. mansoni*, alcançando o valor máximo por volta do dia 30 pós-infecção e declinando acentuadamente após esse dia (El-Bassiouni *et al.*, 1984; Mostafa *et al.*, 1984). Outro trabalho do mesmo grupo de pesquisadores encontrou aumento da atividade de monooxigenases hepáticas 15 (pentoxiresofurina-*O*-despentilase, PROD) e 30 (NDMA-d) dias após a infecção de camundongos com *S. mansoni* (Sheweita *et al.*, 2002). Awney *et al.* (2001) relataram ainda um aumento da atividade da AHH (*aryl hydrocarbon*

hydroxylase, ou benzo[a]pireno hidroxilase) no fígado de camundongos trinta e três dias após a infecção. Segundo os autores, a fração microsomal hepática obtida dos camundongos infectados (dia 33 pós-infecção), quando empregada no teste de Ames, converteu o benzo[a]pireno (B[a]P) em metabólitos mutagênicos mais eficientemente do que a fração microsomal de animais controles não infectados (Awney *et al.*, 2001). Sheweita *et al.* (2002) também descreveram que microsomos hepáticos de camundongos infectados com *S. mansoni* tratados com B[a]P formam mais adutos de DNA (ácido desoxiribonucleico) do que microsomos de controles não-infectados. Em conjunto, os estudos desse grupo de pesquisadores sugerem que, na fase inicial da esquistossomose mansônica murina, até os dias 30-33 pós-infecção, quando praticamente não há ovos retidos no fígado, há exacerbação da atividade de algumas monooxigenases e aumento da ativação metabólica de pró-mutágenos. Contrastando com esses resultados, que sugerem um efeito bifásico da infecção mansônica (exacerbação das monooxigenases na fase aguda e depressão na fase crônica da infecção), estudo recente de Manhães-Rocha *et al.* (2005) não encontrou alterações expressivas e consistentes dos níveis totais de citocromos P450 e da atividade catalítica de CYP1A, 2A5, 2B e 2E1 no fígado de camundongos *Swiss Webster* e *DBA-2*, quinze e trinta dias após a infecção.

Dois estudos mostraram que alterações da atividade de monooxigenases também ocorrem nas infecções experimentais ou clínicas com outros trematódeos do gênero *Schistosoma*. Wang *et al.* (1993) observaram que as atividades da anilina hidroxilase e da aminopirona-N-desmetilase, assim como os níveis totais de citocromo P450 estavam deprimidos, enquanto o tempo de sono barbitúrico estava prolongado, em camundongos infectados com *Schistosoma japonicum*, seis semanas após a infecção. Sheweita *et al.* (2001), por outro lado, determinaram a expressão e a atividade de CYP2E1, assim como a atividade de outras monooxigenases, em amostras de biópsia de bexiga urinária de 15 pacientes infectados com *Schistosoma haematobium*. Os autores verificaram que a expressão e a atividade de monooxigenases era maior nos fragmentos de tecido contendo ovos de *S. haematobium* do que nos fragmentos de tecido que não tinham ovos do parasita, e que, portanto, estavam livres das reações inflamatórias que se formam ao redor deles.

Alterações da atividade de monooxigenases hepáticas também foram notadas em outras infecções helmínticas, particularmente naquelas causadas pelos trematódeos *Fasciola hepatica* e *Opisthorchis viverrini*. Formas jovens desses dois vermes, em determinada fase da infecção, migram através do parênquima hepático produzindo extensa lesão e reação inflamatória ao longo do caminho percorrido no tecido do hospedeiro. Estudos experimentais, em roedores e ovelhas, têm constatado que a fasciolíase causa uma regulação negativa da

atividade de várias isoformas citocromo P450 (Galtier *et al.*, 1987; Biro-Sauver *et al.*, 1994; Lopez *et al.*, 1994; Sommerville *et al.*, 1995; Topfer *et al.*, 1995), mas contrastando com essa depressão quase generalizada, tem sido observada a indução da CYP2A5, isoforma murina ortóloga da CYP2A6 humana (Montero *et al.*, 1999).

A indução de CYP2A5 tem sido evidenciada também em hamsters infectados com o *O. viverrini* (Kirby *et al.*, 1994). Digno de nota é o fato da infecção humana com *O. viverrini* estar associada à ocorrência de câncer hepático na Tailândia e outros países do sudeste da Ásia, já que CYP2A5 (murina) e 2A6 (humana) catalisam a ativação de diversos carcinógenos químicos (Satarug *et al.*, 1996).

Tekwani *et al.* (1990) descreveram que a infecção de hamsters com o helminto *Ancylostoma ceylanicum* produz um acentuado declínio dos níveis totais de CYP e das atividades da aminopirona-desmetilase e da benzo[*a*]pireno hidroxilase em microsossomos hepáticos. O prolongamento do tempo de sono barbitúrico e da paralisia causada pela zoxazolamina nos hamsters infectados são evidências adicionais de que a infecção helmíntica deprimiu o metabolismo de xenobióticos (Tekwani *et al.*, 1990).

Montero *et al.* (2003) relataram que os níveis totais de CYP e as atividades de CYP 1A1 e 2B1 aumentaram, enquanto a atividade catalítica da CYP2E1 permaneceu inalterada, no fígado de ratos infectados com metacestódeos da *Taenia taeniformis*.

1.2.1.2 Protozooses

Alterações das enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos foram evidenciadas também em infecções com parasitas unicelulares ou protozoários.

A depressão da atividade da anilina-hidroxilase (CYP2E1), da aminopirona-N-desmetilase (CYP2B e 2C11) e dos níveis da glutatona foi observada no fígado de ratos infectados com *Trypanosoma brucei brucei* (Emerole *et al.*, 1983).

Reduções da atividade de monooxigenases hepáticas e dos níveis totais de citocromos P450 também foram notadas em roedores infectados experimentalmente com *Leishmania donovani*. Singh *et al.* (1989), por exemplo, demonstraram que as concentrações totais de CYP, de heme e a atividade de monooxigenases estavam deprimidas no fígado de hamsters infectados com *L. donovani*. Neste sentido, Coombs *et al.* (1990) mostraram que as atividades da aminopirona-desmetilase, da anilina hidroxilase, da benzfetamina desmetilase e da etoxicumarina desetilase estavam diminuídas, enquanto as atividades da epóxido hidrolase e da NADH-citocromo b5 redutase permaneciam inalteradas na fração microsossomal hepática de camundongos infectados com *L. donovani*. Os autores verificaram ainda que a epóxido hidrolase citosólica estava induzida nos camundongos infectados com a *L. donovani* (Coombs

et al., 1990). Em contraste com os efeitos observados com *L. donovani*, que causa a forma visceral (calazar) da doença, a infecção de camundongos BALB/c com a *Leishmania major*, agente etiológico da forma tegumentar da leishmaniose no Velho Mundo, não produziu alterações dos níveis de proteínas microsossomais hepáticas e dos níveis totais de CYP, apesar da intensa proliferação dos parasitas nas células de Kupffer e da forte redução da fagocitose (Al-Mofleh *et al.*, 1989).

A depressão da atividade de monooxigenases hepáticas (desmetilação da eritromicina, azitromicina, claritromicina e clindamicina) foi evidenciada ainda em camundongos infectados com cistos de *Toxoplasma gondii* (vinte ou quarenta cistos por animal) (Berg-Candolfi e Candolfi, 1996). Neste modelo murino de toxoplasmose, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a infecção reduzia as velocidades de desmetilação da eritromicina e da ciclosporina e os níveis totais de CYP e de CYP3A, no fígado e no jejuno. Além disso, Berg-Candolfi *et al.* (1996) notaram que o tratamento dos camundongos infectados com um anticorpo contra o INF- γ antagonizava o declínio dos níveis totais de CYP, e que a administração de N-acetilcisteína (NAC), neutralizador de espécies reativas de oxigênio (EROs), revertia a diminuição dos níveis totais de CYP e de CYP3A e a redução das atividades enzimáticas. Por outro lado, o tratamento com N^o-monometil-L-arginina (NMMA), inibidor dos intermediários reativos de nitrogênio, produziu resultados inconsistentes (Berg-Candolfi *et al.*, 1996). Esses resultados, em modelo murino de toxoplasmose, sugerem que a elevação do IFN- γ e das EROs poderia ser um elo na cadeia de eventos desencadeados pela infecção que acabam resultando na depressão da atividade de CYP.

Os estudos anteriormente mencionados indicam que as enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos são afetadas, em geral deprimidas, durante infecções com *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* e *Toxoplasma gondi*. Além das evidências obtidas com esses protozoários, alguns estudos sugerem que a malária também é capaz de alterar a atividade de enzimas citocromo P450. As evidências disponíveis na literatura, sugerindo que a malária modula a atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos serão comentadas mais adiante nesta introdução.

1.2.2 Modulação do metabolismo de xenobióticos nas infecções bacterianas

Nos últimos anos, uma série de estudos experimentais tem indicado, consistentemente, que infecções bacterianas, tanto as produzidas por bactérias gram positivas quanto aquelas causadas por bactérias gram negativas, são capazes de modificar o metabolismo de xenobióticos.

Batra *et al.* (1987) mostraram que a tuberculose experimental induzida em cobaias produziu hepatomegalia, deprimiu as concentrações totais de CYP e da NADPH-citocromo c redutase e reduziu a atividade de monooxigenases nos animais infectados. Contrastando com a depressão das monooxigenases, as enzimas de conjugação uridina difosfoglicuroniltransferase (UGT) e glutathione S transferase (GST) estavam induzidas no fígado das cobaias. Os autores sugeriram que o distúrbio da integridade da membrana poderia estar associado à menor capacidade de biotransformação neste modelo experimental de tuberculose.

Krakovskia *et al.* (1989), por outro lado, observaram que, em microsossomos hepáticos de ratos infectados com uma bactéria gram-negativa do gênero *Salmonella*, há redução da atividade catalítica de CYP (aminopirona-N-desmetilase, anilina hidroxilase, NADPH citocromo c redutase) e depressão dos níveis totais de CYP e do citocromo b5 durante a fase aguda da doença, com retorno aos níveis basais após o período de convalescença.

Lescut *et al.* (1991) relataram que há depressão dos níveis hepáticos de CYP acompanhada por aumento dos níveis de glutathione durante a endocardite, a pielonefrite e a peritonite produzidas experimentalmente em ratos Sprague-Dawley.

Azri e Renton (1991) descreveram que, em roedores infectados com *Listeria monocytogenes*, ocorria depressão dos níveis totais de CYP e de heme, e uma exacerbação da atividade da heme oxigenase, e atribuíram a depressão de CYP à hemolisina liberada pela bactéria.

Em 1993, Armstrong e Renton obtiveram evidências de que a depressão da atividade de CYP1A e CYP2D9 em camundongos infectados com *L. monocytogenes* resultaria de alterações pré-traducionais. Em 1994, os mesmos autores associaram a depressão de CYP à produção de hemolisina na infecção por *L. monocytogenes*.

Khatsenko *et al.* (1998), investigando o efeito da infecção pela *Chlamydia trachomatis*, encontraram uma depressão de CYP1A e 2B no fígado de camundongos BALB/c. Para investigar se o óxido nítrico (NO) desempenhava um papel na redução das atividades catalíticas de CYP desencadeada pela infecção, os autores inibiram a NOS induzível (iNOS ou NOS2) com a L-N^G-nitroarginina metil éster (L-NAME) e notaram que ocorria uma reversão da depressão de CYP. Baseados nesta e em outras evidências experimentais (comentadas mais adiante), Khatsenko *et al.* (1993) sugeriram que a depressão da atividade de CYP nas infecções era mediada pela elevação do NO.

Garcia e Renton (2003) verificaram que a infecção de ratos com a bactéria gram-positiva *L. monocytogenes* pela via intracerebral reduziu os níveis totais hepáticos de CYP

quarenta e oito horas após a infecção, e as atividades catalíticas de CYP1A e 2B, quarenta e oito e setenta e duas horas após a infecção, respectivamente.

Richardson *et al.* (2006) relataram que a infecção de camundongos com *Citrobacter rodentium* (equivalente à infecção pela bactéria enteropatogênica *Escherichia coli* em seres humanos) reduziu os níveis dos mRNAs de CYP 4A10, 4A14, 3A11, 2C9, 4F14 e 4F15 e aumentou os níveis dos mRNAs de CYP2A5, 4F16 e 4F18. Nesse mesmo estudo, os autores notaram que a infecção reduziu os níveis das proteínas CYP2C, 3A e 4A, mas não alterou os níveis da proteína CYP2E (Richardson *et al.*, 2006).

Alterações de atividade e expressão de isoformas citocromo P450 foram descritas também com camundongos (A/JCr) naturalmente infectados com a bactéria *Helicobacter hepaticus*. Camundongos de colônias naturalmente infectadas com *H. hepaticus* (que infecta os canalículos biliares intra-hepáticos) desenvolvem um quadro de hepatite crônica que pode evoluir para carcinoma hepatocelular (Chomarat *et al.*, 1997; Sipowicz *et al.*, 1997). Após a descoberta do *H. hepaticus*, dois estudos apresentaram evidências (m-RNA, imunohistoquímica e atividade de CYP1A – etoxiresorufina-*O*-desetilase, EROD e metoxiresorufina-*O*-desmetilase, MROD - e 2A5, cumarina 7-hidroxilase, COH) de que há aumento da expressão e atividade de isoformas CYP1A e 2A5 com a evolução da hepatite, embora os autores não tenham notado alteração dos níveis totais de CYP no fígado (Chomarat *et al.*, 1997; Sipowicz *et al.*, 1997). Indicações de exacerbação do estresse oxidativo e aumento da expressão (mRNA) de isoformas da GST (mGSTP1-1, mGSTA1-1, mGSTa4-4) também foram encontrados nesses dois estudos (Chomarat *et al.*, 1997; Sipowicz *et al.*, 1997).

A regulação negativa de isoformas CYP hepáticas foi observada também em modelos de sepses polimicrobiana, desencadeada por CLP (*cecal ligation and puncture*) em ratos. A expressão de CYP1A2 (m-RNA e proteína) foi deprimida, enquanto a expressão da CYP4A1 permaneceu inalterada no fígado de ratos Sprague-Dawley 20 horas após a CLP (Crawford *et al.*, 2004). Em outro estudo do mesmo grupo, os autores demonstraram que, após a CLP em ratos, a depressão da expressão (mRNA) do receptor Ah (AhR) – receptor envolvido na regulação dos genes das enzimas das subfamílias CYP1A e 1B - e de CYP1A2 era revertida pelo tratamento com curcumina (polifenol obtido da planta *Curcuma longa*) (Wu *et al.*, 2006). Nesse experimento, a curcumina antagonizou também o aumento de citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 β - IL-1 β – e fator de necrose tumoral α , TNF- α) desencadeado pela CLP (Wu *et al.*, 2006).

As reduções da expressão e atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos, encontradas em modelo experimental de sepses polimicrobiana, são consistentes com os resultados de um estudo clínico relatado por Carcillo *et al.* (2003). Neste estudo, os

autores observaram que crianças com sepses exibiam uma acentuada redução (aproximadamente duas vezes) da depuração da antipirina, depressão esta que era ainda maior (quatro vezes) quando as crianças apresentavam falência persistente de múltiplos (três ou mais) órgãos (Carcillo *et al.*, 2003). Como a eliminação da antipirina depende de reações de monooxigenação catalisadas por várias isoformas CYP, tais como 1A2, 2B6, 2C9, 2C18 e 3A4, a redução da depuração deste fármaco na sepses possivelmente foi devida à depressão da atividade dessas enzimas.

1.2.3 Modulação do metabolismo de xenobióticos nas infecções virais

As infecções virais (*e.g.*, pelo vírus Mengo) estavam representadas entre os indutores de INF- γ que, segundo Renton e Mannering (1976_b), eram capazes de deprimir os níveis totais de citocromo P450 e a atividade de monooxigenases no fígado de ratos. Após esse relato pioneiro de Renton e Mannering (1976_b), uma série de trabalhos constatou que outras infecções virais também eram capazes de alterar a expressão e a atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos.

Como aparente exceção a essa regra, há alguns casos em que os autores relatam não ter encontrado alterações do metabolismo de xenobióticos em infecções virais. Armstrong e Renton (1993), por exemplo, verificaram que a hepatite provocada por um vírus da família Coronaviridae não modificava as reações da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), reação marcadora de CYP1A e da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD), marcadora de CYP2B, em microsossomos hepáticos de camundongos BALB/c. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura, entretanto, parece confirmar a observação de que o metabolismo de xenobióticos é modulado nas infecções por vírus.

Neste sentido, Funseth *et al.* (1994) observaram que, em camundongos infectados com o vírus humano coxsackie B3, ocorria um aumento da captação da 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) pelo cérebro, pâncreas, coração, baço e fígado, no dia quatro pós-infecção, que correspondia ao pico da viremia. Posteriormente, os autores demonstraram que, em camundongos infectados com o vírus coxsackie B3, havia uma redução da atividade de CYP1A1 de 75% entre os não-tratados, e de 30% entre os animais previamente tratados com TCDD (Funseth *et al.*, 2002).

Chemin e colaboradores (1999) mostraram que camundongos tornados transgênicos por incorporação do DNA do vírus da hepatite B (HBV) ao seu genoma eram portadores de lesão hepática que progredia com a idade e estava associada ao acúmulo do antígeno HBs (HBsAg) nos hepatócitos. Esses camundongos transgênicos para hepatite B apresentavam aumento dos níveis da proteína CYP1A e 2A5, quando expressavam quantidades citopáticas

de HBsAg. Digno de nota é o fato dos animais mais velhos exibirem também alterações de enzimas da fase 2, (*i.e.*, os transgênicos expressaram mais a isoforma GST pi, mas não a GST alfa).

Mileva *et al.* (2000) descreveram que, em camundongos infectados com o vírus da influenza, ocorria intensificação do estresse oxidativo no fígado, evidenciado pela maior peroxidação lipídica, redução dos níveis totais de citocromo P450, depressão das atividades de NADPH citocromo c redutase e das reações de monooxigenação, tais como a hidroxilação da anilina e da aminopirona, e a desmetilação da etilmorfina. Esses efeitos foram mais acentuados no sétimo dia após a inoculação do vírus, e a administração prévia do antioxidante vitamina E pareceu tê-los revertido, sugerindo que eles teriam sido mediados pela exacerbação do estresse oxidativo na infecção.

Li *et al.* (2006) estudaram o efeito do vírus HBV sobre a atividade catalítica e a expressão da proteína CYP3A4 humana, avaliada por *immunoblotting*, em pacientes com infecção crônica. Os autores observaram que a atividade e a expressão da proteína eram deprimidas pela infecção.

Os efeitos da infecção crônica pelo vírus da hepatite C sobre CYP1A1 foram investigados por Anderson *et al.* (2006) em uma linhagem de células de hepatoma humano que expressavam o *replicon* subgenômico HCV. O tratamento das células com TCDD (potente indutor de CYP1A) levou a uma redução da transcrição de CYP1A1, diminuição esta que era parcialmente revertida após o pré-tratamento das células com anti-oxidantes. Estes estudos mostraram que a regulação da transcrição do gene *CYP1A1* pelo receptor Ah, do qual o TCDD é um ligante, estava comprometido nos hepatócitos infectados com o HCV.

1.2.4 Modulação do metabolismo de xenobióticos em modelo experimental de artrite e de doença inflamatória do intestino

Nos últimos anos, vários estudos mostraram que, além das infecções comentadas nas secções anteriores, processos inflamatórios não infecciosos também modulam o metabolismo de xenobióticos. Um dos exemplos da modulação do metabolismo por inflamações assépticas é a alteração de expressão e atividade de CYP e enzimas transportadoras – proteínas que bombeiam toxinas e xenobióticos para fora da célula - na artrite induzida por adjuvante em roedores.

A artrite induzida por adjuvante em ratos tem sido utilizada como modelo experimental da artrite reumatóide humana. Neste modelo, Uno *et al.* (2007) verificaram que as atividades de enzimas da subfamília CYP3A (reações de hidroxilação do midazolam na posição 1, e de hidroxilação da 7-benziloxi-4-trifluorometil-cumarina na posição 7) estão

deprimidas no intestino de ratos artríticos. Esse efeito depressor sobre CYP3A foi mais acentuado no segmento superior do intestino, onde as atividades da enzima transportadora glicoproteína P (P-gp) também foram reduzidas a 60% das atividades registradas nos ratos controles. Os resultados de Uno *et al.* (2007) sugerem, portanto, que o metabolismo e a atividade das enzimas transportadoras de xenobióticos são deprimidas no intestino durante a artrite induzida em ratos. Essa conclusão é consistente com observações de estudos anteriores que evidenciaram que a cinética de fármacos, como o acebutolol e o propranolol, é alterada neste modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos (Piquette-Miller e Jamali, 1992, 1993).

Alguns estudos recentes em modelos murinos de artrite reumatóide têm começado a desvendar os possíveis mecanismos subjacentes a estas alterações de atividade e expressão de CYP e proteínas transportadoras na fase crônica da doença.

Ashino *et al.* (2007), por exemplo, observaram em camundongos transgênicos (por incorporação de material genético do vírus HTLV-1) que desenvolvem artrite crônica, elevadas concentrações de IL-6 acompanhadas de redução dos níveis de expressão (m-RNA e proteína) e atividade (hidroxilação da testosterona na posição 6 β) de CYP3A11, além da indução (mRNA) da metalotioneína-1/2 no fígado. Quarenta e oito horas após o tratamento dos camundongos transgênicos artríticos com anticorpo anti-IL6, houve reversão da supressão do m-RNA de CYP3A11 e da super-expressão do mRNA da metalotioneína, com retorno aos níveis comparáveis aos encontrados em animais transgênicos que não desenvolveram artrite (Ashino *et al.*, 2007). Esse trabalho sugere, portanto, que a elevação de IL-6 seria evento necessário para a modulação da expressão de CYP e enzimas transportadoras na artrite crônica.

Kawase *et al.* (2007), por outro lado, estudaram, em camundongos com artrite induzida por colágeno, a expressão (m-RNA) de dois receptores nucleares, o receptor *pregnane X* (PXR: *pregnane X receptor*) e o receptor constitutivo *androstane* (CAR: *constitutive androstane receptor*), que estão envolvidos na regulação da transcrição de proteínas transportadoras e CYP. Os níveis de PXR estavam reduzidos no intestino, enquanto os de CAR estavam deprimidos no fígado e no intestino de camundongos artríticos. Nesses camundongos artríticos, os níveis (mRNA) das enzimas transportadoras *multidrug-resistance 1a/b* (MDR1a/b) e *multidrug-resistance protein 3* (MRP3) e do CYP2B10 estavam deprimidos no fígado, mas pouca ou nenhuma alteração foi encontrada pelos autores em relação aos níveis de CYP3A11 no fígado e de transportadoras no intestino. Esses resultados sugerem que a supressão da expressão do receptor CAR causada pela artrite teve diferentes

consequências em termos da regulação da expressão de CYP e transportadoras no fígado e no intestino.

As doenças inflamatórias do intestino (DII) em seres humanos (*e.g.*, colite ulcerativa e doença de Crohn) caracterizam-se pela intensa reação inflamatória da mucosa intestinal. Recentemente, Masubuchi e Horie (2004) investigaram as alterações de atividade de CYP hepáticas (CYP3A2, 2C11, 1A2, 2E1 e 2D2) em um modelo experimental bem estabelecido de DII em ratos (DSS - dextran sulfato de sódio - a 3% administrado na água de beber por 7 dias). Os autores verificaram que, com exceção da CYP2D2, a atividade das demais isoformas examinadas estava deprimida no fígado dos ratos que receberam DSS. Foi observado ainda que, nos animais tratados com DSS, a administração de polimixina B bloqueou seletivamente a depressão das atividades de CYP3A2 e 2E1, enquanto, por outro lado, o tratamento com metronidazol impediu a depressão de 3A2, 2C11 e 2E1 (Masubuchi e Horie, 2004). Esses resultados sugerem que endotoxinas e bactérias da flora intestinal podem estar de alguma forma envolvidas na regulação negativa da atividade de isoformas CYP hepáticas neste modelo de DII.

Em um outro modelo de colite em ratos, Masubuchi *et al.* (2008) observaram também uma regulação negativa de isoformas CYP (CYP3A2 e 2C11 e em menor grau, 1A2 e 2E1) no fígado. Neste modelo, a colite experimental foi produzida pelo tratamento dos ratos, por via intracolônica, com ácido sulfônico trinitrobenzênico (TNBS, 100 mg/kg) dissolvido em etanol a 30%, sendo a inflamação local do cólon acompanhada por níveis elevados de endotoxina, IL-6 e óxido nítrico (NO) na veia porta hepática. Os autores verificaram ainda que a nimesulida (inibidor preferencial da ciclooxigenase 2, COX2) protegeu os ratos tratados com TNBS da regulação negativa de CYP3A2 no fígado. A polimixina B (que neutralizou a endotoxina), a curcumina (que tem propriedades anti-inflamatórias) e o cloreto de gadolínio (que inativa macrófagos) também atenuaram a regulação negativa de CYP3A2 no fígado. Esses resultados de Masubuchi *et al.* (2008) sugerem que substâncias que escapam do tecido intestinal (cólon) inflamado, ativariam as células de Kupffer, desencadeando a regulação negativa de CYP hepáticos.

1.2.5 Modulação do metabolismo de xenobióticos por endotoxinas, vacinas e citocinas pró-inflamatórias

1.2.5.1 Endotoxinas

Da mesma forma que as infecções bacterianas propriamente ditas, as endotoxinas, que são componentes lipopolissacarídicos da face externa da parede celular de bactérias gram-negativas, quando isoladas e administradas a roedores também são capazes de alterar a

expressão e atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos. O primeiro registro deste fato parece ter sido o trabalho de Renton e Mannering (1976_b), em que os autores testaram os efeitos de vários agentes indutores de interferon, entre os quais estava incluído o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Estudos posteriores confirmaram amplamente que as endotoxinas modulam o metabolismo de xenobióticos e, por ser modelo experimental mais simples do que as infecções, a administração de LPS tem sido, possivelmente, a forma de estimulação mais empregada para investigar os mecanismos envolvidos na modulação da biotransformação pela inflamação e infecção em roedores.

Sasaki *et al.* (1984) descreveram que a administração aguda de endotoxina (LPS de *E. coli*) prolongava a duração do sono induzido pelo pentobarbital, e reduzia os níveis totais de CYP e a velocidade de metabolização do pentobarbital, da ciclofosfamida, da anilina e da aminopirona em microsomas hepáticos de camundongos.

Experimentos relatados por Stanley *et al.* (1988) sugerem que, em camundongos, o tratamento com o LPS pode resultar tanto em supressão, como evidenciado pela maioria dos estudos, quanto em potenciação de isoformas CYP, dependendo da isoforma, do pré-tratamento com indutores, e da dose de LPS administrada. Os autores notaram ainda que, em camundongos cujas CYPs hepáticas haviam sido previamente induzidas por tratamento com fenobarbital ou 3-metilcolantreno, a administração de doses baixas da endotoxina aumentava a atividade de monooxigenases (EROD, etoxicumarina-*O*-desetilase – ECOD - e reação de desmetilação da benzfetamina), enquanto uma depressão dessas atividades aparecia com doses mais elevadas.

Sewer *et al.* (1996) relataram que o tratamento com LPS deprimia a expressão (m-RNA e proteína) constitutiva de CYP3A2 e 2E1 e, concomitantemente, induzia a expressão de CYPs da subfamília 4A no fígado de ratos. Em trabalho subsequente, Sewer *et al.* (1997) verificaram ainda que a injeção por via intraperitoneal de LPS, ou de substâncias irritantes (SiO₂, BaSO₄, kaolin), causava uma regulação negativa da expressão (mRNA e proteínas) de CYP2C11, não alterava a expressão de 2E1 e 3A2, e induzia a de 4A1, 4A2 e 4A3 no fígado de ratos Fischer 344. Os níveis do m-RNA de CYP2E1, 4A2 e 4A estavam aumentados no córtex renal dos ratos tratados com LPS, enquanto a atividade da clorzoxazona-6-hidroxilase (mediada por CYP2E1) estava induzida nos microsomas dos rins dos ratos tratados com os irritantes (Sewer *et al.*, 1996).

Neste sentido, Rockich e Blouin (1999) demonstraram que, em ratos Sprague-Dawley, ocorria uma depressão da atividade de CYP2E1 no fígado e uma correspondente redução da depuração (35%), e aumento da meia-vida ($t_{1/2}$) de eliminação (167%) da clorzoxazona, 24 horas após o tratamento com LPS.

Shedlofsky *et al.* (2000), por outro lado, compararam os efeitos da endotoxina, LPS, com os da enterotoxina B de estafilococos (*Staphylococcus aureus*), que são bactérias gram-positivas. De acordo com os autores, da mesma forma que as endotoxinas de organismos gram-negativos, as toxinas de bactérias gram-positivas também podem deprimir a atividade de isoformas CYP (CYP1A1/2, 2E1 e 3A) em camundongos. Em virtude desta constatação, Shedlofsky *et al.* (2000) sugeriram que tanto os quadros de sepse causados por organismos gram-negativos, como os produzidos por bactérias gram-positivas, poderiam deprimir o metabolismo de fármacos em pacientes.

É interessante notar que a injeção de LPS diretamente no ventrículo lateral do cérebro de ratos causou uma resposta inflamatória local no sistema nervoso central, que foi acompanhada por uma regulação negativa dos níveis e atividade de CYP, tanto no cérebro quanto no fígado (Renton e Nicholson, 2000). Neste caso, a possibilidade do efeito no fígado ter sido produzido por um extravasamento do LPS, injetado por via intra-cérebro-ventricular (i.c.v.), para fora do cérebro, parece remota, porque a mesma dose dada por via i.c.v., não teve qualquer efeito sobre CYP, quando foi administrada por via intraperitoneal (i.p.). Em trabalho posterior, os mesmos pesquisadores mostraram que a injeção i.c.v. de LPS aumentou os níveis séricos de várias citocinas (TNF- α , IL6- α , IFN- γ) (Nicholson e Renton, 2001). A injeção dessas citocinas por via i.c.v., entretanto, simulou os efeitos do LPS - injetado por via i.c.v. - no cérebro (*i.e.*, deprimiu CYP1A, EROD), mas não reproduziu os efeitos no fígado (*i.e.*, não alterou CYPs hepáticas). Esses resultados parecem sugerir que o efeito do LPS por via i.c.v., suprimindo as CYP cerebrais, seria mediado pelas citocinas testadas. Entretanto, por outro lado, essas mesmas citocinas injetadas localmente no cérebro não parecem participar do processo de sinalização cerebral que leva à regulação negativa de CYP no tecido hepático (Nicholson e Renton, 2001).

O envolvimento dos receptores nucleares CAR e PXR na modulação de CYPs hepáticos durante a resposta de fase aguda, produzida em camundongos pelo tratamento com LPS, foi investigado por Beigneux *et al.* (2002). Esses autores observaram que a redução da expressão (mRNA) do CYP2B10 e de isoformas da subfamília 3A era acompanhada por acentuada redução, quatro horas após o tratamento, dos níveis do m-RNA de CAR e PXR. Esses dois receptores nucleares desempenham papel chave na transativação do gene *CYP2B10* e de genes de algumas isoenzimas da subfamília 3A. Os autores também notaram uma marcante redução do mRNA do receptor RXR (*retinoid X receptor*), parceiro obrigatório dos receptores CAR e PXR na ligação aos sítios de alta afinidade no DNA. Digno de nota também é o fato do LPS ter revertido a regulação positiva do CYP3A causada pelo tratamento dos

camundongos com RU486, ou mifepristona, um esteróide sintético (anti-progestógeno) que é ligante do receptor PXR (Beigneux *et al.*, 2002).

Cheng *et al.* (2003) demonstraram que a regulação negativa da expressão (mRNA) de CYP2C11, 3A2 e 2E1 no fígado de ratos que receberam uma injeção de LPS (1 mg/kg) aparecia uma a duas horas após o tratamento e era antagonizada pelo pré-tratamento com curcumina (antioxidante). Como salientado pelos autores, a magnitude e a rapidez da resposta sugerem que a regulação (supressão) de CYP pelo LPS ocorreu ao nível transcricional. A partir dos resultados obtidos, entretanto, não é claro que fatores nucleares estariam envolvidos nessa regulação de CYP pela endotoxina.

Utilizando camundongos *knockout* (KO) para TNF- α , IL-1 α/β e IL-6, Ashino *et al.* (2004) investigaram se estas citocinas estariam envolvidas na depressão de CYPs hepáticos causada pelo tratamento com LPS e com o Bacillus Calmette-Guérin (BCG, 40 mg/kg). Os níveis de m-RNA de CYP3A11 e 2C29 foram reduzidos 24 horas após o tratamento de camundongos KO para IL-1 α/β com BCG. Nos animais KO para TNF- α , os níveis de mRNA de CYP3A11, mas não os de 2C29, foram reduzidos pelo BCG. O efeito depressor do BCG sobre a expressão de CYP3A11 e 2C29 não apareceu nos animais KO para IL-6. O LPS, por outro lado, diminuiu os níveis de mRNA das duas isoformas em todos os camundongos KO para as mencionadas citocinas (TNF- α , IL-1 α/β e IL-6). Em virtude desses resultados, os autores especularam que a IL-6 e o TNF- α , provavelmente, estariam envolvidos na regulação negativa das duas isoformas CYP (3A11 e 2C29) no tecido hepático de camundongos.

De modo análogo ao que foi visto em roedores, a alteração da atividade das enzimas de biotransformação de xenobióticos, em decorrência do tratamento com LPS de *E. coli*, foi demonstrada também em mamíferos não roedores, como o porco (Monshouwer *et al.*, 1996) e o coelho (Saitoh *et al.*, 1999).

Alguns estudos mostraram que, de forma semelhante à que tem sido observada em animais de laboratório, a endotoxina de bactérias gram-negativas (LPS de *E. coli*) também é capaz de deprimir o metabolismo de fármacos mediado por CYP em seres humanos. Shedlofsky *et al.* (1994) administraram a voluntários saudáveis do sexo masculino, uma dose oral de um coquetel de fármacos composto por antipirina (250 mg), hexobarbital (500 mg) e teofilina (150 mg), antes (injeção de salina apenas) e 30 minutos após uma ou duas injeções (espaçadas de 30 minutos) de LPS. Em ambos os casos (uma ou duas doses), o tratamento com LPS causou febre, aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e de proteínas de fase aguda no soro, assim como uma redução da depuração dos três fármacos do coquetel, diminuições estas que foram mais acentuadas após a segunda injeção de LPS e apresentaram correlação com os valores máximos iniciais de TNF- α e IL-6. Posteriormente, um estudo

semelhante realizado com um grupo de mulheres sadias encontrou decréscimos da depuração dos três fármacos após o tratamento com LPS (20 a 31%) de magnitude comparável à depressão que havia sido observada no ensaio clínico com homens (Shedlofsky *et al.*, 1997).

Baseados nestes estudos com LPS em humanos, e nos estudos experimentais em roedores, De Paepe *et al.* (2002), em interessante revisão da literatura voltada para o clínico, salientaram que a depressão do metabolismo oxidativo (via CYP), aliado às reduções da perfusão de fígado e rins, pode levar à dramáticas alterações da depuração de fármacos em pacientes com sepse e choque séptico. Essas modificações farmacocinéticas, e as possíveis alterações farmacodinâmicas (*e.g.*, variações das afinidades por receptores), como comentam os autores, tornam o uso de medicamentos, e a escolha do regime de doses mais adequado para o paciente, um grande desafio a ser enfrentado pelos médicos nos casos de sepse e choque séptico.

1.2.5.2 Vacinas e componentes

Vacinas bacterianas, freqüentemente, contém uma certa quantidade de lipopolissacarídeos, toxinas e outros componentes de bactérias que, tal como demonstrado por Renton e Mannering (1976_b) e por vários outros pesquisadores para as endotoxinas, são capazes de modular a expressão e a atividade de isoformas CYP hepáticas. Não é surpreendente, portanto, que relatos de alterações, em geral depressão, de atividade de isoformas CYP possam ser encontrados na literatura.

MacNee e Nimmo-Smith (1977), por exemplo, descreveram que uma única dose (50 mg/m²) da vacina contra a bactéria *Corynebacterium parvum*, injetada por via i.p. em camundongos CBA, aumentava o peso do fígado, prolongava o tempo de sono induzido pelo hexobarbital, reduzia o conteúdo total de CYP e a atividade da reação de desmetilação do p-nitroanisol na fração microsomal hepática. Diferente do efeito de duração relativamente curta que tem sido descrito para uma única dose do LPS de *E. coli* (via de regra, inferior a 24 horas, dependendo da dose e isoforma), neste caso (*C. parvum*), os autores verificaram que os efeitos depressores eram mais acentuados 13 a 14 dias após a injeção, e que a atividade metabólica retornava lentamente aos níveis basais (controles) 20 a 30 dias mais tarde.

Estudos em ratos têm mostrado, consistentemente, que a vacina BCG, após injeções únicas ou repetidas, quer pela via intracutânea, quer pela intravenosa, é capaz de reduzir a atividade de monooxigenases hepáticas, como a etoxicumarina-*O*-desetilase, a hidrocarboneto arílico hidroxilase, e a aminopirona-desmetilase (Farquhar *et al.*, 1976, Ruzicka *et al.*, 1980, Matsuura *et al.*, 1985). Matsuura *et al.* (1985) observaram, em ratas tratadas com BCG e *C. parvum*, que a depressão de CYP total e da atividade de monooxigenases hepáticas ocorria

por até 10 a 15 dias após uma injeção única, e era acompanhada por hepato-esplenomegalia e prolongado aumento da atividade da heme oxigenase. Baseados nessa observação, os autores sugeriram que os dois eventos estariam associados, e que a indução da heme oxigenase poderia levar a uma degradação aumentada do heme e, portanto, a uma menor disponibilidade deste para a síntese dos CYPs que são hemoproteínas (Matsuura *et al.*, 1985).

A vacina pertussis (celular, *Bordetella pertussis*) apresenta um potente efeito depressor sobre a expressão e atividade de isoformas CYP hepáticas de roedores, comparável em intensidade e duração, à supressão induzida pela *C. parvum*. Renton e Mannering (1976_b) listaram a vacina pertussis entre os agentes indutores de INF- γ que tinham em comum a propriedade de deprimir o metabolismo oxidativo de xenobióticos. Posteriormente, Renton (1979) verificou que a vacina contra a *Bordetella pertussis* diminuía a velocidade de hidroxilação da fenitoína e aumentava consideravelmente (4 vezes) a meia-vida ($t_{1/2}$) de eliminação deste fármaco anticonvulsivante em ratos. Ansher *et al.*, em uma série de trabalhos, mostraram que a administração da vacina pertussis isolada, ou do componente pertussis associado com o toxóide tetânico, ou ainda da vacina DPT (difteria, pertussis e tétano), produzia uma depressão dos níveis totais de CYP e da expressão e atividade de isoformas CYP no fígado de camundongos C57BL/6 (Ansher *et al.*, 1992, Ansher *et al.*, 1993, Ansher e Thompson, 1994). Essa depressão de CYPs hepáticos surgia logo após a injeção da vacina (dose única), retornava em seguida aos níveis basais e, depois, voltava a aparecer, sete dias após o tratamento. Os autores mostraram que a primeira fase (transiente) da depressão do metabolismo, que ocorria nas 24 horas iniciais, estava associada à elevação de IL-6 e TNF- α e, provavelmente, se devia à endotoxina da *B. pertussis*. A segunda fase da depressão, mais acentuada e duradoura, coincidia com uma elevação do INF- γ e, provavelmente, se deve a um efeito da toxina pertussis (Ansher *et al.*, 1993). Diferentemente da vacina pertussis celular (*whole cell vaccines*), as vacinas pertussis acelulares (menos tóxicas) aparentemente não deprimem as CYP hepáticas de camundongos (Ansher *et al.*, 1992, Ansher *et al.*, 1993, Ansher e Thompson, 1994).

Há na literatura algumas evidências de que vacinas virais também podem alterar o metabolismo hepático de xenobióticos. Neste contexto, a vacina contra a gripe (influenza) é a mais estudada, mas os resultados dos estudos publicados até agora parecem ser pouco consistentes quanto aos efeitos deste tipo de imunização sobre a atividade de isoformas CYP. Meredith *et al.* (1985), por exemplo, investigaram o efeito da vacinação antigripal sobre a depuração do lorazepam, do clordiazepóxido e da teofilina em voluntários saudáveis. Os autores verificaram que a vacinação não alterou o metabolismo do lorazepam e do clordiazepóxido, e produziu apenas uma redução discreta e transitória da depuração da

teofilina. Jann e Fidone (1986), por outro lado, notaram, em pacientes com retardo mental, que a vacina contra a gripe aumentou (7 e/ou 14 dias após a vacinação) os níveis séricos de anticonvulsivantes (fenobarbital, fenitoína e carbamazepina), o que indicaria uma eliminação mais lenta desses fármacos. Kim e Wilkinson (1996) não encontraram alteração de CYP2E1 após a vacinação contra a gripe. Hayney *et al.* (2001), empregando o teste respiratório com eritromicina (ERMBT, *erythromycin breath test*) em 15 voluntários, constataram que a vacina contra a gripe não alterou a atividade de CYP3A4. Em estudo subsequente com o mesmo método não invasivo (ERMBT), Hayney e Buck (2002) acharam, entre os sujeitos vacinados, um decréscimo da atividade de CYP3A4 relacionado ao aumento da idade do indivíduo, mas não aos títulos de anticorpos contra influenza.

É interessante registrar que, pelo menos dois estudos com vacinas contra doenças virais de aves encontraram uma diminuição da atividade de monooxigenases (anilina hidroxilase, etilmorfina-*N*-desmetilase) no fígado de galinhas após a vacinação (Sakar *et al.*, 2004, Crnić *et al.*, 2006).

Digno de nota também é o fato de que imunoadjuvantes químicos, como o copolímero de pyran, também deprimiram fortemente, e de forma dose-dependente, duradoura, e concomitante à ativação de macrófagos, a atividade de enzimas microssomais hepáticas em camundongos (Giampietri *et al.*, 1981).

1.2.5.3 Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas são peptídeos de baixo peso molecular que desempenham papel importante na sinalização entre células, sendo produzidas pelo sistema de defesa do organismo (*i.e.*, linfócitos, monócitos, e outras células) nas infecções, nas lesões tissulares, na doença auto-imune, e em processos inflamatórios de um modo geral. Elas atuam em receptores de membrana específicos que, através de mensageiros secundários, frequentemente tirosina-quinases, alteram positiva ou negativamente a expressão de vários genes (*e.g.*, de proteínas de membrana). Em virtude do papel chave que tem nas infecções e na inflamação, as citocinas pró-inflamatórias tem sido apontadas como os prováveis mediadores da regulação negativa da expressão e atividade de CYP que ocorre nessas condições. Esta suspeita é reforçada pela constatação, através de uma série de estudos experimentais, que citocinas como a IL1- β , IL-6, TNF- α e os interferons α e γ , quando administrados *in vivo*, ou *in vitro* em culturas de hepatócitos, tem efeitos depressores sobre a expressão de isoformas CYP. Além disso, os efeitos *in vitro* de citocinas, regulando a expressão de CYP em hepatócitos de roedores, são semelhantes aos observados com células hepáticas humanas (Morgan 1997; 2001 e Renton, 2000; 2001 e 2004).

A suspeita inicial, como já comentado nesta introdução, foi levantada no estudo de Renton e Mannering (1976_b), mostrando que diferentes indutores de interferon deprimiam várias isoformas e os níveis totais de CYP. Mochhala sustenta, em trabalho publicado em 1991, a hipótese de Renton e Mannering (1976_b) sobre o papel do interferon na regulação negativa de CYP, mas argumentaram que outras citocinas, que seriam liberadas pelas células de Kupffer, como a IL-1, a IL-6 e o TNF provavelmente também estariam envolvidas. Nesta mesma linha de investigação, a participação de interleucinas foi investigada por Fukuda e Sassa (1994). Esses autores trataram células HepG2 de hepatoma com IL-6 e avaliaram o efeito sobre a expressão de CYP1A1, observando depressão do mRNA e da proteína. Em relação às enzimas da fase 2, menos estudadas, Langouet *et al.* (1995) notaram um aumento do mRNA e da proteína GSTA1 e A2 após tratamento de hepatócitos humanos com IL-4.

Estudos em seres humanos foram realizados por Okuno *et al.* (1993) e Israel *et al.* (1993), para investigar o papel das citocinas na regulação da expressão de CYP. O grupo japonês estudou o papel do tratamento com interferon sobre a desalquilação da etoxi- e da metoxicumarina em pacientes com hepatite C e concluiu que esta citocina deprimia a atividade das enzimas metabolizadoras de drogas. O grupo de Israel e colaboradores (1993) examinou o efeito do tratamento isolado com INF- α sobre a depuração da teofilina, da antipirina e do hexobarbital em pacientes portadores de neoplasias. Como a inibição da depuração hepática não foi acompanhada pelo aumento dos níveis de outras citocinas ou das proteínas de fase aguda, os autores concluíram que não havia envolvimento de outros mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 ou IL-6) nas alterações do metabolismo desses fármacos causadas pelo tratamento do câncer com interferon.

Kalsotra *et al.* (2007), estudando citocinas pró e anti-inflamatórias, encontraram efeitos opostos sobre CYP4F (isoforma envolvida no metabolismo do leucotrieno B4, LTB4, que modula a inflamação em processos infecciosos e nas lesões tissulares). IL-1, IL-6 e TNF- α causavam indução, enquanto IL-10 provocava depressão da expressão de CYP4F.

Calleja *et al.* (1997) investigaram os efeitos de IL-1, IL-2 e IFN- γ e das suas combinações sobre CYP1A induzido pela β -naftoflavona, em cultura de hepatócitos de coelhos, e observaram padrões específicos de resposta: enquanto IL-2 deprimia CYP1A1 induzido, IFN- γ deprimia fracamente a expressão do mRNA de CYP1A1/2.

Os estudos de Aitken e Morgan (2007), em hepatócitos humanos, evidenciaram que a alteração da expressão de CYP em resposta às citocinas, e aos outros estímulos inflamatórios, diferia entre as várias isoformas. Enquanto CYP2C18 não era afetada pelo LPS, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF (*tumour growth factor*) ou IL-1, 2B6 só respondia à IL-6 e IFN, e 2C9, 2C19 e 3A4 eram deprimidas por IL-6.

Embora, como vimos, vários estudos tenham mostrado que a administração de determinadas citocinas (*e.g.*, INF- γ e outras) *in vivo*, ou a exposição de hepatócitos a elas *in vitro*, sejam capazes de alterar a expressão de isoformas CYP, no estágio atual do conhecimento é difícil apontar uma ou mais citocinas como sendo os principais mediadores da modulação da expressão de CYP que ocorre nas infecções e na inflamação. Esta dificuldade de interpretação dos dados experimentais nasce de algumas características das citocinas como, por exemplo, o fato delas serem produzidas tipicamente em cascata, (*i.e.*, uma determinada citocina administrada estimula as células alvo a produzir outras citocinas). Além disso, as citocinas são pleitrópicas (uma citocina age em uma gama de diferentes células alvo) e redundantes (funções semelhantes podem ser estimuladas por diferentes citocinas) em suas ações. Elas podem também agir tanto sinergisticamente (duas ou mais citocinas agem conjuntamente e o efeito é amplificado), quanto antagonisticamente (duas citocinas tem atividades opostas em determinado alvo). Neste cenário complexo, a melhor generalização que se pode fazer, a partir dos dados experimentais disponíveis até o momento, é que, coletivamente, as citocinas pró-inflamatórias estão, de alguma forma, envolvidas na regulação da expressão de CYP durante a inflamação e nas infecções. É possível também que haja especificidades quanto à regulação da expressão de cada uma das diferentes isoformas, como sugerido por Aitken e Morgan (2007), mas ainda permanece por ser devidamente esclarecido como as várias citocinas interagem na modulação da expressão de CYP, e se há a participação de outras moléculas (*e.g.*, NO) como atores principais ou coadjuvantes nesse processo.

1.2.6 Hipóteses sobre os mecanismos pelos quais estímulos inflamatórios modulariam a expressão e a atividade de isoformas CYP

1.2.6.1 Controvérsias a respeito do papel do óxido nítrico como mediador da regulação negativa de CYP na inflamação e em infecções

Em trabalho publicado em 1993, Oleg Khatsenko, John Vane e dois outros pesquisadores, Steven Gross e Arleen Rifkind, apresentaram uma série de evidências que, segundo eles, indicaria que o NO produzido pelas células imunoativadas seria o principal mediador da supressão de enzimas citocromo P450 observada após a imuno-estimulação (Khatsenko *et al.*, 1993). As evidências reunidas pelos autores incluíam resultados de testes *in vitro* demonstrando que, em microsossomos hepáticos de ratos tratados com fenobarbital, o aumento da concentração de NO, gerado a partir da substância doadora 3-morfolinossidnonimina N-etilcarbamida (SIN-1), correlacionava-se com o declínio da atividade da androstenediona 16 β -hidroxilase (catalisada por CYP2B1). Em outros experimentos *in vitro*, com microsossomos hepáticos de embrião de galinha e de rato induzidos

pelo fenobarbital, pela β -naftoflavona e pelo 3-metilcolantreno, a atividade da ECOD (mediada por várias isoformas CYP) foi deprimida em relação ao controle, quando a preparação microsomal foi incubada com a enzima NO sintase e cofatores, mas essa inibição foi total ou parcialmente revertida pela N^0 -metil-L-arginina (LNMA), substância inibidora da síntese de NO. Complementando esses dados de testes *in vitro*, Khatsenko *et al.* (1993) relataram que, em ratos tratados *in vivo* com LPS, a depressão da atividade da pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD, catalisada por CYP2B1) no fígado, e o aumento dos níveis de NO no soro, foram ambos parcialmente revertidos pelo tratamento concomitante com L-NAME, bloqueador da NO sintase, adicionado à água de beber. Nesse trabalho, os autores mostraram ainda que o tratamento (*in vivo*) de ratos com LPS causava acentuada depressão dos níveis totais de CYP em microsossomos hepáticos (previamente induzidos com fenobarbital), depressão esta que também era parcialmente antagonizada pelo tratamento concomitante com L-NAME.

Em uma série de estudos subsequentes, Khatsenko *et al.* reuniram novas evidências de que o NO seria um elo fundamental na cadeia de eventos desencadeados pela estimulação imunológica que levam à depressão das atividades de isoformas CYP. Khatsenko *et al.* (1997) investigaram os efeitos do tratamento de ratos com um inibidor da NOS2 (L-NAME), sobre a regulação negativa da atividade e expressão (mRNA e apoproteína) de CYP2B1/2 desencadeada pelo LPS em duas situações: administração do LPS antes e depois da indução de CYP2B1/2 com fenobarbital. O tratamento com LPS deprimiu a atividade catalítica (PROD) e os níveis da apoproteína (*immunoblotting*) e do mRNA (RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* semi-quantitativo) nas duas situações, mas o L-NAME só reverteu parcialmente essa depressão na segunda situação (LPS administrado após a indução com fenobarbital). Em vista desses resultados, os autores especularam que o NO mediaria – em parte – os efeitos supressivos do LPS sobre CYP2B1/2 ao nível pré-traducional (*e.g.*, alterando a estabilidade do mRNA) e afetaria apenas o mRNA e a proteína pré-existentes (já induzidos), não tendo aparentemente efeito sobre a síntese *de novo* (durante a indução).

Em outro estudo, Khatsenko e Kikkawa (1997) trataram ratos com LPS (1,2 mg/kg ip) e, 24 horas depois, analisaram os efeitos do tratamento sobre os níveis de mRNA (RT-PCR semi-quantitativo de 2C11 e 3A) e proteínas (*immunoblotting* de 3A2, 2C11 e 2B1/2), e sobre as atividades (16 α - e 6 β -androstenediona hidroxilases, EROD e PROD) de monooxigenases (3A2, 2C11, 1A2, e 2B1/2) na fração microsomal hepática. Os pesquisadores investigaram também como o bloqueio da NO sintase com L-NAME ou com aminoguanidina (AG), administrados em doses repetidas após a injeção de LPS, afetaria o efeito depressor da

endotoxina sobre essas isoformas. Os resultados mostraram que, como esperado, o L-NAME e a AG bloquearam o aumento dos níveis de NO plasmático (20 vezes) causado pelo LPS, e impediram o declínio dos níveis totais de CYP. Os dois inibidores da NOS2 reverteram ainda a depressão das atividades catalíticas das isoformas, e a redução dos níveis de proteína (de 29% para 3A2 a 100% para 2C11) e de mRNA produzidas pela endotoxina.

O papel do NO na supressão de isoformas CYP hepáticas foi examinado também em camundongos infectados com a bactéria Gram-negativa *Chlamidia trachomatis* (Khatsenko *et al.*, 1998). Seis dias após a inoculação i.p. de *C. trachomatis*, a produção *in vitro* de NO por macrófagos recuperados em lavado peritoneal estava aumentada, e as atividades de CYP1A (EROD) e 2B (PROD e BROD) no fígado estavam deprimidas (49%) em relação ao registrado em camundongos controles não infectados. O bloqueio da produção de NO com L-NAME reverteu os efeitos depressores da infecção sobre as atividades das isoformas CYP1A e 2B.

É interessante registrar que um estudo independente, de um outro grupo de pesquisadores (Wink *et al.*, 1993), publicado no mesmo ano do trabalho inicial de Khatsenko *et al.* (1993), havia constatado também que, em testes com exposição *in vitro*, substâncias liberadoras de NO inibiam as atividades de EROD e BROD nas frações S9 e microsomal hepática de ratos.

A hipótese levantada por Katsenko *et al.* (1993), portanto, é sustentada por experimentos envolvendo exposições *in vitro* e *in vivo* e, no caso das últimas, com o emprego de substâncias inibidoras da NO sintase induzível (NOS2). É importante destacar que a clara inibição de isoformas CYP pela exposição *in vitro* da fração microsomal ao NO, implica em bloqueio da atividade catalítica da enzima já expressa, não havendo nesta fração subcelular qualquer possibilidade de interferência com a regulação da expressão da enzima. No caso dos tratamentos *in vivo*, entretanto, o NO poderia estar tanto regulando negativamente a expressão da enzima, quanto inibindo diretamente a sua atividade catalítica, ou agindo de ambas as formas. Embora plausível, a hipótese de Khatsenko e colaboradores não é elaborada em detalhes a ponto de sugerir o mecanismo preferencial pelo qual a elevação dos níveis de NO inibiria a atividade de CYP. Há, teoricamente, várias formas pelas quais o NO poderia inibir a atividade de CYP, tais como:

- 1) Ligação (lábil e reversível) do NO ao grupo prostético heme, impedindo a ligação do O₂ e, conseqüentemente, inibindo a atividade catalítica da enzima. Esta inibição reversível (complexo heme-nitrosil) (Wink *et al.*, 1993) da atividade enzimática poderia ser notada na exposição *in vitro*, mas dificilmente seria evidenciada nos casos de tratamento *in vivo* porque,

pela natureza lábil da ligação do NO ao grupo heme, a inibição desapareceria quando da preparação da fração microsomal;

2) Nitrosilação (ligação do NO aos resíduos de aminoácidos, *e.g.*, grupos tiol da cisteína) da proteína, mudando a sua conformação e as características do centro ativo, e a afinidade da enzima pelo substrato (inibição irreversível);

3) Nitrosilação dos fatores reguladores da transcrição dos genes das isoformas da proteína, diminuindo a transcrição e, conseqüentemente, os níveis de mRNA (regulação negativa da expressão);

4) Degradação mais rápida da apoproteína (desestabilização), em consequência da nitrosilação de resíduos de aminoácidos ou do próprio heme;

5) Degradação mais rápida do mRNA (desestabilização) da enzima, diminuindo em termos quantitativos a tradução deste na proteína.

A hipótese de Oleg Khatsenko *et al.* de que o NO atuaria, de um modo geral, como mediador final da regulação negativa de CYP que ocorre na inflamação foi contestada - em parte - por uma série de trabalhos publicados a partir de 1998 por um grupo de pesquisadores liderados por Edward Morgan.

Sewer e Morgan (1998) trataram ratos com LPS de *E. coli* e determinaram, durante um período de 24 horas, as concentrações plasmáticas de NO, e os níveis de mRNA (RT-PCR semiquantitativo) e de apoproteínas, assim como as atividades de CYP2C11, 2E1 e 3A2 no fígado. As concentrações plasmáticas de NO estavam aumentadas 4, 6 (máximo) e 12 horas após a injeção da endotoxina, mas retornavam aos níveis basais 24 horas após a injeção. A co-administração da aminoguanidina, inibidor da NOS2, bloqueou completamente a elevação do NO plasmático em resposta à injeção do LPS, mas não reverteu a regulação negativa da expressão (mRNA e proteína) e a depressão da atividade catalítica (hidroxilação da testosterona nas posições 2 α , 16- α e 6- β , as duas primeiras catalisadas por CYP2C11, e a última por 3A2, e a hidroxilação do *p*-nitrofenol, mediada por 2E1) das três isoformas nos três intervalos de tempo examinados após o tratamento com a endotoxina. Em relação às atividades catalíticas, os autores notaram que elas estavam inibidas (CYP3A2 em menor grau) 6 horas após a injeção de LPS, retornavam aos níveis basais 12 horas após, e estavam novamente deprimidas 24 horas após o tratamento. Como o grupo de ratos tratados apenas com a aminoguanidina apresentou uma inibição semelhante das atividades catalíticas, Sewer e Morgan (1998) concluem que neste intervalo de tempo (fase inicial do efeito) após a administração do LPS, não foi possível excluir a possibilidade da elevação do NO ser necessária para este efeito. Os autores salientam, entretanto, que a segunda fase (24 horas depois do tratamento) da depressão de CYP pelo LPS, que resultaria da regulação negativa da

expressão dos genes, seria independente da elevação dos níveis do NO (uma vez que 24 horas após o tratamento, os níveis de NO já teriam retornado ao níveis normais). Estes dados de Sewer e Morgan (1998), claramente, contradizem os resultados anteriores de Khatsenko e Kikkawa (1997) e são difíceis de explicar.

Em estudo subsequente, o grupo de pesquisadores liderado por E. Morgan examinou o papel do NO na regulação negativa de CYP2B1 causada pelo LPS em cultura primária – em Matrigel - de hepatócitos de ratos (Ferrari *et al.*, 2001). Nestes experimentos, a expressão de CYP2B1 nos hepatócitos havia sido previamente induzida por exposição ao fenobarbital (1 mM) por 48 horas. Inicialmente, Ferrari *et al.* (2001) constataram que o LPS, adicionado ao meio de cultura por 24 horas, produzia uma elevação dos níveis de NO e uma redução do mRNA de CYP2B1 (RT-PCR semiquantitativo) nos hepatócitos, sendo ambos os efeitos dependentes da concentração de LPS. Neste experimento, entretanto, o LPS foi claramente mais potente em suprimir o mRNA de CYP2B1 ($EC_{50} < 1$ pg/ml) do que em elevar os níveis de NO ($EC_{50} > 10$ ng/ml). Em outro experimento, os autores notaram que uma concentração baixa de LPS (10^{-10} g/ml) causava uma indução transitória do mRNA de CYP2B1 com 6 horas, e uma depressão com 12 e 24 horas de tratamento, enquanto uma concentração alta da endotoxina (10^{-5} g/ml) produzia apenas uma depressão a partir de 12 horas. Segundo Ferrari *et al.* (2001), a supressão do mRNA produzida pelo LPS foi independente do NO, porque a adição de NMA ou de aminoguanidina ao meio de cultura, em concentrações que bloquearam completamente a elevação do NO, não atenuaram o efeito depressor sobre a expressão de CYP2B1. Os autores verificaram ainda que, nesta cultura de hepatócitos de rato, a depressão dos níveis de proteína e da atividade (PROD) de CYP2B1 produzida pelo LPS (10 µg/ml) podia ser completamente antagonizada pela adição de inibidores da NO sintase e também pelo composto LY83583 – inibidor da guanilato ciclase solúvel, e da produção da guanosina monofosfato cíclica (cGMP) - que impedem a indução da NOS2. A adição de arginina ao meio de cultura anulou o efeito dos inibidores de NOS2, ou seja, restabeleceu a regulação negativa da expressão de CYP2B1 pelo LPS, enquanto a adição de doadores de NO (GSNO, S-nitrosoglutationa e SNAP, S-nitroso-N-acetilpenicilamina) mimetizou o efeito da endotoxina sobre esta isoforma. Em conjunto, os resultados de Ferrari *et al.* (2001) sugeriram que a regulação negativa de CYP2B1 pelo LPS poderia se fazer por dois mecanismos, um componente de ação rápida dependente do NO, que deprimiria os níveis da proteína nas concentrações mais altas da endotoxina, e um componente tardio independente do NO, que suprimiria a expressão da isoforma ao nível pré-traducional e que ocorreria em concentrações baixas de LPS.

Como vimos, quase todos os estudos sobre o papel do NO na regulação negativa de CYP em resposta à endoxina foram realizados com ratos. Li-Masters e Morgan (2002), todavia, investigaram se a modulação de isoformas da subfamília CYP2B pelo LPS em camundongos seria dependente do NO. Os autores verificaram que, camundongos fêmeas C57BL/6 previamente tratados com fenobarbital (33 mg/kg ip de 8 em 8 horas por 2 dias), responderam ao LPS (0, 0,3, 1, 3, 10 e 20 mg/kg i.p.) com uma elevação dos níveis de NO plasmático e uma depressão dos níveis de mRNA e da proteína de CYP2B9/10 no fígado, 12 horas após o tratamento com a endoxina. Estas respostas ao LPS foram dose-dependentes, mas, enquanto a dose de 0,3 mg/kg já havia causado depressão máxima dos mRNA de CYP2B9 e 2B10, os níveis de NO aumentaram a partir de 1 mg/kg e alcançaram o nível máximo na dose de 10 mg/kg. Neste estudo, Li-Masters e Morgan (2002) demonstraram também que a depressão dos níveis do mRNA de CYP2B9 e 2B10 causada por 1 mg/kg de LPS (12 horas após) foi equivalente em C57BL/6 selvagens e em camundongos nulos para expressão de NOS2 (*NOS2 null mice*) que, como esperado, não apresentaram aumento de NO plasmático após a administração da endotoxina. Os níveis de proteína estavam deprimidos 24 horas após o LPS tanto nos camundongos selvagens quanto nos nulos para NOS2. Esses resultados levaram os autores a concluir que no fígado de camundongos, a regulação negativa da expressão de CYP2B9/10 (mRNA e proteína) é independente da elevação do NO produzida pela endotoxina.

Há alguma discrepância entre os dados de Morgan *et al.* no que tange ao papel do NO na supressão de proteínas de isoformas da subfamília 2B em hepatócitos de ratos em cultura (Ferrari *et al.*, 2001) e no fígado de camundongos (Li-Masters e Morgan, 2002), em resposta à endotoxina. De qualquer modo, embora o conjunto de dados do grupo liderado por E. Morgan nessa série de estudos não exclua totalmente a possibilidade de que o NO tenha um papel na depressão de CYPs na inflamação, particularmente no caso de CYP2B, eles contradizem algumas evidências experimentais apresentadas por Oleg Khatsenko e colaboradores, e enfraquecem a hipótese de que o NO seria um mediador final necessário dessa regulação negativa.

A controvérsia sobre o papel do NO na regulação de CYP permanece viva na literatura.

Westerholt *et al.* (2004), por exemplo, analisando material de biópsia de fígados humanos transplantados, verificaram que durante o processo de rejeição há uma clara depressão da atividade de CYP (1A2 e 2E1), que é acompanhada por uma regulação positiva (RT-PCR) dos genes do INF- γ e da NOS2, mas não da NOS constitutiva. Os autores

atribuíram à elevação do NO e de citocinas, a depressão das atividades de CYP no fígado durante a rejeição em curso.

Tunctan *et al.* (2006) investigaram, em ratos, a hipótese de que a inibição de CYP4A renal, em resposta à endotoxina, estaria associada à elevação do NO, e contribuiria para a hipotensão observada na endotoxemia. Os autores usaram um potente inibidor da NOS2, 1,3-PBIT na dose de 10 mg/kg, e concluíram que a superprodução de NO via NOS2 suprime a expressão e atividade de CYP4A nos rins, e que a administração de 1,3-PBIT restaura a atividade e expressão de CYP4A, e reverte a queda da pressão arterial média. Esse efeito poderia resultar do aumento da produção de ácido araquidônico e metabólitos, em decorrência da recuperação da atividade de CYP4A.

Eum *et al.* (2006) produziram, experimentalmente, sepses polimicrobiana em ratos (CLP, *cecal ligation and puncture*) e examinaram o papel da elevação do NO na depressão da expressão e atividade de CYPs hepáticas, empregando bloqueadores da NOS (aminoguanidina 100 mg/kg i.p. e L-NAME 100 mg/kg i.p.). Segundo os autores, os dois bloqueadores da NO sintase inibiram os efeitos depressores da CLP sobre as CYP hepáticas, o que sugeriria que o NO desempenha um papel chave na regulação negativa das CYP hepáticas na sepses.

Recentemente, Gharavi e El-Kadi (2007) relataram evidências, obtidas em testes em cultura de células de hepatoma murino (células Hepa 1c1c7), sugestivas de que o NO estaria envolvido na regulação negativa da expressão de CYP1A1 causada pelo LPS e pelo TNF- α .

1.3 Malária

1.3.1 Malária humana

A malária é a doença parasitária de maior impacto em termos de saúde pública, tanto pela elevada incidência, principalmente em países em desenvolvimento, quanto pela alta morbi-mortalidade. Entre 300 e 500 milhões de indivíduos são infectados anualmente, sendo a doença endêmica em algumas regiões da Ásia e América do Sul e, sobretudo, na África subsaariana. Estima-se que a malária mate de um e meio a dois milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, ocorrendo a maioria destes óbitos na África subsaariana (Greenwood e Mutabingwa, 2002; Camargo, 2003).

O agente etiológico da malária é um protozoário que pertence ao filo Apicomplexa, à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*, sendo quatro as espécies que causam a doença no homem: o *P. falciparum*, o *P. vivax*, o *P. malariae* e o *P. ovale*. O *P. falciparum* é o protozoário responsável pela forma mais grave da malária humana.

Na natureza, o ciclo biológico do parasito da malária (*Plasmodium spp.*) se passa em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado (mosquito). No caso da malária humana,

os hospedeiros invertebrados são mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo o *A. gambiae*, o mais eficiente vetor da doença e o mais importante transmissor na África. No Brasil, o *A. darlingi* é o mais importante transmissor da doença, ocorrendo na Região Amazônica, enquanto o *A. aquasalis* é o vetor encontrado nas regiões costeiras e de águas de maior salinidade.

Quando a fêmea do anofelino suga o sangue do hospedeiro, a forma infectante do parasito (*Plasmodium spp.*) ou esporozoíta, é injetada no tecido subcutâneo ou, menos frequentemente, diretamente na circulação sanguínea. Os esporozoítas rapidamente atingem o fígado, onde no interior dos hepatócitos, se diferenciam em trofozoítas hepáticos. Os trofozoítas se desenvolvem e adquirem a forma de esquizonte hepático, que sofre divisão mitótica, produzindo os merozoítas. Ao final deste processo de multiplicação, os hepatócitos se rompem, liberando milhares de merozoítas na corrente sanguínea. Esta fase hepática da infecção, ou estágio exo-eritrocítico da malária, dura entre seis e dezesseis dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Os merozoítas liberados são, em grande parte, fagocitados e destruídos ainda no fígado pelas células de Kupffer, mas os que sobrevivem, invadem os eritrócitos e iniciam o estágio eritrocítico da doença. No interior das hemácias, os merozoítas se transformam em trofozoítas, que se dividem por esquizogonia. Após essa intensa multiplicação do parasito, as hemácias se rompem liberando milhares de novos merozoítas na corrente sanguínea, onde eles irão invadir novas hemácias, reiniciando, assim o ciclo eritrocítico de multiplicação (Figura 1.1).

Os ciclos esquizogônicos eritrocitários podem ocorrer a intervalos regulares, cuja duração é característica de cada espécie de *Plasmodium*: 48 horas para o *P. falciparum* (o ciclo eritrocítico deste plasmódio pode ocorrer também a intervalos de 36 horas), *P. vivax* ou *P. ovale*, e 72 horas para o *P. malariae*. Durante a fase eritrocítica de multiplicação, alguns merozoítas se diferenciam em gametócitos (formas sexuadas do parasita), que são ingeridos pelo mosquito, quando do repasto sanguíneo. No tubo digestivo do anofelino infectado, tem lugar a reprodução sexuada do parasita. Os gametócitos masculino e feminino se fundem, formando o zigoto que, depois de algum tempo, desloca-se com movimentos amebóides e, no revestimento epitelial da parede intestinal, segrega-se com um envoltório protetor, formando uma estrutura denominada oocisto (Rey, 1991). O processo de multiplicação ou esporogonia dá origem a novos esporozoítas e leva ao crescimento do oocisto no intestino. Os esporozoítas são liberados com a ruptura do oocisto, invadem a hemolinfa e migram para as glândulas salivares do inseto. Quando há novo repasto, os esporozoítas são injetados junto com a saliva do mosquito no hospedeiro vertebrado, iniciando mais um ciclo de vida do parasito (Rey, 1991; Miller *et al.*, 2002) (Figura 1.2).

Os sinais e sintomas da malária estão associados ao ciclo eritrocítico do parasito e incluem febre, calafrios, cefaléia, artralgia, vômitos, sensação de formigamento na pele, anemia, hemoglobinúria, hipoglicemia, convulsões e coma. Alterações como esplenomegalia, hepatomegalia, isquemia cerebral e insuficiência renal também podem ser vistas. As manifestações clínicas da malária grave, que eventualmente incluem alterações neurológicas (malária cerebral), podem evoluir para o coma e a morte (Pamplona *et al.*, 2007). Crianças, mulheres grávidas e indivíduos que são infectados com o plasmódio pela primeira vez são particularmente susceptíveis às manifestações mais graves da doença. As infecções pelo *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae* raramente dão origem a quadros de maior severidade e, via de regra, não são letais.

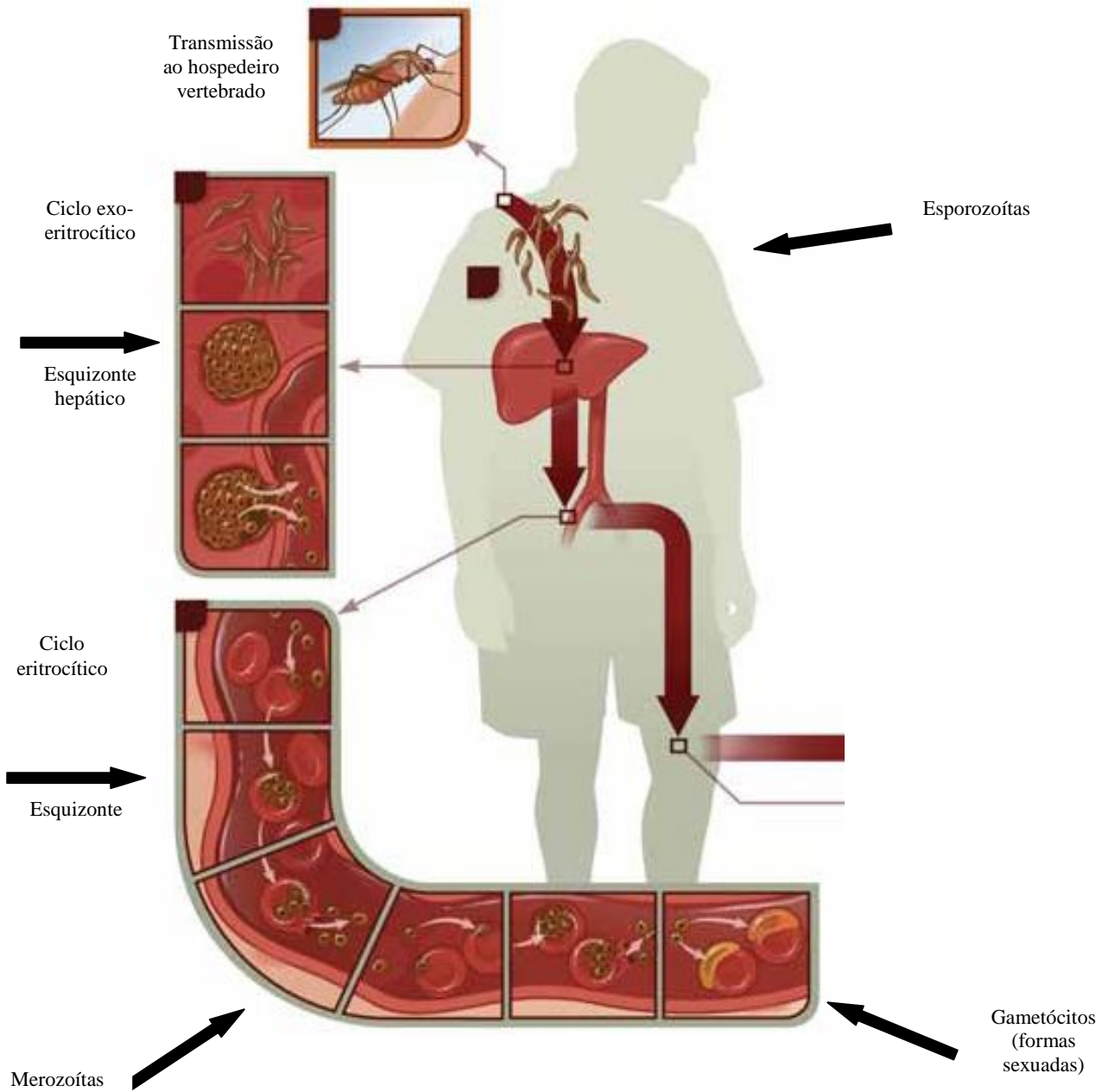


Figura 1.1 – Ciclos exo-eritrocítico e eritrocítico da malária. Reproduzido de “Understanding Malaria, Fighting an Ancient Scourge” NIAID Science Education, NIH, USA (<http://www.niaid.nih.gov/publications/malaria/pfd/malaria/pdf>, acessado em 14/03/2008).

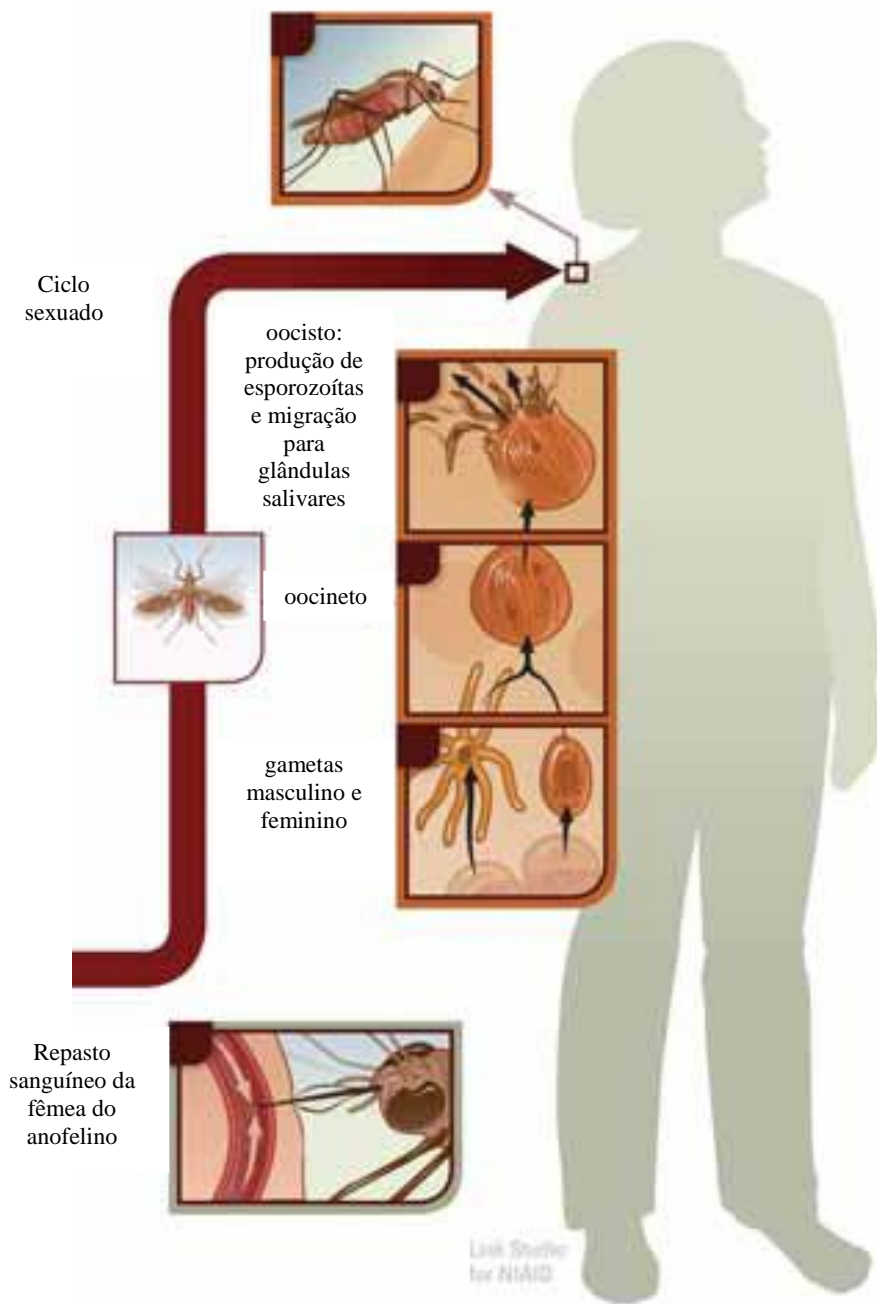


Figura 1.2 – Ciclo sexuado do *Plasmodium* no mosquito (fêmea) do gênero *Anopheles*. Reproduzido de “Understanding Malaria, Fighting an Ancient Scourge” NIAID Science Education, NIH, USA (<http://www.niaid.nih.gov/publications/malaria/pfd/malaria/pdf>, acessado em 14/03/2008).

1.3.2 Modelos experimentais de malária

O conhecimento atual sobre a imunopatologia da malária foi adquirido, em grande parte, em estudos que envolveram a infecção de roedores de laboratório, principalmente camundongos. Os parasitos mais frequentemente usados nos modelos murinos de malária pertencem a quatro espécies do gênero *Plasmodium*: *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckei* e *P. chabaudi*.

O *Plasmodium berghei* foi o primeiro dos quatro parasitos a ser isolado e é ainda hoje o mais utilizado em estudos experimentais (Cox, 1988). O *P. berghei* é encontrado em vários roedores e, no laboratório, é capaz de infectar camundongos, hamsters e ratos. No caso dos ratos, os indivíduos jovens são susceptíveis, mas os adultos são em geral refratários à infecção (Cox, 1988). O *P. berghei* tem um ciclo assexuado eritrocitário não sincronizado, cuja periodicidade de replicação é de 24 horas, e em camundongos, produz seis a dez merozoítas por hemácia infectada (Cox, 1988).

No caso do *P. chabaudi*, a esquizogonia tem início por volta da meia-noite e prolonga-se até a manhã seguinte, e cada esquizonte maduro contém de quatro a oito e, ocasionalmente, mais merozoítas (Cox, 1988).

A gravidade e o curso letal ou não-letal da malária murina experimental dependem do parasito e da linhagem do camundongo. Os plasmódios *P. berghei*, *P. vinckei* e algumas linhagens de *P. yoelii* e *P. chabaudi* são capazes de causar infecções letais em camundongos (Foote *et al.*, 2005). No caso de camundongos infectados com o *P. berghei*, a evolução letal pode se dar precocemente em consequência do aparecimento de um quadro neurológico compatível com malária cerebral, ou mais tarde, em virtude de um quadro de anemia aguda grave. No caso de outros plasmódios (*P. yoelii*, *P. c. chabaudi* e *P. vinckei petteri*), a morte nas linhagens de camundongos não resistentes ocorre, via de regra, em consequência do agravamento do quadro de anemia aguda. Nas linhagens murinas resistentes, entretanto, a infecção com esses plasmódios pode evoluir para a recuperação, após a elevação inicial da parasitemia, com a eliminação completa do parasito, ou com a permanência deste, e recidivas de menor intensidade ocorrendo durante vários meses (Foote *et al.*, 2005).

O quadro neurológico causado pelo *P. berghei* ANKA em linhagens não resistentes (*e.g.*, C57BL/6), tem sido considerado um modelo murino da malária cerebral humana.

A malária cerebral (MC) humana está associada a uma alteração fisiopatológica típica da doença causada pelo *P. falciparum*, ou seja, o seqüestro das hemácias parasitadas em vasos da microcirculação de órgãos como o cérebro, o coração, os pulmões e a submucosa do intestino delgado, seqüestro de leucócitos e plaquetas nos microvasos cerebrais e produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Brian de Souza e Riley, 2002; Combes *et al.*, 2006).

Embora nenhum modelo animal (primatas e roedores) mimetize exatamente a síndrome humana, o *P. berghei* ANKA causa, em linhagens não resistentes de camundongos (e.g., C57BL/6, CBA), um quadro neurológico em que os sinais clínicos como ataxia, convulsões e coma foram associados ao seqüestro de células sanguíneas nos vasos da microcirculação cerebral, com obstrução vascular e micro-hemorragias nas áreas com lesões do tecido nervoso (Brian de Souza e Riley, 2002). É interessante registrar que o *P. berghei* ANKA produz um quadro claro de malária cerebral em apenas duas linhagens (C57BL/6 e CBA) murinas, que são conhecidas por serem geneticamente predispostas a exibir forte resposta imune pró-inflamatória (Brian de Souza e Riley, 2002). Recentemente, Griffith *et al.* (2007) demonstraram que a sinalização através do receptor *Toll-like* influencia o desenvolvimento da malária cerebral letal nos camundongos infectados com *P. berghei* ANKA. Em relação à malária cerebral causada pelo *P. berghei* ANKA, a linhagem murina DBA-2 foi classificada como resistente por Foote *et al.* (2005) e como não resistente, por Brian de Souza e Riley (2002). Embora a infecção com *P. berghei* ANKA seja letal também para camundongos DBA-2, a morte nesse caso resulta, em geral, do agravamento da anemia aguda e não do comprometimento cerebral.

O *P. c. chabaudi* é, de um modo geral, considerado “avirulento” ou não letal mas, na verdade, o desfecho letal ou não letal da infecção experimental depende da linhagem, ou seja da constituição genética do hospedeiro murino. Os camundongos das linhagens C57BL/6, DBA-2 e CBA são resistentes (*i.e.*, a infecção evolui para a resolução), enquanto no caso dos camundongos A/J e BALB/c (não resistentes), a infecção resulta na morte do hospedeiro (Cox, 1988, Hernandez-Valladares *et al.*, 2004, Foote *et al.*, 2005).

Entre as principais características patológicas da malária humana estão a anemia, a trombocitopenia, a esplenomegalia, a hepatomegalia, o edema pulmonar, o dano cerebral (malária cerebral), o dano renal e a imunodepressão (Cox, 1988; Rey, 1991). Segundo Cox (1988), todas essas alterações patológicas da malária humana ocorrem também em infecções experimentais de primatas e roedores.

A anemia em roedores é comparável à observada em seres humanos, particularmente nos portadores de malária pelo *P. falciparum*, sendo grave e de início rápido. A fisiopatologia da anemia na malária é complexa. A elevação da parasitemia é acompanhada por queda do hematócrito e eritrofagocitose (de células infectadas e não infectadas) no fígado e baço e aumento da reticulocitose. A anemia, todavia, parece ser mais grave do que aquela que seria esperada da simples ruptura das hemácias parasitadas. A possibilidade de toxinas produzidas pelo plasmódio afetarem diretamente a eritropoiese, o desenvolvimento de anemia auto-imune clássica, e efeitos indiretos de antígenos do parasita na superfície de células infectadas e não

infectadas são hipóteses que tem sido apresentadas como explicações para o aparecimento da anemia grave na malária (Cox, 1988).

A esplenomegalia e hepatomegalia são alterações também encontradas na malária murina. O baço do roedor aumenta consideravelmente de tamanho e apresenta cor vermelho-escura ou negra, sendo frágil ao toque. O exame histológico mostra que o baço está em estado reacional hiperplásico, com aumento do número e tamanho dos macrófagos da polpa vermelha que exibem intensa atividade fagocitária, o que é evidenciado pela presença de parasitas, restos celulares e pigmento (hemozoína). O fígado também está aumentado e adquire cor castanho-escura em virtude do acúmulo de grandes quantidades de pigmento (hemozoína) nas células de Kupffer que sofrem hiperplasia e hipertrofia.

É importante destacar que, na esmagadora maioria dos estudos realizados com roedores, o animal é inoculado por via intra-peritoneal ou intra-venosa, com o sangue de um doador infectado com o plasmódio, o que inicia diretamente o ciclo eritrocítico da doença no hospedeiro vertebrado. Não há nesses casos, portanto, a intervenção do hospedeiro invertebrado e um ciclo exoeritrocítico no fígado do vertebrado. No hospedeiro vertebrado, nenhuma alteração patológica significativa tem sido atribuída aos esporozoítas, ao estágio exoeritrocítico, ou aos gametócitos (Cox, 1988).

1.3.3 Alterações do metabolismo de xenobióticos observadas na malária

Como veremos a seguir, há na literatura alguns estudos sobre alterações do metabolismo de xenobióticos na malária experimental em roedores e na infecção humana com *P. falciparum*. Na maioria dos trabalhos experimentais encontrados, foi usado o *P. berghei* como agente da doença, embora haja também alguns estudos com o *P. yoelii*. No caso dos estudos com *P. yoelii*, entretanto, não é informado nos artigos se se trata de linhagem letal ou não letal do parasita. Em vários trabalhos com camundongos, a linhagem do hospedeiro murino também não é informada no artigo publicado. Há artigos também em que faltam informações precisas sobre a parasitemia e a clínica do hospedeiro no momento em que o animal é morto para análise do metabolismo hepático. Nessas condições, como veremos a seguir, é possível concluir que a malária altera o metabolismo de xenobióticos, mas não é possível identificar que tipos de evolução da infecção (letal ou não letal) estariam associados à essas alterações.

1.3.3.1 Alterações na malária experimental

A malária experimental, produzida pelo *P. berghei* em ratos foi, possivelmente, a primeira infecção que foi associada à uma depressão da atividade de enzimas hepáticas que participam do metabolismo de xenobióticos. Em 1970, Jeane S. McCarthy *et al.* publicaram um artigo em que relataram que ratos infectados com hemácias parasitadas com *P. berghei* e mortos sequencialmente de 1 a 8 dias após a infecção, exibiam uma progressiva redução do metabolismo microsomal hepático da etilmorfina, anilina, p-nitroanisol e hexobarbital, assim como um declínio dos níveis totais de CYP. Os pesquisadores observaram também que a diminuição da atividade das CYP hepáticas era acompanhada por um prolongamento do tempo de sono induzido pelo hexobarbital. Nas conclusões do trabalho, os autores destacaram que “*permanece por ser determinado se as alterações bioquímicas observadas resultam de uma ação direta do parasita ou são efeitos secundários da infecção*” (McCarthy *et al.*, 1970). O trabalho de McCarthy *et al.* permaneceu nos anos seguintes quase como um registro isolado, não tendo estimulado de imediato outros estudos sobre a modulação do metabolismo de xenobióticos durante as infecções. Como vimos anteriormente nesta Introdução, coube ao artigo posterior de Renton e Mannering (1976_b), que levantava a hipótese de existir uma relação entre a indução do INF- γ e a depressão do metabolismo, o papel de chamar a atenção para o fato de que se estava diante de um fenômeno mais geral, que poderia ter implicações na área da terapêutica farmacológica.

Apenas em 1984 apareceu na literatura um outro artigo sobre alterações do metabolismo de xenobióticos em modelos experimentais de malária. Alvares *et al.* (1984) infectaram camundongos (NIH/NMRI ou A/J) com *P. berghei* e observaram, durante o estágio eritrocítico da malária, declínios de 30-40% nos níveis totais de CYP e nas atividades de monooxigenases (oxidação da etilmorfina e do benzo[*a*]pireno) no fígado. Neste estudo, Alvares *et al.* (1984) investigaram também as alterações de CYP no estágio exo-eritrocítico da malária, e em camundongos injetados com esporozoítas inativados pelo calor, não tendo encontrado reduções significativas dos níveis e das atividades de CYPs hepáticos nessas duas situações (*i.e.*, nem nos camundongos injetados com esporozoítas ativos nem nos injetados com os esporozoítas inativados). Este trabalho de Alvares *et al.* (1984) foi o único que localizamos, nas bases de dados pesquisadas (MedLine e ToxLine), em que a modulação da biotransformação de xenobióticos foi estudada no estágio exo-eritrocítico da infecção malárica.

Estudos subseqüentes em camundongos e ratos encontraram, de um modo geral, resultados consistentes com uma depressão de isoformas CYP hepáticas e do metabolismo de xenobióticos durante o estágio eritrocítico da malária.

Mihaly *et al.* (1987) avaliaram a eliminação do anti-malárico pirimetamina em fígados isolados de ratos infectados com formas eritrocíticas de *P. berghei* duas semanas antes da remoção do órgão. Neste trabalho, os pesquisadores verificaram que a eliminação do fármaco estava prejudicada (*i.e.*, meia vida no perfusato aumentada) nos fígados dos ratos infectados.

Saxena *et al.* (1987) infectaram camundongos albinos com *P. yoelii nigeriensis* e verificaram que, quando a parasitemia atingia níveis extremamente altos (80%), ocorria no fígado dos infectados uma diminuição de CYP e da atividade de monooxigenases (anilina hidroxilase, aminopirona-*N*-desmetilase e benzo-[*a*]-pireno hidroxilase) e um aumento (4 vezes) das concentrações do heme microsomal.

Srivastava *et al.* (1991) determinaram os níveis totais de CYP e a atividade da anilina hidroxilase, aminopirona-*N*-desmetilase e benzo[*a*]pireno hidroxilase na fração microsomal hepática de camundongos infectados com *P. berghei*. Os autores notaram que nos animais infectados, com parasitemia superior a 50%, havia uma redução dos níveis totais de CYP e da atividade das três monooxigenases enquanto, por outro lado, as concentrações do heme microsomal estavam (4 vezes) aumentadas. Um grupo adicional de camundongos infectados com *P. berghei*, que foi tratado por via oral com cloroquina (16 mg/kg peso corporal/dia por 4 dias), exibiu melhora clínica com drástica redução da parasitemia em 72 horas e retorno das atividades das monooxigenases aos níveis registrados nos controles não-infectados uma semana após o término do tratamento com o anti-malárico.

Mansor *et al.* (1991_a) compararam a eliminação urinária da antipirina em ratos com malária (*P. berghei*) com os controles não infectados. Os autores verificaram que os primeiros (infectados) apresentavam níveis mais elevados do fármaco não-transformado e concentrações menores dos metabólitos da antipirina (3-hidroximetilantipirina e 4-hidroxiantipirina) na urina o que, segundo eles, indicaria que a malária prejudica a formação dos metabólitos analisados. Em outro trabalho, Mansor *et al.* (1991_b) examinaram a possibilidade da febre, induzida pela endotoxina de *E. coli* em ratos, afetar a farmacocinética da quinina e da quinidina, o que poderia explicar os efeitos observados na malária. Neste estudo, os pesquisadores encontraram um aumento da depuração dos dois fármacos e observaram que os níveis totais de CYP permaneciam inalterados no fígado dos ratos febris (*i.e.*, tratados com a endotoxina). Os autores comentam que esses resultados (depuração aumentada) poderiam fornecer uma explicação para a ausência de eventos tóxicos sérios durante o tratamento da malária com quinina e quinidina. É bom ressaltar, entretanto, que esses resultados, por exemplo, sobre os níveis totais de CYP, provavelmente, se deveram à dose ou ao intervalo entre a injeção e a morte dos ratos, já que é hoje bem conhecido que o LPS deprime CYPs hepáticos em roedores (Sewer e Morgan, 1998).

Kokwaro *et al.* (1993_a) estudaram os níveis totais de CYP e a metabolização da fenacetina em paracetamol em microsomos hepáticos de ratos Wistar jovens (machos com 4 semanas) infectados com *P. berghei* e respectivos controles não-infectados. Os níveis totais de CYP apresentaram redução de 20% nos ratos com parasitemia baixa (9,87%) e de 50% naqueles com parasitemia alta (36,6%). A atividade da fenacetina-*O*-desetilase (catalisada por CYP1A2) foi reduzida nos ratos infectados, sendo o efeito mais acentuado no grupo com parasitemia alta. Nesse estudo, a depressão da concentração total de CYP e da atividade da fenacetina-*O*-desetilase foi observada também no fígado de ratos de um grupo não infectado que foi tratado com endotoxina de *E. coli*.

Em outro artigo publicado no mesmo ano, Kokwaro *et al.* (1993_b) descreveram os efeitos da malária causada pelo *P. berghei* em ratos Wistar machos e jovens sobre a depuração da antipirina e do metronidazol (administrados conjuntamente em um coquetel). Os autores não observaram alteração da depuração da antipirina, mas constataram uma redução de 20%, comparado aos controles não infectados, na depuração do metronidazol, em decorrência da diminuição da formação do metabólito primário (hidroximetronidazol). Considerando os resultados dos dois estudos, Kokwaro *et al.* (1993_b) sugerem que os efeitos da malária deprimindo CYP são isoenzima específicos (*i.e.*, a malária deprimiria CYP1A2 - fenacetina-*O*-desetilase - e outras isoformas envolvidas na hidroxilação do metronidazol, mas não afetaria as enzimas responsáveis pelo metabolismo da antipirina). Os resultados de Kokwaro *et al.* (1993_b) em relação à antipirina, entretanto, não são consistentes com os de Mansor *et al.* (1991_a) que foram anteriormente citados. Ainda nesta linha que identificou efeitos isoenzima-específicos da infecção, um outro trabalho do mesmo grupo (Glazier *et al.*, 1994) verificou que a malária (*P. berghei*) reduzia a depuração da etoxiresorufina, mas não alterava o do metoprolol em ratos infectados, tanto no grupo com alta parasitemia, como naquele com parasitemia baixa, em relação aos controles não infectados.

Song *et al.* (1995) submeteram duas linhagens (sensível e resistente à cloroquina) de *P. berghei* (estágio eritrocítico) a uma dose de radiação gama de 15 kilorads e, em seguida, as inocularam em camundongos. A inoculação de parasitas da linhagem resistente deu origem a parasitemias de 12,5%, mas os parasitos da linhagem sensível foram mortos pela irradiação. Os autores observaram redução dos níveis totais de CYP e da atividade da benzo[*a*]pireno hidroxilase no fígado dos camundongos infectados com o *P. berghei* irradiado.

Leo *et al.* (1997) estudaram a farmacocinética do arteether em ratos infectados com *P. berghei* e verificaram que a desetilização do composto, produzindo o metabólito primário dihidropqinghaosu (DQHS), estava diminuída nos microsomos hepáticos dos ratos infectados em relação aos controles não-infectados.

Srivastava *et al.* (1997) infectaram camundongos suíço albinos com *P. yoelii* e avaliaram os efeitos da infecção sobre os níveis de citocromo P450 e a atividade da glutathione *S*-transferase (GST) nas frações microsomal e mitocondrial hepáticas. Em ambas as frações, os autores encontraram uma diminuição das concentrações de CYP e da atividade da GST nos infectados em relação aos controles. A infecção, por outro lado, aumentou consideravelmente os níveis do heme e da hemozoína nas duas frações.

Uhl *et al.* (1999), em estudo realizado com ratos machos Sprague-Dawley de seis semanas de idade infectados com *P. berghei*, evidenciaram uma diminuição dos níveis totais de CYP e da atividade da NADPH redutase, bem como da atividade de CYP3A2 (testosterona 6- β -hidroxilase) nos microsomos hepáticos dos animais infectados. A avaliação da expressão da proteína CYP3A2 por *immunoblotting* confirmou o que havia sido observado com o ensaio da atividade enzimática. O mesmo ocorreu em relação à ausência de efeitos da malária sobre a isoforma CYP2E1: a atividade da 6-hidroxilação da clorzoxazona não estava alterada e o *immunoblotting* não revelou diferença entre infectados e controles.

Srivastava e Pandey (2000) descreveram que em camundongos suíço albinos infectados com *P. yoelii*, ocorria uma redução dos níveis totais de CYP nas frações mitocondrial e microsomal hepáticas, sendo a redução mais acentuada na primeira. Os autores também verificaram que nos infectados, havia um aumento dos níveis de heme e hemozoína nas duas frações. Foi constatado ainda que o tratamento dos camundongos infectados com pirimetamina por via oral (10 mg/kg peso corporal/dia por 4 dias) revertia quase totalmente a depressão dos níveis de CYP, mas não alterava a concentração de heme e hemozoína nas duas frações.

A análise de enzimas metabolizadoras de drogas nos microvasos cerebrais de camundongos infectados com *P. yoelii nigeriensis* é descrita por Agrawal (2005). Em estudo singular, o autor demonstra que há uma depressão das atividades de hidroxilação do benzo[*a*]pireno, da desmetilação da aminopirona e da hidroxilação da anilina no tecido cerebral dos animais maláricos quando comparados ao tecido normal.

Além dos estudos anteriormente citados, que focalizaram principalmente as alterações do metabolismo mediado por CYP, encontramos dois outros trabalhos que analisaram os efeitos da malária sobre as enzimas de conjugação.

Murdoch *et al.* (1992) analisaram as vias de conjugação do fenol (*ex vivo*) em preparação que envolvia a perfusão de fígado isolado de ratos Sprague Dawley infectados com *P. berghei* ANKA (obtidos duas semanas após a infecção) e dos respectivos controles não infectados. Os autores relataram que a malária não afetou a conjugação com sulfato e a glicuronidação em baixas concentrações de substrato. Em altas concentrações de substrato,

entretanto, a malária prejudicou a glicuronidação. Os autores salientaram que esta redução pode ter sido devida à menor disponibilidade do co-substrato UDPGA (ácido uridina-difosfoglicurônico) nos ratos infectados, porque os níveis hepáticos de UDPGA dependem da disponibilidade de glicogênio que, como outros estudos demonstraram, estaria diminuída na malária.

Ismail *et al.* (1992) estudaram os efeitos da malária sobre a atividade da UGT em microsomas hepáticos de ratos usando 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) e paracetamol como substratos. Os ratos foram infectados com *P. berghei* e mortos em dois momentos, um de parasitemia baixa (10-20%) e outro de parasitemia alta (25-35%). A malária prejudicou a glicuronidação do AZT e do paracetamol, sendo a intensidade do efeito relacionada ao nível da parasitemia.

Os estudos das alterações das enzimas da biotransformação na malária em roedores estão resumidos no Quadro 1.1.

1.3.3.2 Alterações na malária humana

Alguns estudos clínicos sugerem que a malária humana também altera o metabolismo e a cinética de xenobióticos.

O estudo de Trenholme *et al.*, publicado em 1976, foi um dos primeiros a constatar que a malária alterava a cinética de fármacos em seres humanos. Em ensaio clínico, os autores investigaram a cinética da quinina em cinco indivíduos saudáveis, antes e depois deles serem infectados com uma linhagem de *P. falciparum* resistente à cloroquina. Em todos os indivíduos, a infecção aumentou os níveis plasmáticos de quinina e a razão entre a concentração de quinina e os níveis de “quinina mais metabólitos” o que, segundo os pesquisadores, sugeria que a malária prejudicava o metabolismo hepático da quinina.

Posteriormente, Supanarond *et al.* (1991) avaliaram a depuração sistêmica da quinina (sulfato de quinina 10 mg/kg por via oral) em 15 pacientes adultos com malária não complicada, causada pelo *P. falciparum*, e verificaram que a depuração do fármaco durante a fase aguda da doença foi menor do que a depuração no período de convalescença. Um estudo clínico subsequente mostrou que a depuração da primaquina também estava diminuída nos pacientes com malária falciparum (Edwards *et al.*, 1993). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores tailandeses analisou, em 12 pacientes com malária falciparum grave ou moderadamente grave, a depuração da quinina, da dihidroquinina (impureza presente em formulações comerciais de quinina), da antipirina (marcador da atividade de CYPs hepáticos), do verde de indocianina (ICG, medida do fluxo sanguíneo hepático) e do iotalamato (medida da taxa de filtração glomerular), e relacionou estes parâmetros com a biotransformação da

quinina no metabólito ativo, 3-hidroxiquinina (Pukrittayakamee *et al.*, 1997). Os autores constataram que, durante a fase aguda da malária, a depuração da quinina, da antipirina e do ICG, assim como a biotransformação da quinina em 3-hidroxiquinina estavam diminuídas em relação ao observado nos mesmos pacientes no período de convalescença. A média das razões entre a AUC (área sob a curva) da quinina e a AUC da 3-hidroxiquinina foi 12,03 durante a malária aguda e 6,92 na convalescença ($P=0,01$), o que traduz a maior lentidão da conversão do fármaco em seu metabólito primário durante a fase aguda da doença (Pukrittayakamee *et al.*, 1997). Os autores concluem que a redução da depuração da quinina na fase aguda da malária falciparum resulta, predominantemente, de uma alteração (depressão) da atividade das CYP hepáticas, particularmente da CYP3A. Como a quinina e a 3-hidroxiquinina são ativos, os pesquisadores destacam ainda que, enquanto o metabólito primário contribuiria para aproximadamente 5% da atividade antimalárica do medicamento na fase aguda, esta contribuição poderia ser de até 10% na convalescença.

Akinyinka *et al.* (2000) estudaram, comparativamente, a cinética de uma dose oral única de cafeína (300 mg) em um grupo de 10 nigerianos adultos com malária falciparum e em um outro grupo controle de 10 indivíduos saudáveis. A concentração plasmática máxima da cafeína (C_{max}) foi semelhante nos dois grupos, mas a C_{max} do metabólito paraxantina foi menor nos pacientes com malária. A razão das AUCs paraxantina:cafeína nos pacientes foi menor do que a razão nos indivíduos saudáveis. Como a conversão da cafeína em seu metabólito paraxantina é catalisada por CYP1A2, estes resultados indicaram que a atividade desta isoforma hepática estava deprimida nos pacientes com malária falciparum.

Os estudos clínicos anteriormente citados indicam, claramente, que durante a malária falciparum em seres humanos há uma depressão do metabolismo de xenobióticos mediado por isoformas CYP hepáticas. Assim, em que pese as diferenças entre a malária humana e os modelos experimentais da doença em roedores, os estudos clínicos sugerem que a depressão de CYP, constatada em ratos e camundongos, ocorre também em pacientes. Os dados de estudos clínicos mostram também que, pelo menos no que tange à infecção com *P. falciparum*, as alterações do metabolismo e da cinética de xenobióticos causadas pela malária podem ter repercussões relevantes em termos do tratamento farmacológico da doença.

Quadro 1.1. Estudos em roedores sobre a modulação das enzimas hepáticas de metabolização de xenobióticos

Hospedeiro			Parasita (<i>Plasmodium</i>)		Dia após a infecção	Parasitemia (%HP)	Efeito sobre en
Espécie/linhagem	Sexo	Idade	Espécie	Inóculo			
Rato			<i>P.berghei</i>		1 a 8		↓ metabolismo etilnitroanisol; ↑ sono
Camundongo NMRI, A/J		jovem	<i>P.berghei</i>				↓ 30-40% CYP-t, E
Camundongo/albino			<i>P.yoelii nigeriensis</i>			80%	↓ CYP-t, AH, AMI
Rato (órgão isolado)		5-7 sem	<i>P.berghei</i>	10 ⁶ HP	14	3-35%	↓ eliminação pirim
Camundongo			<i>P.berghei</i>		7	60%	↓ CYP-t, AH, AMI
Rato SD	M	5-8 sem	<i>P.berghei</i>	10 ⁶ HP	5	25-40%	↓ eliminação parac
Rato SD	M	5-8 sem	<i>P.berghei</i>	10 ⁶ HP	5	25-30%	↓ eliminação antipti
Rato Wistar	M	4-sem	<i>P.berghei</i>		7	Baixa<20% Alta>20%	Desetilação da fena Baixa e Alta
Rato Wistar	M	4 sem	<i>P.berghei</i>		7		↓ eliminação metro
Rato			<i>P.berghei</i>				EROD: ↓ Baixa e / Metoprolol: inalter:
Camundongo			<i>P.berghei</i> irradiado			12,5%	↓ CYP-t, BPH; ND
Rato			<i>P.berghei</i>				↓ metabolismo do ε
Camundongo Swiss			<i>P.yoelii</i>			1-2%	↓ CYP-t, cit b5, GS
Rato	M	6 sem	<i>P.berghei</i>	2x10 ⁵ HP	9-12	28% (9-65%)	↓ 56% CYP-t, 32% ↓ 41% Test6βH
Camundongo			<i>P.yoelii</i>				↓ CYP-t mitocondr
Camundongo Swiss Webster	M	6-8 sem	<i>P.berghei</i> ANKA	10 ⁶ HP	9-20	>30%	↓ EROD, BROD, F RNA CYP 1A2, 2E ↑ sono midazolam

1.4 Evidências da regulação da transcrição gênica de CYP por estímulos inflamatórios

Teoricamente, as infecções e estímulos inflamatórios poderiam modular (deprimindo ou induzindo) a atividade das enzimas de biotransformação de xenobióticos atuando em um ou em mais de um dos níveis que se seguem: regulação (positiva ou negativa) da transcrição, estabilização/degradação do mRNA, alteração da tradução, aceleração/retardo da degradação da proteína e modificação da atividade catalítica da enzima. Nos últimos anos, entretanto, evidências tem sido apresentadas sugerindo que estímulos inflamatórios (*e.g.*, LPS) poderiam regular a transcrição de genes de enzimas de biotransformação, particularmente de algumas isoformas CYP. Apresentaremos a seguir, de forma sucinta, alguns mecanismos de regulação da transcrição de genes de isoformas CYP e os mecanismos pelos quais os estímulos inflamatórios poderiam alterar a transcrição desses genes.

1.4.1 Mecanismos envolvidos na regulação da transcrição dos genes CYP

1.4.1.1 Receptor Ah (AhR)

O receptor Ah (*aryl hydrocarbon receptor*, AhR) é uma proteína citoplasmática ativada por ligantes que regula a transcrição do gene *CYP1A1*. No citoplasma, o AhR não-ligado está associado à proteína de choque térmico Hsp90 (*heat shock protein*). A interação com ligantes leva à dissociação da Hsp90 do complexo (*i.e.*, à ativação do receptor Ah) e à translocação do AhR ativado para o núcleo da célula. O AhR dimeriza-se com a proteína Arnt (*AhR nuclear translocator*) formando, então, o complexo AhR-Arnt (heterodímero) no núcleo. Este complexo interage com elementos responsivos à xenobióticos (XREs) e após o recrutamento de co-ativadores e fatores gerais de transcrição, promove a transativação (ativação da transcrição) do gene alvo (Ke *et al.*, 2001; Safe, 2001; Schmidt e Bradfield, 1996). O heterodímero AhR-Arnt, portanto, altera a expressão dos genes controlados por promotores XRE, entre os quais estão o gene *CYP1A1* e outros genes responsivos ao AhR, como o *CYP1A2* e o *CY1B1*. O AhR é expresso em todos os tecidos humanos, sendo a expressão maior na placenta e nos pulmões, órgãos que exibem acentuada indução de *CYP1A1* em resposta a ligantes de AhR. A atividade transcricional de AhR é estimulada pela interação do receptor com os co-ativadores p160, p300/CBP (*p300/CREB binding protein*) e SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) (Ke *et al.*, 2001; Kollara e Brown, 2006).

Recentemente, Arpiainen *et al.* (2005) demonstraram, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, que os ligantes do receptor Ah são capazes de regular também a transcrição do gene *CYP2A5*. Neste estudo, Arpiainen *et al.* (2005) usaram camundongos DBA-2 e C57BL/6, que expressam *CYP2A5*, mas diferem geneticamente quanto à funcionalidade do AhR. A

linhagem DBA-2 exibe uma alta expressão constitutiva de *CYP2A5*, mas é fracamente responsiva à indução por ligantes AhR (*e.g.*, β -naftoflavona).

A análise da região reguladora 5' do *CYP2A5* para possíveis sítios de ligação ao AhR revelou um único sítio capaz de interagir com o heterodímero AhR/ARNT. A extensão da indução de *CYP2A5* por intermédio de AhR é modesta comparada à indução da família CYP1, mas inclui o *CYP2A5* no grupo de genes regulados por este receptor.

1.4.1.2 Receptor PXR

O receptor PXR, membro da família de receptores nucleares NR1I, está presente no citosol associado à proteína CCRP (*Cytoplasmic CAR Retention Protein*), formando um complexo. Quando o ligante interage com o complexo, o PXR se dissocia e é translocado para o núcleo da célula onde se associa ao receptor nuclear RXR, formando o heterodímero PXR-RXR. O complexo PXR-RXR, por sua vez, liga-se aos XREs da região promotora e ativa a transcrição gênica do gene alvo. O receptor PXR participa da regulação de alguns genes da subfamília CYP3A por xenobióticos, e também dos genes de proteínas transportadoras transmembrana (proteínas de resistência a múltiplas drogas), como *MDR1* e *MRP2*, e de genes de enzimas da fase 2, como os das isoformas GST e UGT (Gu *et al.* 2006). Além de participar da regulação de enzimas do metabolismo de xenobióticos, o receptor PXR parece estar envolvido na regulação de enzimas importantes para a eliminação do colesterol, embora nenhum ligante fisiológico (endógeno) do PXR envolvido na modulação desta via metabólica tenha sido identificado até agora.

Em seres humanos, o PXR é encontrado sobretudo no fígado, mas também nos testículos e tecidos embrionários, enquanto no camundongo o receptor só foi identificado no fígado e no trato gastrointestinal (TGI). Os ligantes do receptor PXR já identificados incluem esteróides de ocorrência natural, como progesterona e corticosterona, a hiperforina encontrada na erva de São João, a dexametasona e o taxol, além de outros. Devido à diferença de seletividade para as substâncias químicas entre as espécies foi observado, por exemplo, que a pregnenolona-16 α -carbonitrila (PCN) liga-se ao PXR de roedores, enquanto a rifampicina e o SR12813 ligam-se ao receptor PXR humano. Recentemente, foram identificados muitos cofatores transcricionais do PXR, como os membros da família p160 de co-reguladores (Timsit e Negishi, 2007).

1.4.1.3 Receptor CAR

O receptor CAR (*constitutive active/androstane receptor*), tal como PXR, pertence à subfamília de receptores nucleares NR1I. No citoplasma, o CAR está associado às proteínas CCRP e Hsp90. Após interagir com o ligante, o receptor CAR dissocia-se das proteínas chaperonas citoplasmáticas e é translocado para o núcleo onde forma um complexo com o receptor RXR. A ligação do CAR ao PBREM (*phenobarbital responsive enhancer module*) na região promotora leva a ativação da transcrição de genes de isoformas da subfamília CYP2B (Timsit e Negishi, 2007). Foram identificados até agora vários co-ativadores transcricionais para CAR, como PGC-1 (*peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta*), SRC-1, Sp1 e ASC-2, entre outros (Timsit e Negishi, 2007).

O CAR é expresso primariamente no tecido hepático e renal e também, em menor escala, no trato gastro-intestinal (TGI) e no coração de camundongos, e no cérebro humano. O CAR está envolvido na regulação de genes da subfamília CYP2B, sendo o fenobarbital (PB) o ativador mais conhecido deste receptor. Entretanto, substâncias que ativam o receptor CAR também são indutores, embora em menor grau, do CYP2A5 murino (Simonsson *et al.*, 2006). Nesta linha de investigação, Itoh *et al.* (2006) demonstraram que substâncias que ativam os receptores PXR e CAR, como a rifampicina e o fenobarbital, aumentam os níveis do mRNA de CYP2A6 (ortólogo de CYP2A5) em hepatócitos humanos. Foi demonstrado também que o Wy14,643, ligante do receptor PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), aumenta os níveis do mRNA de CYP2A5 hepático (Cai *et al.*, 2002).

Em trabalho recém-publicado, Moreau *et al.* (2008) demonstraram que a ativação dos receptores CAR e PXR altera o metabolismo dos lipídeos, a homeostase da glicose e a inflamação, interferindo com os co-ativadores HNF-4 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 4 α*), FoxO1 e FoxA2 - *forkhead transcription factors*, da família de fatores de transcrição foxo - PGC-1 α e com a subunidade p65 do fator nuclear-kappa B (NF- κ B). Entre as substâncias que interagem com CAR os autores somam aos já citados, os esteróides, como 3 α ,5 α -androstanol, os ácidos retinóicos, o clotrimazol, a clorpromazina e os hidrocarbonetos, como o 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benzeno (TCPOBOP), ligante específico do CAR de camundongos, e o 6-(4-clorofenil)imidazol[2,1-b][1,3]tiazol-5-carbaldeído-*O*-(3,4-diclorobenzil)oxima CITCO), ligante específico do CAR humano, e vários outros.

1.4.2 Regulação da transcrição de CYP por estímulos inflamatórios

A depressão das atividades e dos níveis das proteínas CYP por estímulos inflamatórios (*e.g.*, LPS), frequentemente, é acompanhada pela supressão do respectivo mRNA, cuja rapidez e magnitude sugerem que o mecanismo primário envolvido nessa resposta ocorra ao

nível transcricional. A indução menos frequentemente observada em infecções e na inflamação poderia ocorrer por aumento da transcrição.

Há indícios de que esses mecanismos transcricionais possam diferir, dependendo do tipo de estímulo inflamatório, do gene específico envolvido e do momento em que o efeito é avaliado após o estímulo inflamatório. Há relatos da participação dos fatores de transcrição C/EBP (CCAAT *enhancer binding protein*), HNF (fator nuclear de hepatócitos) e NF- κ B na depressão ou indução das enzimas citocromo P450.

1.4.2.1 Regulação mediada pelo NF- κ B

O fator nuclear-kappaB é um fator de transcrição com funções pleiotrópicas presente nas células do sistema imune e em muitos outros tipos celulares. Este fator de transcrição tem papel importante na regulação de processos fisiológicos, como nas respostas imunes, nas reações inflamatórias, na proliferação celular, na apoptose e em processos envolvidos no desenvolvimento. O LPS e as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucina-1 β , são indutores de NF- κ B, que ativado em resposta aos estímulos, promove a depressão de receptores nucleares/esteroidais e a ativação transcricional de várias citocinas pró-inflamatórias (Gu *et al.*, 2006).

Uma interação física entre as vias do AhR e do NF- κ B foi sugerida por Tian *et al.* (1999). Os autores observaram que o TCDD e a β -naftoflavona (BNF), conhecidos ligantes de AhR, suprimiam a ativação do NF- κ B. O TCDD tem alta afinidade pelo receptor Ah e leva à potente indução de CYP1A. A IL-1 β , por outro lado, ativa o NF- κ B e suprime a indução de CYP1A provocada pelo TCDD em hepatócitos em cultura. Baseados nessas observações em ensaios *in vitro*, os autores sugeriram que há interação física entre os dois receptores com conseqüente repressão mútua de atividade: indução de AhR pelo TCDD reprimiria NF- κ B, enquanto a indução de NF- κ B pela IL-1 β reprimiria AhR. Esse tipo de interação (repressão recíproca) poderia explicar a supressão de CYP1A pelas citocinas nos processos inflamatórios.

Seguindo essa mesma linha de raciocínio, Ke *et al.* (2001) demonstraram que o NF- κ B inibia a acetilação da histona H4 na região promotora de *CYP1A1*, suprimindo a transcrição do gene. As histonas são proteínas que compõem a cromatina e atuam como a matriz onde o DNA se enrola. As histonas ligam-se ao DNA e exercem um papel importante na regulação dos genes. A acetilação da histona permite o desenrolamento do DNA, o que remodela a cromatina, facilitando o acesso dos fatores de transcrição à região promotora do gene no DNA, o que favorece a transcrição. Os autores mostraram, em cultura de células de hepatoma, que o NF- κ B desempenhava um papel importante na supressão de *CYP1A1* pelo TNF- α e

LPS, e também que o TNF- α inibia a acetilação da histona, o que poderia explicar a inativação da região promotora do gene *CYP1A1*. Os pesquisadores demonstraram ainda que os co-reguladores da transcrição p300/CBP e SRC-1 funcionavam, individual e cooperativamente, revertendo os efeitos do TNF- α e LPS sobre o gene relator ativado pelo AhR nas células em cultura. Essas observações sugeriram aos autores que os dois co-reguladores funcionavam como os integradores comuns das duas vias e mediavam as interações cruzadas entre NF- κ B e AhR.

Gu *et al.* (2006) investigaram a participação do NF- κ B na regulação negativa de *CYP3A4* pelo LPS. Os autores estudaram a regulação da transcrição ao nível do receptor PXR em cultura de células HepG2 exposta ao LPS. Em estudos anteriores havia sido demonstrado que o receptor RXR (parceiro de PXR no heterodímero) interagia com o NF- κ B. Neste sistema celular *in vitro*, os pesquisadores verificaram que o LPS e TNF- α ativavam o NF- κ B, e que esta ativação coincidia com a regulação negativa de *CYP3A4* em hepatócitos humanos. A repressão da ativação da região promotora de *CYP3A4* causada pelo LPS e pelo TNF- α foi revertida pelo SRI κ B, super-repressor de NF- κ B, o que demonstrou o envolvimento específico de NF- κ B. Gu *et al.* (2006) também observaram que a translocação do NF- κ B (ativado pelo LPS) para o núcleo desfazia a interação do complexo PXR-RXR α com a região promotora do gene *CYP3A4*. A depressão do *CYP3A4* mediada pelo NF- κ B, tal como proposto por Gu *et al.* (2006) está representada no esquema abaixo (Figura 1.3), onde a RIF (rifampicina), indutor clássico de *CYP3A4*, é deslocada pelo NF- κ B, cuja associação à parte RXR do complexo no núcleo da célula, impediria a ligação do complexo PXR-RXR à região promotora do gene *CYP3A4*, suprimindo a transcrição.

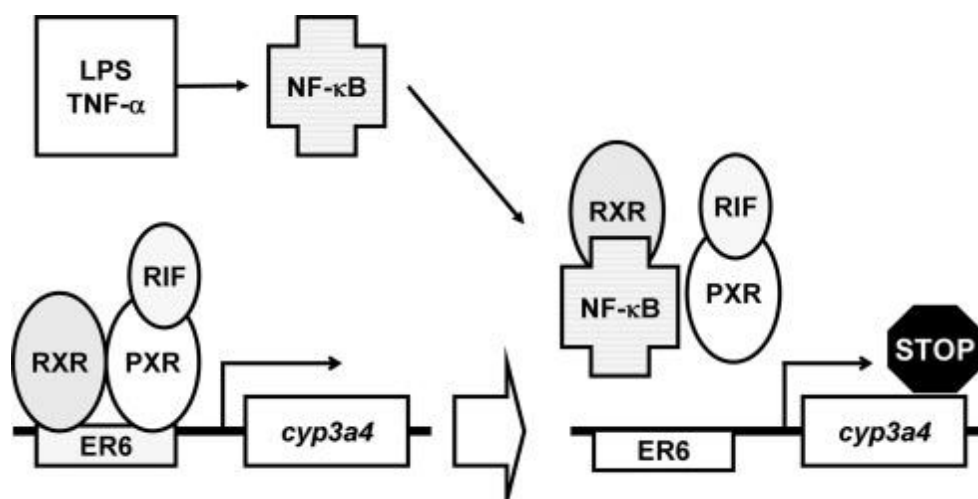


Figura 1.3 Representação esquemática do mecanismo de regulação negativa do gene *CYP3A4* mediado pela ativação do NF- κ B pela endotoxina (LPS) e pelo TNF- α . Reproduzido de Gu *et al.* (2006).

Zhou *et al.* (2006) demonstraram que drogas que ativam o receptor PXR suprimem a expressão dos genes alvo do fator nuclear de transcrição NF- κ B, como *COX2* (gene da enzima ciclooxigenase 2, *cyclooxygenase-2*), *TNFA* (gene do fator de necrose tumoral α , *tumor necrosis factor-alpha*), *ICAM1* (gene da molécula de adesão intercelular 1, *intercellular adhesion molecule 1*) e várias interleucinas. Nesta mesma linha, Moreau *et al.* (2008) sugeriram a participação do NF- κ B na inflamação que resulta da ativação do PXR provocada por substâncias químicas. O esquema abaixo representa o mecanismo proposto por ambos os autores para a repressão mútua entre os dois receptores que ocorre na inflamação. No esquema (Figura 1.4), as setas representam a ativação e a barra horizontal indica a repressão. As citocinas pró-inflamatórias, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os produtos virais promoveriam a translocação do NF- κ B para o núcleo, onde o fator de transcrição regularia a expressão dos genes alvo.

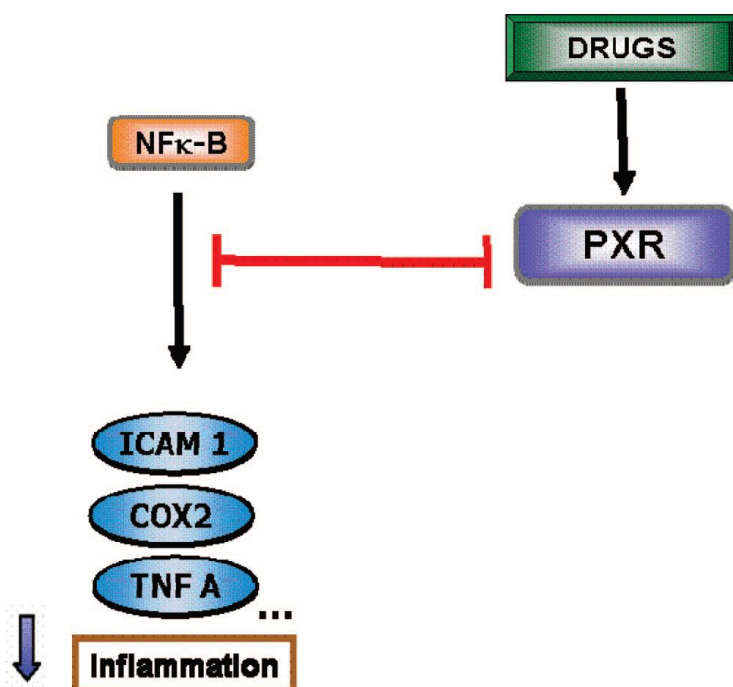


Figura 1.4 Interação cruzada entre o receptor PXR e o fator nuclear de transcrição NF- κ B na resposta inflamatória. Reproduzida de Moreau *et al.* (2008).

1.4.2.2 Regulação mediada pelos fatores de transcrição C/EBP (CCAAT *enhancer binding protein*) e pelo fator nuclear de hepatócitos (HNF) na inflamação

A resposta de fase aguda (RFA) caracteriza-se por um conjunto de alterações metabólicas e catabólicas que ocorrem nos estágios iniciais da inflamação. A RFA é uma resposta fisiológica ao trauma, à infecção ou à lesão tissular. Durante a RFA, os níveis das proteínas de fase aguda, que são sintetizados no fígado, podem estar elevados em níveis até

mil vezes maiores que os níveis basais. Os genes das proteínas de fase aguda são, em sua maioria, ativados por citocinas do tipo IL-6. Essa citocina aumenta os níveis do mRNA de um grupo de fatores de transcrição, as proteínas C/EBP, que incluem três proteínas intimamente associadas, as C/EBP α , β e δ , cuja expressão difere entre os tecidos durante a RFA.

Cantwell *et al.* (1998) relataram que a RFA, desencadeada em camundongos pela administração de LPS, deprimia os níveis dos mRNAs de C/EBP α , mas aumentava os níveis do mRNA de C/EBP β e C/EBP δ . A expressão de uma forma truncada de C/EBP β (LIP), deficiente na atividade de transativação, estava elevada na resposta inflamatória dos hepatócitos (Cantwell *et al.*, 1998). Jover *et al.* (2002) também demonstraram a participação de LIP na regulação negativa de *CYP3A4*, uma vez que este fator de transcrição antagonizou a transativação (aumento da taxa de transcrição) desencadeada pela C/EBP β de comprimento normal (LAP). Este último grupo de autores também sugeriu que a redução da razão LAP:LIP estava associada à regulação negativa de *CYP3A4* (Jover *et al.*, 2002).

Pitarque *et al.* (2005) sugeriram que o fator de transcrição C/EBP α estaria envolvido na regulação da transcrição de *CYP2A6*. Os autores observaram que o aumento da transcrição de *CYP2A6* em células de hepatoma humano era provocado pela interação do fator de transcrição C/EBP α com o fator-4 nuclear de hepatócitos (HNF-4), fator que promove a diferenciação terminal dos hepatócitos no período peri-natal. Por outro lado, a regulação negativa desta isoforma foi provocada pela superexpressão da forma deficiente de C/EBP β (LIP) (Pitarque *et al.*, 2005).

Yokomori *et al.* (1997) também atribuíram ao HNF-4 um papel na regulação da expressão dos genes *CYP2A4* e *CYP2A5* em camundongos. Jover *et al.* (2001), por sua vez, observaram que hepatócitos humanos com expressão reduzida de HNF-4 tinham níveis de mRNA de CYP deprimidos, sugerindo um papel para o HNF-4 na regulação da expressão de *CYP2A6*, *CYP3A4* e *CYP3A5*, mas não de *CYP2E1*.

A participação dos fatores nucleares dos hepatócitos na regulação de *CYP2C11*, *3A2* e *2E1* por estímulos inflamatórios foi avaliada por Cheng *et al.* (2003). Esses autores demonstraram que no fígado de ratos tratados com LPS, havia um declínio rápido e acentuado dos níveis de mRNA das isoformas CYP analisadas. A rapidez e intensidade do efeito do LPS sobre os níveis de mRNA sugeriu aos autores que essa queda seria devida à supressão da transcrição dos genes. Esse efeito depressor sobre CYP foi, aparentemente, independente da ativação do NF- κ B pelo LPS, porque foi registrado também após o tratamento dos ratos com curcumina, que é um conhecido inibidor da ativação do NF- κ B. Os pesquisadores notaram, por outro lado, uma depressão da ligação dos fatores nucleares dos hepatócitos 1 α , 3 β e 4 α (HNF1 α , HNF3 β e HNF4 α) ao DNA. Embora a depressão de cada um desses fatores

isoladamente tenha sido pequena para explicar a regulação negativa da transcrição de CYP, os autores salientam que permanece por ser examinado o papel de cada fator em conjunto com os demais.

Em conjunto, esses estudos sugerem que os fatores de transcrição C/EBP também podem estar envolvidos na regulação negativa de isoenzimas CYP durante a resposta inflamatória.

As evidências trazidas por este conjunto de estudos recentes, realizados principalmente *in vitro* com células de hepatoma transfectadas, sugerem que a ativação do fator nuclear de transcrição NF- κ B por estímulos inflamatórios pode ser um elemento chave na regulação negativa da transcrição de isoformas CYP, quer pela ligação ao RXR, levando à dissociação do heterodímero RXR-PXR, como por exemplo no caso de CYP3A4, quer pela repressão da ativação do receptor AhR, como no caso de CYP1A1. Outros fatores nucleares de transcrição podem estar envolvidos na regulação dessas e de outras isoformas, e qualquer generalização no estágio atual de conhecimento, parece prematura. A contribuição de alterações pós-transcricionais para a regulação da atividade de isoformas CYP nas infecções e na inflamação também não pode ser inteiramente descartada.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos que ocorrem durante a malária murina (fase eritrocítica) de evolução letal e não-letal. Como os resultados obtidos durante o estudo indicaram que a malária modula a expressão e a atividade de algumas monooxigenases hepáticas, investigamos também a hipótese de que essas alterações seriam mediadas pela elevação dos níveis do óxido nítrico durante a infecção.

2.2 Objetivos específicos (metas)

O estudo foi planejado e executado para alcançar as seguintes metas:

1 - Caracterizar as alterações da expressão e atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos que ocorrem em camundongos (C57BL/6 e DBA-2) com quadro grave de malária (*P. berghei* ANKA), incluindo enzimas envolvidas em reações da fase 1 (expressão de CYP1A, atividades catalíticas de CYP1A1/2, 2A5, 2B9/10 e 2E1) e da fase 2 (atividade de uridina difosfoglicuronil-transferase, UGT, e glutatona S-transferase, GST - microsomal e citosólica) e níveis da glutatona (GSH).

2 - Verificar se a toxicidade de xenobióticos (efeito genotóxico) é alterada em quadro de malária grave (*P. berghei* ANKA) murina (C57BL/6), incluindo o efeito de mutágenos diretos (etilmetanosulfonato) e indiretos que dependem de ativação metabólica por isoformas das subfamílias CYP2B e 3A (ciclofosfamida) e 1A (dimetilbenzo[a]antraceno, DMBA).

3 - Caracterizar as alterações da atividade catalítica de CYP1A1/2, 2A5 e 2B9/10 que ocorrem ao longo da evolução de infecções de camundongos (C57BL/6 e DBA-2) com parasita letal (*P. berghei* ANKA) e não-letal (*P. chabaudi chabaudi*).

4 - Investigar se a elevação dos níveis de óxido nítrico (NO) é evento necessário para a regulação da atividade catalítica de isoformas CYP1A1/2, 2A5 e 2B9/10 hepáticas na malária murina letal e não-letal e, também, para as alterações observadas em camundongos tratados com endotoxina (LPS) de *E. coli*.

5 - Verificar se a NOS2 é induzida no fígado, baço e cérebro de camundongos (C57BL/6 e DBA-2) infectados com *P. berghei* ANKA.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. – Animais

3.1.1 – Hospedeiros

Utilizamos camundongos do sexo feminino das linhagens DBA-2 e C57BL/6, livres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*), com idades entre oito e onze semanas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável, de tamanho padrão para camundongos, cujo fundo foi revestido com maravalha de pinho branco. As gaiolas com 3 a 5 animais foram mantidas em biotério de experimentação com temperatura (23 ± 2 °C), umidade relativa (aproximadamente 70 %) e ciclo claro/escuro de doze horas controlados. Os animais tiveram livre acesso à água de torneira e alimento (ração para camundongos Nuvital CR1, Nuvital®, Curitiba, PR, Brasil) durante todo o experimento. O protocolo do estudo (P-0114-02, “*Estudo das alterações da atividade e expressão de CYP 450s e da cinética de xenobióticos na esquistossomose e malária*”) foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) da instituição.

3.1.2 – Parasitas

Neste estudo, empregamos duas espécies de plasmódios que infectam roedores de laboratório; um parasita letal, *Plasmodium berghei* (ANKA) e outro não letal, *Plasmodium chabaudi chabaudi*, para os hospedeiros utilizados. Os plasmódios das duas espécies foram originalmente cedidos pelo Laboratório de Pesquisas em Malária (IOC/FIOCRUZ) e, a partir de então, mantidos no nosso laboratório em solução de Alsever e congelados a -80 °C.

3.2 – Procedimentos

3.2.1 Infecção dos hospedeiros e determinação das taxas de parasitemia

Alíquotas do sangue em solução de Alsever (contendo hemácias de camundongos parasitadas com o plasmódio), armazenadas em criotubos à -80 °C, foram descongeladas à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas (400 g por 5 minutos, em centrífuga *Eppendorf Minispin*®) e suspendidas em salina 0,85% estéril. Este processo de lavagem (centrifugação e ressuspensão) foi repetido até o desaparecimento de qualquer sinal de hemólise. Obtido o sobrenadante límpido, 200 µL deste sangue diluído em salina foram administrados por via intraperitoneal a um camundongo que seria, então, o doador empregado para a infecção dos animais do experimento.

Vinte e quatro horas após a inoculação do plasmódio no animal doador, uma gota de sangue da ponta da cauda foi retirada para fazer a distensão sanguínea e determinar a taxa de

parasitemia. Para diluir o sangue do doador, de modo a inocular no animal de experimentação o número desejado de hemácias parasitadas (HP), determinamos a hematimetria (número de hemácias por volume de sangue) em câmara de Neubauer. Os camundongos do experimento receberam por via intraperitoneal (i.p.) 200 µL do sangue do doador diluídos em tampão fosfato de potássio, PBS, de modo a conter 10⁶ HP (*P. berghei*) ou 10⁷ HP (*P. c. chabaudi*).

As lâminas das distensões sanguíneas foram preparadas a partir de uma gota de sangue retirada da ponta da cauda do animal infectado. As lâminas foram coradas com o kit de corantes Panóptico Rápido. Pelo menos mil células foram examinadas em diferentes campos para determinação da taxa de parasitemia (%HP = (No. hemácias parasitadas / No. total de hemácias) x 100).

3.2.2 – Tratamentos com lipopolissacarídeo de *E. coli* e aminoguanidina

O LPS foi administrado por injeção intraperitoneal. Em todos os casos, foi utilizado o LPS (endotoxina) de *Escherichia coli* sorotipo 0127:B8 adquirido da *Sigma Chemical Co.* St Louis, EUA.

A endotoxina foi preparada como solução estoque de 50 mg/mL em salina 0,9% estéril. A solução foi levada ao ultra-som por trinta minutos, aliquotada em tubos tipo *ependorf* e congelada a – 20 °C. No momento de uso, a solução estoque foi diluída em salina 0,9% estéril para obter as doses desejadas, levada ao ultra-som por trinta minutos e administrada pela via i.p. aos animais.

A aminoguanidina, inibidor seletivo da NO sintase induzível (NOS2 ou iNOS), foi comprada da *Sigma Chemical Co.*, St Louis, EUA. O veículo da aminoguanidina foi o PBS e o volume injetado foi 200 µL por camundongo. As doses foram 50 e 100 mg/kg por via i.p., em administração única. Em alguns experimentos, os camundongos receberam também aminoguanidina na água de beber, 4 mg/dL, durante as vinte e quatro horas que antecederam a eutanásia.

3.2.3 – Eutanásia, coleta de sangue e remoção de órgãos dos camundongos

Os camundongos foram mortos por deslocamento cervical. Após a morte do animal, o baço e o fígado e, em alguns casos o cérebro, foram rapidamente removidos, postos em placas de Petri de vidro, resfriadas e mantidas sobre gelo em escamas contido em caixa de isopor, e pesados. O fígado foi, em seguida envolto em folha de alumínio, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em congelador de temperaturas ultra-baixas até o momento em que foram feitas as preparações hepáticas (microssomal ou citosólica). Os fragmentos de órgãos para o RT-PCR foram postos em criotubos *Nalgene*®, com fundo levemente côncavo e tampa de rosca que não permitia a penetração do nitrogênio. Os criotubos foram armazenados no congelador de temperaturas ultra-baixas à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O sangue para determinação dos níveis de óxido nítrico e atividade de transaminases foi coletado do plexo peri-orbitário imediatamente antes da morte por deslocamento cervical. O soro foi separado por centrifugação a 5.000 rpm durante vinte minutos em centrífuga *ependorf Minispin*®. As amostras de soro foram acondicionadas em tubos próprios para criogenia e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

3.2.4 – Preparação das frações subcelulares do tecido hepático

Fração microssomal I (Atividades catalíticas de CYP e UGT, e *immunoblotting*)

A fração microssomal hepática foi preparada como descrito por De-Oliveira *et al.* (1997). Para o preparo da fração microssomal, os fígados foram retirados do *freezer* $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e degelados 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 15 mL, sendo homogeneizados em um volume de solução tampão tris 100 mM com KCl 150 mM pH 7,4, 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 centrífuga e centrifugado em centrífuga *Eppendorf 5804R* a 9.000 X g por trinta minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 X g por uma hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ultracentrífuga *Hitachi CP70MX*®.

Após a primeira ultracentrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi homogeneizado - com o mesmo tampão usado para a primeira homogeneização - a uma velocidade de 250 rpm. As amostras foram submetidas, então, a uma segunda ultracentrifugação a 100.000 X g por uma hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O sedimento obtido foi suspenso em solução tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4. Após a completa ressuspensão do

sedimento, as amostras foram aliquotadas em tubos para criogenia e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer – 80 °C até o momento de uso.

Fração Microssomal II (Atividade da GST microssomal)

O preparo da fração microssomal para determinar a atividade da GST ligada ao retículo endoplasmático seguiu o procedimento da preparação microssomal convencional, exceto pelo fato de que seguimos a recomendação de Fowler *et al.* (1994) (*i.e.*, usamos tampão Tris 150 mM com pH 8,0) para eliminar a contaminação citosólica.

Fizemos, então, três lavagens em pH alcalino, centrifugando em centrífuga *Hitachi CP70MX*[®] a 100.000 X g durante uma hora a 4 °C. Após a terceira ultracentrifugação, o sedimento foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4.

As amostras foram, então, aliquotadas em tubos para criogenia e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer – 80 °C até o momento de uso.

Fração Citosólica (Atividade de GST citosólica)

A fração citosólica do fígado dos animais foi preparada segundo o método relatado por Abel *et al.* (2004), como descrito a seguir.

O fígado congelado a – 80 °C foi mantido sobre o gelo, em placa de Petri, e lavado com solução salina 0,9%. O órgão foi seco com papel de filtro e após registrado o peso, foi levado ao homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem* com capacidade para 15 mL, contendo um volume de tampão Tris 10 mM pH 7,4 com sacarose 250 mM, ditioneitol (DTT) 0,2 mM e EDTA 1 mM correspondente a uma vez e meia o peso do órgão. O tecido foi submetido a movimentos de rotação do pistilo a 1.200 rpm até a sua completa homogeneização. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 X g por dez minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi, então, centrifugado a 15.000 X g por vinte minutos a 4 °C. Ambas as centrifugações foram realizadas em centrífuga *Eppendorf 5804 R*. O sobrenadante obtido foi filtrado em gaze e submetido a uma centrifugação a 105.000 X g por uma hora a 4 °C em ultracentrífuga *Hitachi CP70MX*[®]. O sobrenadante foi aliquotado em tubos para criogenia e congelado em nitrogênio líquido ou freezer – 80 °C até o momento das análises.

3.2.5 - Quantificação de proteínas nas frações subcelulares.

A quantificação de proteínas nas frações citosólica e microssomal foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976). Albumina sérica bovina (BSA) foi usada

como padrão e a solução tampão empregada foi a de fosfato de potássio monobásico 50 mM e NaCl 150 mM pH 7,2.

O método foi adaptado para leitora de microplacas (espectrofotometria), 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 feita a 595 nm em espectrofotômetro para microplaca modelo *Spectramax Plus (Molecular Devices®)*, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh®* e *Windows®*.

3.2.6 – Determinação das atividades enzimáticas

3.2.6.1 Reações de monooxigenação:

Alcoxi-resorufina-*O*-desalquilases (XROD): EROD e BROD

Preparação dos substratos (etoxiresorufina e benziloxiresorufina)

A etoxiresorufina e a benziloxiresorufina foram pesadas (2 mg) em balança de quatro casas decimais. As soluções estoque dos substratos foram feitas em capela química, como descrito a seguir.

Foram adicionados 2 mL de clorofórmio ao recipiente contendo o substrato. A solução foi distribuída em frascos de vidro com capacidade para 1 mL (os frascos foram recobertos individualmente com folha de papel laminado para mantê-los ao abrigo da luz), de modo a obter em cada frasco 60,35 µg ou 75,85 µg de etoxiresorufina ou benziloxiresorufina, respectivamente. O clorofórmio foi evaporado. Os tubos foram fechados e armazenados 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 1 mM. Em seguida, a solução de substrato em DMSO (1 mM) foi diluída para 30 µM com uma solução tampão K₂HPO₄ 50 mM pH 7,8 (solução de uso no ensaio) para ser adicionada à microplaca. A solução assim obtida foi agitada no vortex para que obtivéssemos uma solução completamente homogênea.

Ensaio em microplaca

As atividades da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) foram determinadas na fração microsomal hepática dos camundongos, essencialmente como descrito por Burke (1985), exceto pelo emprego de sistema regenerador de NADPH e adaptação para microplaca (noventa e seis poços). A adaptação para microplaca foi feita segundo o que foi proposto por Kennedy (1994), com algumas modificações.

Os substratos etoxiresorufina (EROD) e benziloxiresorufina (BROD) foram usados na concentração de 5 μ M. A solução tampão para o ensaio foi fosfato de potássio dibásico 50 mM pH 7,8 e o sistema regenerador de NADPH usado para desencadear a reação era constituído de β -NADP; glicose-6-fosfato; glicose-6-fosfato desidrogenase e cloreto de magnésio, preparado como solução única, para obter as concentrações finais de 0,25 mM, 5 mM, 0,5 U/mL e 2,5 mM, respectivamente.

Antes da realização do ensaio, foram testadas diferentes concentrações de proteína, e diferentes tempos de incubação da reação, de modo que comprovamos a linearidade da reação nas condições fixadas (tempo e quantidade de proteína) para realização do ensaio. Com base nestes testes preliminares, fixamos a quantidade de 25 μ g de proteína para ser adicionada a cada micropoço. Os microsossomos foram, portanto, diluídos na solução tampão para que fossem adicionados 25 μ g de proteína a cada micropoço da microplaca.

Para o ensaio, a solução tampão, a fração microsossomal e o substrato foram adicionados aos poços da microplaca, que era mantida no banho de gelo até o momento da pré-incubação em banho-maria *Heto*® com agitação, mantido a 37 °C. O volume final em cada micropoço foi de 0,3 mL. Após 3 minutos de pré-incubação, o sistema regenerador de NADPH foi adicionado à cada fileira da microplaca a intervalos de sessenta segundos e, após decorridos 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 0,1 mL de acetonitrila aos micropoços. O volume final para a leitura no espectrofluorímetro para microplacas foi, portanto, de 0,4 mL.

A microplaca era retirada do banho-maria e deixada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos antes da leitura da fluorescência produzida com a reação.

Para construir a curva padrão com a substância fluorescente, em cada microplaca em que se media a atividade, foram adicionados diferentes volumes de uma solução de resorufina 1 μ M e da solução tampão usada no ensaio, de modo a se obter diferentes concentrações de resorufina. O volume final no micropoço para a leitura da curva padrão foi de 0,4 mL.

Para determinar a atividade enzimática e construir a curva padrão, as medidas foram realizadas em triplicata.

Para a leitura da fluorescência produzida com o acúmulo da resorufina formada durante a reação, a microplaca foi levada ao espectrofluorímetro para microplacas modelo *Spectramax GeminiXS* (*Molecular Devices*®), usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®. A leitura foi feita empregando os seguintes parâmetros: excitação 530 nm, emissão 590 nm e precisão normal.

As atividades de EROD e BROD foram expressas como picomoles de resorufina/minuto/miligrama de proteína.

Cumarina 7-hidroxilase (COH)

Ensaio em microplaca

A atividade da cumarina-hidroxilase foi determinada na fração microsomal hepática dos camundongos, sendo a leitura da fluorescência realizada por meio de fluorímetro para microplacas, segundo método descrito por Rhanasto (2003), com algumas modificações.

A cumarina (substrato) foi usada na concentração final de 10 μ M, dissolvida em etanol. A solução tampão para o ensaio foi Tris 50 mM pH 7,4 e o sistema regenerador de NADPH usado para desencadear a reação era constituído de β -NADP; glicose-6-fosfato; glicose-6-fosfato desidrogenase e cloreto de magnésio, preparado como solução única, para obter as concentrações finais de 0,4 mM, 10 mM, 0,5 U/mL e 10 mM, respectivamente.

Para padronizar as condições do ensaio, diferentes concentrações de proteína e diferentes tempos de incubação foram testados, fixando-se em 80 μ g de proteína a quantidade a ser adicionada ao micropoço. Os microsomas foram, portanto, diluídos na solução tampão para que fossem adicionados 80 μ g de proteína a cada micropoço da microplaca.

A solução tampão, a fração microsomal e o substrato foram adicionados à microplaca que foi mantida sobre gelo em escamas até o momento da pré-incubação em banho-maria Heto® com agitação à 37 °C. O volume final em cada micropoço foi de 0,1 mL. Após 3 minutos de pré-incubação, o sistema regenerador de NADPH foi adicionado a cada fileira da microplaca, a intervalos de sessenta segundos, e após 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 0,06 mL de ácido tricloroacético a 10%. Em seguida, foram adicionados 0,14 mL de uma solução de glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4 a cada micropoço.

Para construir a curva padrão com a substância fluorescente, a cada microplaca em que foi determinada a atividade da COH, foram adicionados diferentes volumes de uma solução de umbeliferona 8 μ M, preparada em solução tampão glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4, de modo a obter diferentes concentrações do produto da reação (umbeliferona). Foram também adicionados aos micropoços, solução de cumarina 100 μ M, fração microsomal diluída em tampão Tris 50 mM pH 7,4 para obter 80 μ g de proteína. e tampão Tris 50 mM pH 7,4 para completar o volume para 0,1 mL. Ao final, foram adicionados também 0,06 mL de ácido tricloroacético e 0,14 mL da solução glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4 a todos os micropoços usados para determinar a curva padrão. Para medir a atividade das amostras e construir a curva padrão, as determinações foram feitas em triplicata.

Ao final da reação, para a leitura da fluorescência produzida com o acúmulo da umbeliferona, a microplaca foi levada ao espectrofluorímetro para microplacas modelo *Spectramax GeminiXS (Molecular Devices®)*, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh®* e *Windows®*. A leitura da fluorescência foi feita com os seguintes parâmetros: excitação 355 nm, emissão 460 nm e precisão normal.

A atividade de COH foi expressa como picomoles de umbeliferona/minuto/miligrama de proteína.

Ensaio usando fluorímetro convencional

O ensaio convencional da cumarina 7-hidroxilase foi realizado em tubos de ensaio de vidro de capacidade igual a 5 mL. O volume final da reação era 0,5 mL e a mistura continha: tampão Tris 50 mM pH 7,4, cumarina 10 μ M, proteína 0,4 mg (quando a linhagem de camundongos avaliada era DBA-2) ou 0,8 mg (para a linhagem C57BL/6). A reação tinha início com a adição da mistura (sistema regenerador de NAPH) de co-fatores β -NADP 0,5 mM, glicose 6-fosfato 10 mM, glicose 6-fosfato desidrogenase 0,5 U/mL e cloreto de magnésio 10 mM após uma pré-incubação de três minutos.

Após dez minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de HCl 2 N. Adicionávamos, então, 1 mL de clorofórmio à mistura e, após um período de repouso de trinta minutos, a umbeliferona (500 μ L) foi extraída e transferida para tubos tipo *ependorf* que continham 750 μ L de uma solução de glicina NaOH 1,6 M pH 10,4. Decorridos vinte minutos, a umbeliferona foi extraída e transferida para cubetas de quartzo, sendo diluída quatro vezes (para as amostras de DBA-2), ou duas vezes (para as amostras de C57BL/6), em tampão glicina antes da leitura da fluorescência.

A leitura da fluorescência produzida pela umbeliferona acumulada durante a reação foi realizada em espectrofluorímetro *Shimadzu® RF5001* com a fixação dos seguintes parâmetros: excitação 355 nm e emissão 460 nm com abertura de fenda 3 nm.

Antes da leitura das amostras foi construída uma curva padrão a partir de diluições de uma solução de umbeliferona 1 μ M.

***p*-nitrofenol-hidroxilase (PNPH)**

A atividade da para-nitrofenol-hidroxilase (PNPH), marcadora da atividade catalítica de CYP2E1, foi determinada na fração microssomal hepática dos camundongos, segundo o método descrito por Reinke e Moyer (1985), com algumas modificações introduzidas por Allis e Robinson (1994).

A atividade da PNPB foi determinada usando um espectrofotômetro *Shimadzu*® *UVI601*, empregando o programa cinético, e fixando o comprimento de onda de leitura em 480 nm. Ao espectrofotômetro foi acoplado um banho-maria *Fanem*® modelo 116R, com bomba de demanda, o que permitia que a temperatura na célula (e na cubeta) fosse mantida estável a 37 °C.

O ensaio ocorreu como se segue: à cubeta de poliestireno foram adicionados 865 µL de tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 M pH 6,8, 10 µL de *p*-nitrofenol 10 mM, preparado em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 M pH 6,8, e 100 µL de fração microsomal diluída no mesmo tampão para obter a concentração de 2 mg/mL de proteína.

O conteúdo da mistura foi pré-incubado durante cinco minutos em banho-maria *Heto*® com agitação à 37 °C. O sistema regenerador de NADPH, constituído de glicose 6-fosfato, glicose 6-fosfato desidrogenase e β-NADP – para obter as concentrações finais de 5 mM, 1 U/mL e 0,25 mM, respectivamente – foi adicionado à cubeta para iniciar a reação. Depois de 5 minutos adicionais de pré-incubação (no banho-maria *Heto*® com agitação a 37 °C), a cubeta foi levada ao espectrofotômetro que registrou a absorbância diferencial ($\Delta A = A_0 - A_{10}$) no intervalo de 10 minutos de reação.

Antes do ensaio, uma curva espectral do *p*-nitrofenol – substrato da reação – 0,1 mM em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 M pH 6,8 – foi feita em cubeta de quartzo na faixa de comprimentos de onda de 300 a 600 nm. A reprodução do pico característico do substrato confirmava a completa solubilização do paranitrofenol na solução tampão.

Para a padronização do método, testamos diferentes quantidades de proteínas e fixamos a quantidade de 0,2 mg de proteína para ser utilizada no ensaio.

Para calcular o 4-nitrocatecol produzido na reação, utilizamos o coeficiente de extinção de 3,57 mM⁻¹ cm⁻¹ (Allis e Robinson, 1994).

A atividade de PNPB foi expressa como nanomoles de 4-nitrocatecol/minuto/miligrama de proteína.

Devido à reduzida variabilidade entre as leituras de absorbância de uma mesma amostra, a atividade de PNPB de cada amostra foi determinada em duas determinações (duplicatas).

3.2.6.2 Reações de conjugação:

Uridina difosfo-glicuroniltransferase (UGT)

A atividade da uridina difosfo-glicuroniltransferase (UGT) foi determinada na fração microsomal hepática dos camundongos. A atividade da UGT foi determinada segundo o método descrito por Bock *et al.* (1983).

A reação ocorreu em tubos de ensaio mantidos em banho-maria *Heto*® com agitação à temperatura de 37 °C por trinta minutos.

Aos tubos de ensaio com capacidade para 5 mL, inicialmente mantidos em gelo, foram adicionados tampão Tris 100 mM pH 7,4, triton X-100 0,25 %, *p*-nitrofenol 5 mM, MgCl₂ 50 mM e 0,1 mL da fração microsomal diluída no mesmo tampão para obter 0,1 mg de proteínas. O volume final no tubo de ensaio onde ocorreu a reação foi de 0,5 mL.

Após dois minutos de pré-incubação a 37 °C, foram adicionados 50 µL de ácido uridina difosfoglicurônico (UDPGA) 30 mM para dar início à reação. Transcorridos trinta minutos, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 5% aos tubos de ensaio que, em seguida, foram centrifugados a 2.300 rpm por vinte minutos (centrífuga *Quimis*®).

Após adicionar à cubeta 1 mL do sobrenadante e 250 µL de NaOH 2 N, a absorbância (405 nm) foi lida em espectrofotômetro *Shimadzu*® UV 1601. O “branco” da reação continha todos os componentes para a reação, exceto o *p*-nitrofenol, e a cubeta de “referência” continha todos os componentes, exceto a UDPGA. A leitura da absorbância do branco foi feita contra a água; e a da referência e a das amostras foi realizada contra o branco da reação.

A absorbância das amostras resulta da absorção de luz pelo *p*-nitrofenol intacto, que não havia sido conjugado. O valor diferencial entre a absorbância da célula de referência e a das amostras diz respeito ao *p*-nitrofenol que havia sido conjugado, e que foi expresso como glicuronato de *p*-nitrofenol / minuto / mg de proteína. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra.

A concentração do glicuronato formado foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de $14,9 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ estabelecido por Martin e Black (1994).

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada nas frações citosólica e microsomal hepáticas dos camundongos segundo método descrito por Habig *et al.* (1974).

Para determinar a atividade de GST foi usado um espectrofotômetro *Shimadzu*® UV 1601, sendo a leitura da absorbância realizada no comprimento de onda de 340 nm. Ao

espectrofotômetro foi acoplado um banho-maria *Fanem*® modelo 116R com bomba de demanda, o que permitia que a temperatura na célula fosse mantida estável a 25 °C.

Às duas cubetas de quartzo foram adicionados 450 µL de solução tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM pH 6,5, 25 µL de 1,cloro-2,4-dinitrobenzeno 40 mM e 25 µL de glutatona 40 mM. Para medir a atividade da GST microsomal, foram adicionados 430 µL de tampão (ao invés de 450 µL), porque nesse caso foram adicionados também 20 µL de Triton X-100 5%.

À cubeta contendo a amostra, onde iria ocorrer a reação, foram adicionados 500 µL de fração citosólica ou microsomal diluídas na solução tampão de uso, de forma a introduzir na cubeta 5 µg (no caso da GST citosólica) ou 50 µg (no caso da GST microsomal) de proteína. À cubeta de referência, em lugar da fração subcelular hepática, foram adicionados 500 µL da solução tampão de uso. Transcorridos cinco minutos de reação, foi registrada a leitura da absorbância diferencial (ΔA) a cada minuto de reação.

Para o cálculo da concentração do conjugado (2,4-dinitrofenil-glutaciona) formado foi usado o coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Habig *et al.*, 1974).

A atividade da GST foi expressa como µmoles (para GST citosólica) ou nanomoles (para GST microsomal) de 2,4-dinitrofenil-glutaciona/miligrama de proteína/minuto.

Quando as amostras de fração citosólica de camundongos C57BL/6 foram avaliadas (GST citosólica), foram introduzidos 2,5 µg de proteína na cubeta, ao invés dos 5 µg introduzidos no caso dos camundongos da linhagem DBA-2. As determinações foram feitas em triplicata.

3.2.6.3 – Determinação dos níveis da glutatona reduzida (GSH)

Preparação do homogeneizado tissular

A quantificação da glutatona reduzida (GSH) foi feita no homogeneizado hepático, como descrito por Cao e Li (2004).

Após a morte por deslocamento cervical, os fígados foram retirados e o sobrenadante hepático foi preparado imediatamente. Os órgãos foram inicialmente lavados com uma solução gelada de PBS, cortados em pequenos pedaços, novamente lavados de forma intensa com a mesma solução, e secos com auxílio de papel de filtro. Os fígados foram, então, homogeneizados em um volume de solução tampão fosfato de sódio 100 mM com EDTA 5 mM, correspondendo a aproximadamente duas vezes o peso do órgão. O homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ à 4 °C durante quinze minutos e, em seguida, congelado e armazenado a - 80 °C, por período não superior a quinze dias, antes da quantificação da GSH.

Quantificação da concentração da GSH

A GSH hepática foi determinada como descrito por Zhu *et al.* (1995) e Cao *et al.* (2003) usando espectrofluorímetro *Shimadzu*® RF 5001, com a fixação dos seguintes parâmetros: excitação 350 nm, emissão 420 nm e abertura de fenda 3 nm.

No momento da análise, 10 µL do sobrenadante degelado foram incubados com 12,5 µL de ácido fosfórico 25% e 37 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M com EDTA 5 mM pH 8 a 4 °C por dez minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 X g por dez minutos à 4 °C. O sobrenadante obtido foi incubado com uma solução de o-ftalaldeído 0,1% em metanol, e com o tampão alcalino usado para a centrifugação, por quinze minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura no espectrofluorímetro. A concentração de GSH na preparação hepática foi calculada a partir de uma curva padrão construída com diluições sucessivas de uma solução de GSH a 20 µM. A curva padrão foi construída concomitantemente com a determinação da GSH nas amostras.

Os resultados foram expressos como nanomoles de GSH/ mg de proteína.

3.2.7 – Determinações realizadas no soro sanguíneo

3.2.7.1 Determinação das atividades da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST)

As atividades da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram medidas no soro dos camundongos usando o kit comercial *Laborclin*®, seguindo método descrito por Reitman e Frankel (1957). Foram seguidas as instruções do fabricante, adaptando-se as condições para a realização da reação em microplaca (noventa e seis poços). A leitura de densidade ótica foi feita a 505 nm em espectrofotômetro para microplaca modelo *Spectramax Plus (Molecular Devices*®), usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®.

As atividades de AST e ALT foram expressas como unidades internacionais/L (UI/L).

3.2.7.2– Quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO)

O nitrito sérico formado foi quantificado segundo a reação de Griess (1879). O nitrato do soro sanguíneo foi transformado em nitrito com o uso da nitrato redutase e quantificado, segundo a descrição que se segue. O nitrito e o nitrato (transformado) séricos foram expressos como concentração (µM) de nitrito sérico.

Duas curvas padrão foram construídas paralelamente para quantificação do nitrito nas amostras de soro: uma de nitrito e outra de nitrato.

Nitrito

Uma solução de nitrito de sódio 0,2 mM foi preparada em água milliQ. Diferentes diluições da solução 0,2 mM foram transferidas para os micropoços de uma microplaca (em triplicata), de modo a compor uma curva padrão com onze concentrações de nitrito. Aos micropoços correspondentes ao branco foi adicionada água milliQ.

Em seguida, o reagente de Griess (partes iguais das soluções de sulfanilamida 2% em ácido fosfórico 5%; dicloridrato de N-1-naftilenodiamino – NEED – 0,2% em água milliQ; ácido fosfórico 5% em água milliQ e água milliQ) foi adicionado aos micropoços.

A absorbância nos diferentes poços da microplaca foi então lida em espectrofotômetro de placa modelo *Spectramax Plus (Molecular Devices®)*, fixado o comprimento de onda em 540 nm, e usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh®* e *Windows®*.

Nitrato

Uma solução de nitrato de sódio 0,4 mM foi preparada em água milliQ. Diferentes diluições da solução 0,4 mM foram transferidas para os micropoços (em triplicata) de uma outra microplaca, de modo a compor uma curva padrão com onze concentrações de nitrato. Aos micropoços correspondentes ao branco foi adicionada água milliQ. Aos micropoços restantes da microplaca que continha a curva de nitrato, foram adicionadas as amostras de soro para análise.

Em seguida, foi adicionado um coquetel a todos os micropoços (contendo o branco, as diluições de nitrato de sódio e as amostras). O coquetel foi constituído de nitrato redutase 4 U/L - para reduzir o nitrato sérico a nitrito - preparado com o tampão de uso; NADPH 0,1 mg/mL em água milliQ; tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,5 40 mM e água milliQ.

A microplaca foi incubada à 37 °C em estufa (marca *Heraeus®*) durante a noite por um período de aproximadamente dezesseis horas.

Ao final do período de incubação, o reagente de Griess foi adicionado a todos os micropoços e a microplaca foi, então, levada a um espectrofotômetro para placas, modelo *Spectramax Plus (Molecular Devices®)*, para leitura da absorbância em 540 nm, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh®* e *Windows®*.

3.2.8 – Determinação da proteína CYP1A1/2 por immunoblotting

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulphate*, SDS) foi realizada usando a fonte de eletroforese *Amersham Pharmacia Biotech®* EPS 301, segundo técnica descrita por Laemmli (1970). Foi empregada uma corrente elétrica de 20 mA no gel de empacotamento e de 40 mA no gel de resolução.

As placas de vidro foram lavadas com detergente e, após a montagem, testamos a presença de vazamento. Álcool comercial foi usado para limpeza.

As placas foram, então, montadas no módulo de corrida. O gel de resolução (acrilamida 10%, SDS 0,1%) foi adicionado até uma altura correspondente a 2/3 da placa. A solução de SDS 0,1% foi adicionada de modo a cobrir o gel, e deixada polimerizar (aproximadamente trinta minutos). Retiramos o excesso de água e, após o posicionamento do pente, aplicamos o gel de empacotamento (acrilamida 4% SDS 0,1%). Deixamos polimerizar e, após trinta minutos, colocamos o tampão de corrida (SDS 0,1 %).

As amostras dos microsomas foram diluídas em água destilada e tampão da amostra para obter 40 µg de proteína. Após homogeneização e aquecimento das amostras – cinco minutos a 100 °C – o volume de 12 µL da amostra diluída foi aplicado às canaletas formadas com a polimerização do gel em torno dos dentes do pente. Foi aplicado o padrão de peso molecular diluído em tampão de amostra (5 µL) e a corrida teve início.

Para a transferência, montamos o módulo de transferência. O módulo foi colocado na cuba, enchendo cuidadosamente com tampão de transferência. Completamos o tanque com água destilada e aplicamos a corrente elétrica por duas horas (~ 25 V). Retiramos o gel e coramos as membranas com solução de Ponceau. As membranas foram descoradas, lavadas em TBS (*Tris Buffer Solution*) (cinco minutos duas vezes) e bloqueadas em solução de leite em pó desnatado 5% (em TBS) durante a noite à 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS (duas vezes) e incubadas com anticorpo primário anti-CYP1A1 (anticorpo contra CYP1A1 de camundongo desenvolvido em cabra, *Santa Cruz Biotechnology*®, sc9828) por uma hora à temperatura ambiente, com agitação.

As membranas foram novamente lavadas (rapidamente) em TBS (duas vezes) e na mesma solução por quinze minutos com agitação à temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho desenvolvido em cabra, diluído 1:1000) foi adicionado às membranas por uma hora à temperatura ambiente com agitação.

As membranas foram rapidamente lavadas com TBS (duas vezes) e mais uma vez (quinze minutos à temperatura ambiente com agitação) e, por último, mais três lavagens de cinco minutos.

As membranas foram, então, reveladas com o *kit* de fosfatase alcalina segundo instruções do fabricante (BIO-RAD AP *conjugate substrate kit*, catálogo no. 170-6432). As membranas foram fotodocumentadas e a densitometria das bandas foi quantificada utilizando o *software Gel-Pro Analyzer* versão 4.0 para *Windows*® 98/NT/2000.

3.2.9 – Determinação do mRNA de NOS2 por RT-PCR em tempo real

Extração e quantificação de RNA das amostras de fígado

Pequenos fragmentos do fígado dos camundongos foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em tubos criogênicos (Nunc[®]) impermeáveis ao nitrogênio até a extração do RNA. No momento da extração, os fragmentos foram transferidos para tubos *epENDORF* de 1,5 mL e foi adicionado 1 mL do reagente Trizol[®] (*Invitrogen*[®]) a cada um deles. Os fragmentos foram homogeneizados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos elétrico (Polytron[®]) em banho de gelo. Foram realizados movimentos ascendentes e descendentes até a total dissociação do tecido. Neste momento, as amostras foram retiradas do banho de gelo e repousaram por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 200 μL de clorofórmio (*Tedia*[®]) para cada mL de Trizol[®] utilizado. Os *epENDORFs* foram agitados manualmente e deixados em repouso por 3 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $12.000\text{ X }g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em centrífuga refrigerada (*Mikro 22R, Hettich*[®]). A fase aquosa resultante foi retirada e transferida para novos *epENDORFs* onde foram adicionados 500 μL de isopropanol (*Tedia*[®]) seguidos de 5 minutos de repouso a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $12.000\text{ X }g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em centrífuga refrigerada (*Mikro 22R, Hettich*[®]). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol (*Tedia*[®]) 75% em água MilliQ tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC, *Sigma-Aldrich Co*) (H_2O DEPC). Os *epENDORFs* foram agitados em vortex até que o sedimento descolasse. Neste momento, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a $7.500\text{ X }g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ em centrífuga refrigerada (*Mikro 22R, Hettich*[®]). O sobrenadante foi descartado e cada sedimento foi ressuspenso em 20 μL de H_2O DEPC. A concentração de RNA de cada amostra foi determinada utilizando-se espectrofotômetro ND-1000 (*Nanodrop*[®]) e foi expressa em $\text{ng}/\mu\text{L}$. As amostras de RNA foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *Superscript II*[®] (*Invitrogen*[®]). Em tubos *epENDORF* de 100 μL foi adicionado 1 μL de mistura de nucleotídeos (dNTP) (*Invitrogen*[®]), 1 μL de oligodT (*Promega*[®]), volume de amostra contendo 3 μg de RNA e volume de água DEPC necessário para completar 10 μL . As amostras foram aquecidas por 5 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ no termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*[®]) e rapidamente colocadas em gelo. Foram adicionados então 4 μL de Tampão *firststrand 5X* concentrado (*Invitrogen*[®]), 2 μL de ditiotretitol (DTT) 0,1 M e 1 μL de RNaseOut[®] (*Invitrogen*[®]). Esta mistura foi incubada no

termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*[®]) por 2 minutos a 42 °C. Após esse período, foi adicionado 1 µL de transcriptase reversa *Superscript II (Invitrogen*[®]) em cada um dos tubos. As amostras foram incubadas no termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*[®]) por 50 minutos a 42 °C, seguido de uma etapa final de desnaturação de 15 minutos a 70 °C. As amostras de cDNA foram armazenadas a –80 °C.

Quantificação relativa dos níveis de mRNA por RT-PCR

Os níveis de mRNA da iNOS foram quantificados através da técnica de *real time PCR*, utilizando-se a metodologia *Taqman*[®] (*Applied Biosystems*[®]). Nestes ensaios utiliza-se uma seqüência em torno de 18 nucleotídeos (sonda), que anela especificamente no DNA complementar do gene alvo. Esta sonda está conjugada com um fluoróforo que durante a etapa de extensão é clivado da sonda pela ação exonucleásica da DNA polimerase, e então, emite o sinal de fluorescência detectado pelo termociclador de *real time (7500 Fast – Applied Biosystems*[®]).

Para o gene-alvo, foi utilizada sonda conjugada com o fluoróforo FAM[®]; para o controle endógeno β-actina, foi utilizada sonda conjugada com o fluoróforo VIC[®]. As sondas utilizadas neste trabalho constam do catálogo da *Applied Biosystems*[®] e tem suas seqüências protegidas por patentes comerciais.

As sondas utilizadas estão apresentadas no quadro abaixo:

Gene	Código*
NOS2	Mm00440485_m1
β -Actina	4352341E

*catálogo da *Applied Biosystems*[®]

Os ensaios foram realizados em placas ópticas de 96 poços (*Applied Biosystems*[®]). Foram pipetados 8 µL de solução contendo todos os componentes necessários para a reação de PCR (*Master Mix - Applied Biosystems*[®]) e 2 µL de cDNA.

Os níveis de transcrição de cada gene foram analisados através da diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno de uma mesma amostra, medido através do *threshold cycle (ΔCt)*. A expressão relativa entre o grupo de animais com malária e o grupo controle foi analisada através da diferença dos valores de ΔCt de cada animal infectado contra a média de ΔCt do grupo controle através da fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.2.10 – Ensaio do micronúcleo em células de medula óssea de camundongos

O ensaio do micronúcleo foi realizado de acordo com as recomendações de MacGregor *et al.* (1987) e as diretrizes (*guidelines*) da Organização para Co-operação Econômica e para o Desenvolvimento (*Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD, 1997). Fêmeas C57BL/6 foram tratadas com ciclofosfamida (CPA, CAS no. 50-18-0), etil metanosulfonato (EMS, CAS no 62-50-0) ou 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno (DMBA, CAS no. 57-97-6). As medulas ósseas foram removidas 24 e 48 horas (CPA), 24 horas (EMS) ou 48 horas após uma injeção única i.p. do clastógeno. Após a morte dos camundongos por deslocamento cervical, os fêmures foram rapidamente retirados e as medulas ósseas foram ejetadas do canal com auxílio de seringa hipodérmica e soro fetal bovino (FCS). As suspensões celulares em FCS foram centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram suspensos em uma gota de FCS e usados para a preparação das distensões de medula óssea em lâmina de vidro. Após a coloração das distensões com May-Grunwald Giemsa, as lâminas recebiam um código para avaliação cega posterior. Duzentos eritrócitos foram examinados por lâmina para determinar a razão entre eritrócitos policromáticos (PCE, formas jovens) e eritrócitos normocromáticos (NCE, eritrócitos maduros). Esta razão é uma indicação de toxicidade da medula óssea (mielotoxicidade). Dois mil PCEs por camundongo foram examinados para determinar a frequência de micronúcleos (MN-PCE, ou eritrócitos policromáticos micronucleados) que é indicativa de lesão ao DNA. Um técnico treinado que não conhecia os códigos (avaliação cega) examinou todas as lâminas.

4 – RESULTADOS

4.1 – Alterações da biotransformação de xenobióticos no fígado de camundongos C57BL/6 e DBA-2 infectados com *P. berghei* (ANKA)

4.1.1- Quadro clínico apresentado pelos camundongos infectados com *P. berghei* (ANKA)

Tal como ocorre com outras linhagens murinas, a infecção dos camundongos C57BL/6 e DBA-2 fêmeas com *P. berghei* (ANKA) evoluiu de forma progressiva, com gradual elevação da parasitemia e agravamento dos sinais e sintomas clínicos que culminam com a morte do hospedeiro. Em experimentos preliminares, havíamos verificado que uma certa proporção dos C57BL/6 infectados, ainda em níveis moderados de parasitemia, apresentava sinais neurológicos como hipoatividade acentuada, ataxia e tendência a rolar sobre si mesmo (*roll over*) e, a partir deste momento, evoluíam rapidamente para o óbito. Nos camundongos DBA-2, este tipo de evolução para um comprometimento neurológico precoce e fatal foi muito mais raro e, via de regra, os animais exibiram uma deteriorização mais gradual do quadro clínico, concomitante com um aparente agravamento da anemia (“sangue ralo”) e elevação da parasitemia, ocorrendo a morte mais tardiamente, quando a proporção de hemácias parasitadas era elevada. Esses dois tipos de evolução clínica observados no presente estudo são compatíveis com o que é relatado na literatura em termos da susceptibilidade da linhagem C57BL/6, e maior resistência da DBA-2 à malária cerebral desencadeada pelo *P. berghei* (Brian de Souza e Riley, 2002).

Neste experimento, os camundongos foram mortos para análise das modificações das enzimas de biotransformação de xenobióticos quando os animais apresentavam um quadro mais grave ou terminal da malária, nos dias pós-infecção (mediana, valor mínimo-máximo) 12 (9-21), no caso dos C57BL/6, e 18 (12-20), no caso dos DBA-2, dias em que a parasitemia atingiu 28% HP (20-68%), ou 46% HP (33-68%), para a primeira e para a segunda linhagem, respectivamente. No dia em que foram mortos, os camundongos das duas linhagens exibiam perda de peso acentuada (10 a 20%) em relação ao peso corporal anterior à infecção, e outros sintomas tais como piloereção, hipoatividade e taquipnéia. Quando os camundongos foram mortos para remoção do fígado, notamos as alterações características da malária (*i.e.*, baços de cor negra e muito aumentados e fígados com coloração castanho escura).

O peso médio (\pm EP) dos baços nos camundongos C57BL/6 controles não-infectados foi 70 ± 20 mg (N=14) e, nos infectados, 240 ± 190 mg (N=16), o que correspondeu a um aumento de 360% (Figura 4.1). Nos camundongos DBA-2 controles, o peso do baço foi 90 ± 40 mg (N=17) e, nos infectados, 570 ± 210 mg (N=17) (*i.e.*, a infecção causou um aumento percentual de 550% no peso do órgão) (Figura 4.1).

Em comparação com a esplenomegalia, a hepatomegalia foi bem mais discreta. Os pesos médios dos fígados dos animais das linhagens DBA-2 e C57BL/6 foram 970 ± 200 mg (controles) e 1310 ± 190 mg (infectados), e 860 ± 110 mg (controles) e 1090 ± 420 mg (infectados), respectivamente (Figura 4.2). Em ambas as linhagens, o peso do fígado nos infectados correspondeu a aproximadamente 130% o peso do órgão nos controles não-infectados.

É descrito que o aumento do peso do fígado na malária murina se deve, fundamentalmente, ao acúmulo de hemozoína (pigmento produzido pelo plasmódio ao metabolizar a hemoglobina do hospedeiro) e hipertrofia das células de Kupffer (Rey, 1991). Para verificar se na infecção ocorreu também dano significativo aos hepatócitos, determinamos as atividades das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) nos soros sanguíneos dos camundongos (fêmeas) da linhagem DBA-2 infectados e nos respectivos controles não-infectados. As atividades das duas transaminases estavam elevadas (3 a 4 vezes) nos camundongos infectados (N=4) em relação aos controles (N=4). Os valores (média±EPM; controles e infectados, teste *t* de Student, $p < 0,05$) foram para a ALT $16,8\pm 1,1$ e $45,9\pm 9,4$ UI/L e para a AST $64\pm 12,9$ e $227,8\pm 32,2$ UI/L, respectivamente (Figura 4.3). Esse aumento das atividades das transaminases indica que nesta etapa da infecção houve dano ao tecido hepático dos DBA-2 infectados com *P. berghei* ANKA. Não determinamos a atividade das transaminases nos camundongos C57BL/6 por não termos obtido soro destes animais neste experimento.

Plasmodium berghei (ANKA)

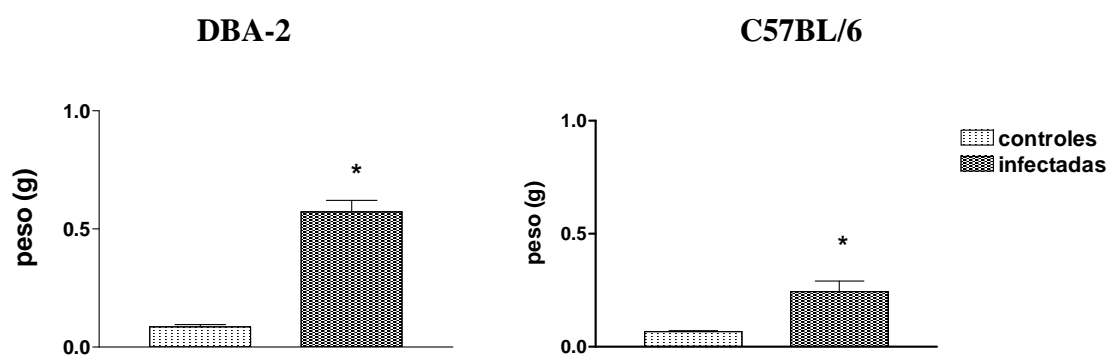


Figura 4.1 – Alterações dos pesos dos baços das fêmeas DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* (ANKA) e seus controles. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm erro padrão da média (EPM).

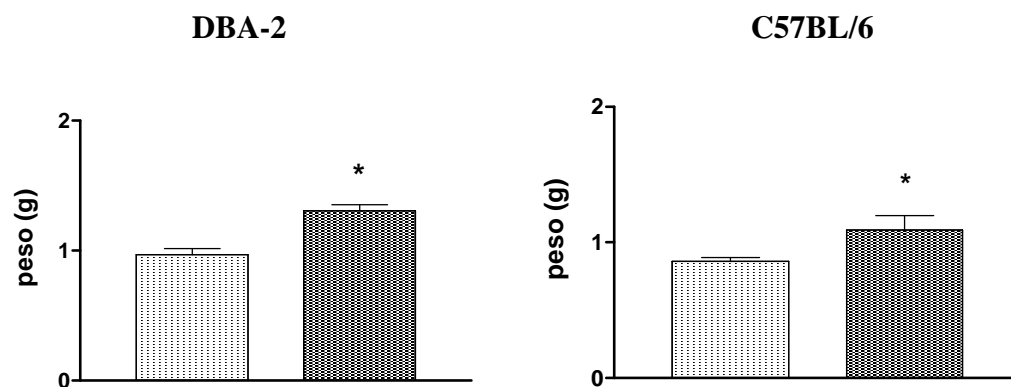


Figura 4.2 – Alterações dos pesos dos fígados de fêmeas DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *Plasmodium berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

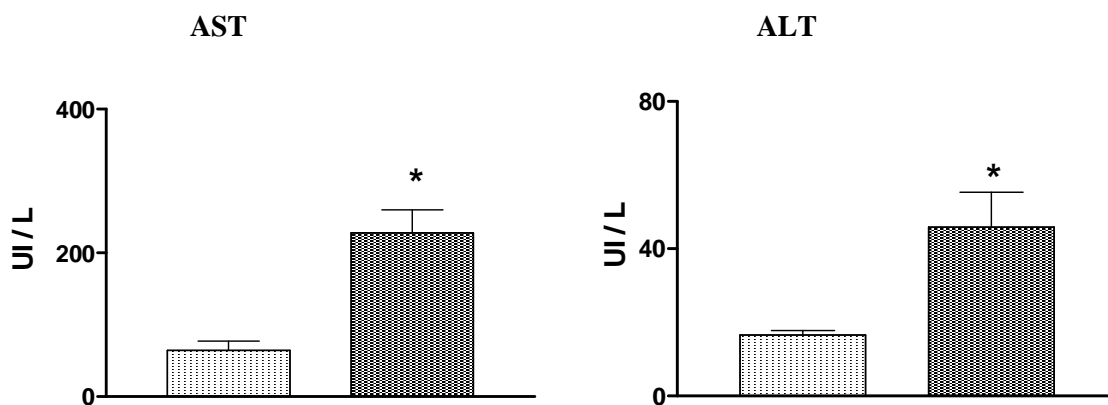


Figura 4.3 - Alterações dos níveis séricos das transaminases AST e ALT na linhagem DBA-2 infectada com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). As atividades são expressas como UI/L. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

4.1.2 – Atividades catalíticas de CYP1A1/2, 2B9/10, 2A5 e 2E1 e expressão da proteína CYP1A1/2 no fígado de camundongos infectados com *P. berghei* (ANKA)

Nos camundongos C57BL/6 e DBA-2 infectados, a atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) hepática, mediada por isoformas da subfamília CYP1A, estava deprimida em relação à atividade registrada nos respectivos controles não-infectados (Figura 4.4). Entre os camundongos da linhagem DBA-2, a atividade de EROD (média \pm EPM) foi $92,3\pm 11,8$ e $60,3\pm 4,6$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto, em controles (N=16) e animais infectados (N=16), respectivamente (Figura 4.4). Nos C57BL/6, por outro lado, EROD foi $118,2\pm 7,8$ e $52,9\pm 4,3$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto, em controles (N=19) e infectados (N=19), respectivamente (Figura 4.4). Esses resultados indicam que a atividade catalítica da CYP1A hepática foi, entre os infectados, 30 a 50% menor do que a atividade entre os não infectados.

A depressão da atividade catalítica de isoformas da subfamília CYP1A corerespondeu, pelo menos na linhagem DBA-2, à uma clara diminuição dos níveis das respectivas proteínas na fração microsomal hepática. Como pode ser visto na Figura 4.5, o *immunoblotting* revelou que as bandas imunoreativas com anticorpo contra CYP1A1 foram menos densas nas tiras (*lanes*) cujos poços foram carregados com microsomos de camundongos infectados (Figura 4.5).

A análise densitométrica corroborou esta impressão visual e mostrou que a densidade das bandas que correspondem aos microsomos dos animais infectados é significativamente menor [$134,7\pm 2,45$ unidades arbitrárias de densitometria ótica (DO), N=5] do que a dos não-

infectados [$217,1 \pm 35,25$ unidades arbitrárias de densitometria ótica (DO), $N=5$], (teste t de Student $p < 0,05$) (Figura 4.5). A depressão da atividade catalítica, portanto, poderia ser explicada por uma diminuição dos níveis de proteínas CYP1A entre os infectados, o que poderia resultar de uma menor síntese (*e.g.*, regulação negativa da transcrição) ou de uma degradação mais rápida da proteína causada pela infecção.

A atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD), catalisada por isoformas da subfamília CYP2B em fígado de mamíferos (CYP2B9/10 em camundongos), também foi reduzida pela infecção, tanto na linhagem DBA-2 quanto na C57BL/6. Entre os camundongos DBA-2, a atividade de BROD (médias \pm EPM) foi $80,5 \pm 7,3$ e $51,8 \pm 4,8$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto em animais não infectados ($N=16$) e infectados ($N=16$), respectivamente. Nos camundongos C57BL/6, BROD foi $85,2 \pm 11$ e $42,5 \pm 5,2$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto em animais não-infectados ($N=19$) e infectados ($N=19$), respectivamente (Figura 4.6). Esses resultados indicaram que, tal como ocorreu com a atividade de CYP1A, a infecção também reduziu (entre 30 a 50%) a atividade catalítica de isoformas da subfamília CYP2B no fígado de camundongos das duas linhagens.

Contrastando com a depressão da atividade de isoformas CYP1A e 2B, entretanto, houve uma clara indução (1,5 a 2 vezes) da atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH), mediada por CYP2A5, no fígado dos camundongos DBA-2 e C57BL/6 infectados (Figura 4.7). Nos camundongos DBA-2 não infectados ($N=19$), a atividade de COH (média \pm EPM) foi $93,2 \pm 10,4$ contra $170,1 \pm 19,8$ picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto entre os infectados ($N=19$). Entre os camundongos C57BL/6, as atividades de COH foram $7,94 \pm 0,7$ e $11,79 \pm 1,6$ picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto em animais não infectados ($N=18$) e infectados ($N=18$), respectivamente. Esses resultados mostram, portanto, que a infecção causou uma clara indução da atividade catalítica de CYP2A5 nas duas linhagens. Digno de nota é o fato da atividade constitutiva de CYP2A5 (COH) entre as fêmeas não infectadas ser muito maior (maior que 10 vezes) na linhagem DBA-2 do que na C57BL/6. A expressão de CYP2A5 difere amplamente entre as linhagens murinas, e é bem conhecido que a linhagem DBA-2 é uma das que melhor expressa essa isoforma (Wood e Conney, 1974). Em estudo anterior havíamos constatado que os camundongos *Swiss Webster*, por exemplo, aparentemente não expressam CYP2A5 e exibem atividade de COH extremamente baixa.

Neste experimento notamos também um aumento da atividade de hidroxilação do *p*-nitrofenol (PNPH, *p*-nitrofenol hidroxilase) nos camundongos DBA-2 e C57BL/6 infectados, em relação aos respectivos controles (Figura 4.8). A atividade de PNPH (média \pm EPM) nos DBA-2 foi $1,44 \pm 0,07$ e $2,56 \pm 0,15$ nanomoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/minuto em camundongos não infectados ($N=18$) e infectados ($N=18$), respectivamente. Nos C57BL/6, a

atividade de PNPB foi $1,86 \pm 0,11$ e $2,39 \pm 0,17$ nanomoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/minuto em animais não infectados (N=19) e infectados (N=19), respectivamente. Embora haja evidências de que a atividade de PNPB em microsossomos humanos também é catalisada por CYP2A6 e 2C19 (Monostory *et al.*, 2004), Lofgren *et al.* (2004) sustentam que o *p*-nitrofenol é um marcador de CYP2E1 mais específico em camundongos do que em ratos. Assim sendo, poderíamos supor que a reação de PNPB pode ser um marcador específico de CYP2E1 em linhagens murinas que não expressam CYP2A5, mas pode ser não específico naquelas que expressam esta última isoforma (nesse caso PNPB refletiria tanto as atividades de CYP2E1 quanto de 2A5). Neste estudo, portanto, é possível que o aumento observado de PNPB seja um reflexo da indução de CYP2A5 (constatado com COH) e não de CYP2E1.

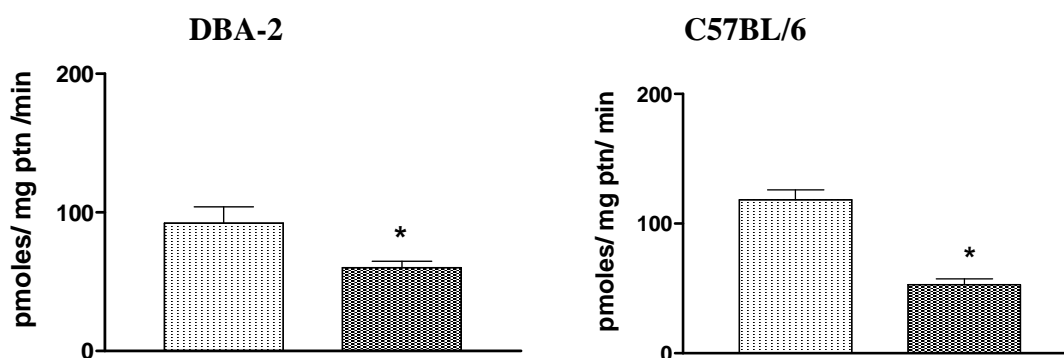


Figura 4.4 - Atividade de EROD em camundongos das linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadrado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como picomoles de resorufina/mg proteína/minuto. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

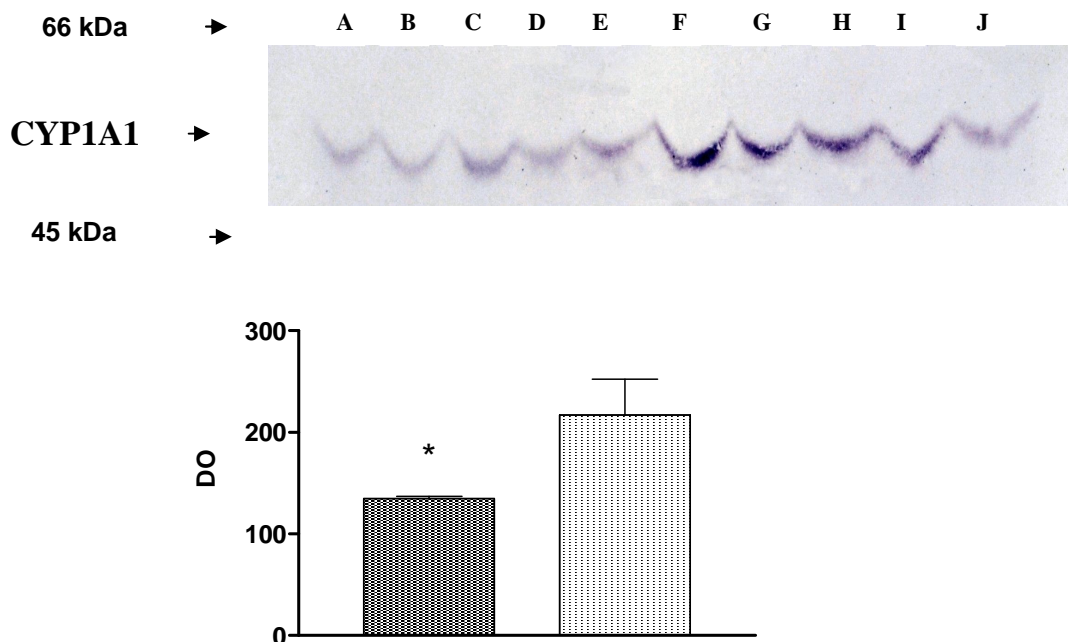


Figura 4.5 - Immunoblotting de CYP1A na fração microsossomal de camundongos DBA-2 infectados com *P. berghei* (10^6 HP/animal) e seus controles. As bandas A a E correspondem aos animais infectados e as bandas F a J correspondem aos animais controles. Colunas: médias \pm EP (DO = unidades arbitrárias) da densitometria das bandas (animais infectados, quadrado branco e negro e controles, pontilhado). Foi usado anticorpo anti-CYP1A1 de camundongo. Asterisco (*) indica diferença do controle ($p < 0,05$, Teste U de Mann-Whitney).

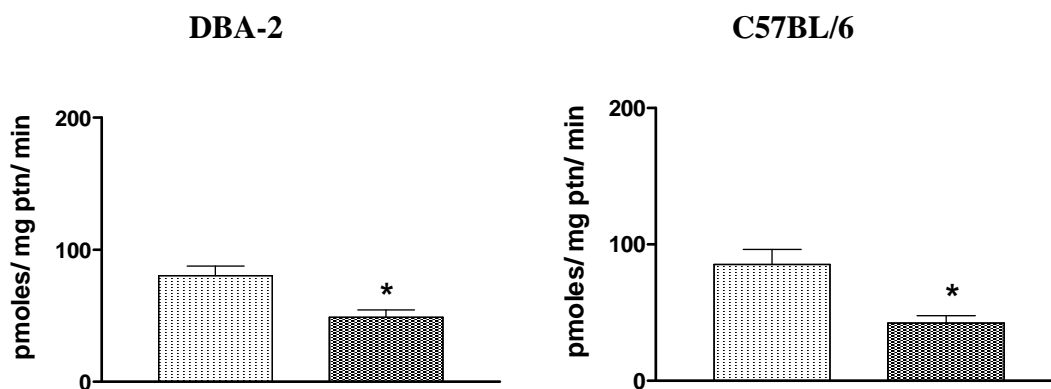


Figura 4.6 - Atividade de BROD nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como picomoles de resorufina/mg proteína/minuto. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

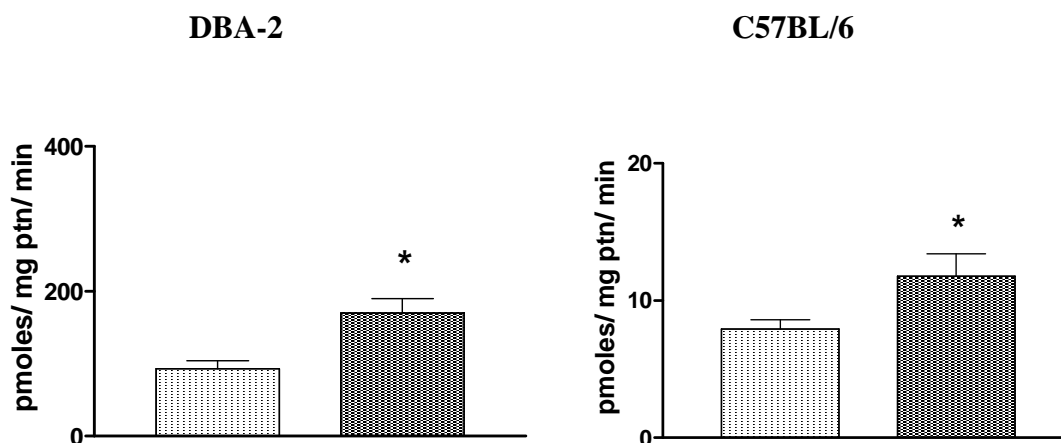


Figura 4.7 - Atividade de COH nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemáceas parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como picomoles de umbeliferona/mg proteína/minuto. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

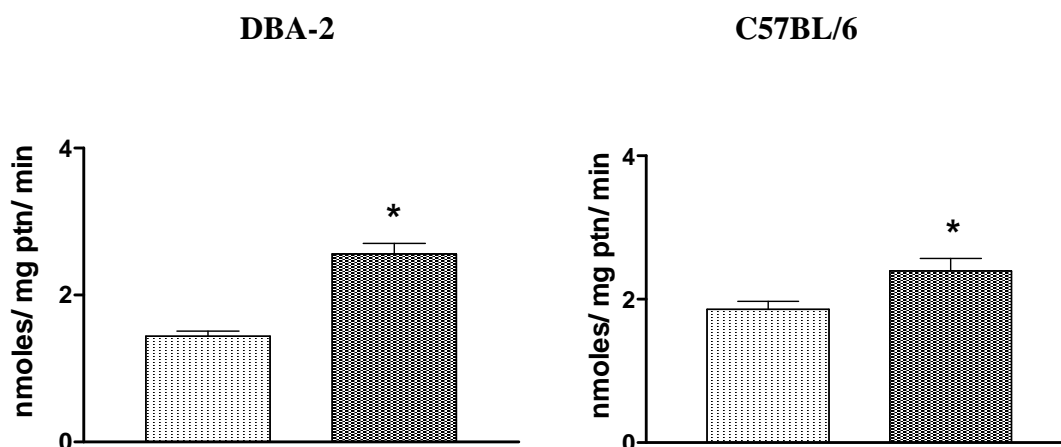


Figura 4.8 - Atividade de PNP nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como picomoles de 4-nitrocatecol/mg proteína/minuto. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

4.1.3 – Atividades de enzimas de conjugação no fígado de camundongos infectados com *P. berghei* (ANKA)

A atividade da uridina difosfo-glicuroniltransferase (UGT) na fração microsomal hepática de camundongos DBA-2 e C57BL/6 não diferiu entre animais infectados e respectivos controles não infectados (Figura 4.9). Nos DBA-2, as atividades de UGT (média \pm EPM) foram $8,43 \pm 3,2$ e $9,01 \pm 2,8$ nanomoles de glicuronato de *p*-nitrofenol/mg de proteína/minuto para os animais controles e infectados, respectivamente (N=8 em cada grupo). Entre os camundongos C57BL/6, as atividades da UGT foram $7,43 \pm 3,7$ e $5,55 \pm 3,0$ nanomoles de glicuronato de *p*-nitrofenol/mg de proteína/minuto para os animais controles e infectados (N=9 em cada grupo), respectivamente (Figura 4.9).

Da mesma forma que a UGT, a atividade da glutathione-S-transferase (GST) microsomal também não diferiu entre camundongos infectados e respectivos controles não infectados nas duas linhagens murinas. As atividades (média \pm EPM) da GST microsomal dos animais DBA-2 foram $80,4 \pm 4,45$ e $91,0 \pm 5,37$ nanomoles de glicuronato de 1,cloro-2,4-dinitrofenil glutathione/mg de proteína/minuto, para os animais controles e infectados, respectivamente (N=8 em cada grupo) (Figura 4.10). Nos C57BL/6, as atividades da GST microsomal foram $85,6 \pm 6,12$ e $95,89 \pm 2,69$ nmoles de conjugado/mg de proteína/minuto para controles e infectados, respectivamente (N=8 em cada grupo).

Não encontramos também diferenças entre controles não infectados e infectados em relação à atividade da GST citosólica, tanto entre os DBA-2 quanto entre os C57BL/6 (Figura 4.11). As atividades (média \pm EPM) da GST citosólica nas fêmeas DBA-2 foram $0,69 \pm 0,11$ e $0,79 \pm 0,13$ micromoles de glicuronato de 1,cloro-2,4-dinitrofenil-glutathione/mg de proteína/minuto nos animais controles (N=8) e infectados (N=8), respectivamente. No caso dos camundongos C57BL/6, as atividades da GST citosólica foram $1,37 \pm 0,08$ para os animais controles (N=6) e $1,55 \pm 0,14$ (N=8) para os infectados.

Em conjunto, esses resultados mostram que, diferentemente do observado com as isoformas CYP, enzimas microsomais da fase 1 do metabolismo, as enzimas de conjugação (fase 2) analisadas não foram alteradas pela malária, quer na fração microsomal, quer na fração citosólica.

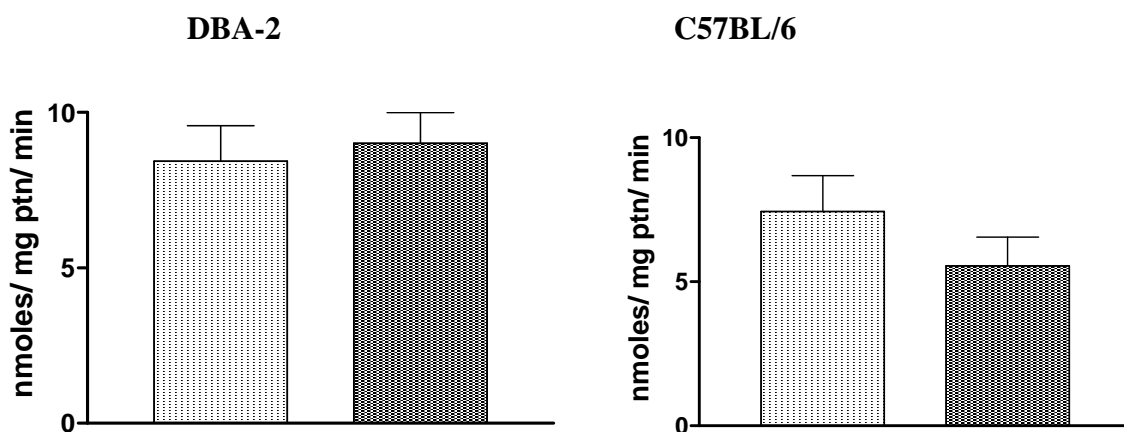


Figura 4.9 - Atividade de UGT nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como nanomoles de glicuronato de p-nitrofenol/mg proteína/minuto. As diferenças não são significativas (teste *t* de Student, $p > 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

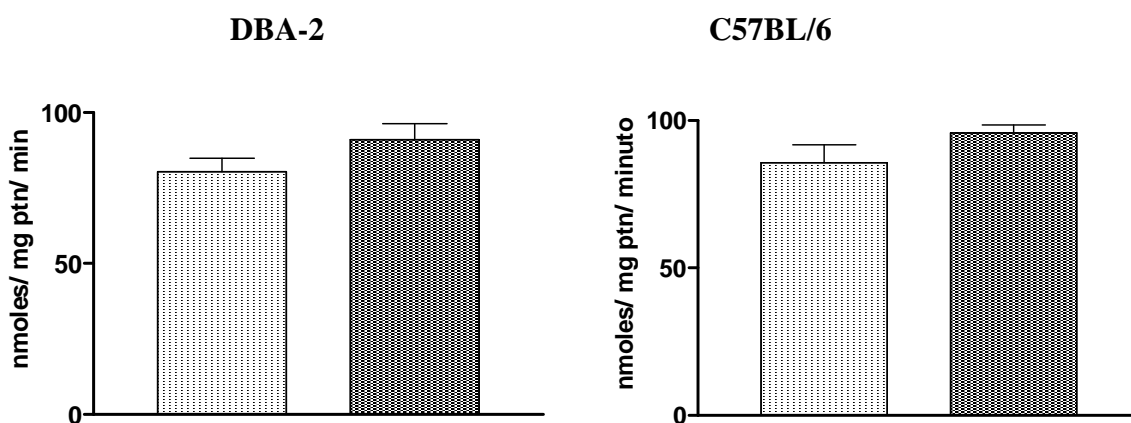


Figura 4.10 - Atividade da GST microsomal nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como nmoles de 1-cloro-2,4-dinitrofenil-glutationa/mg proteína/minuto. As diferenças não são significativas (teste *t* de Student, $p > 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

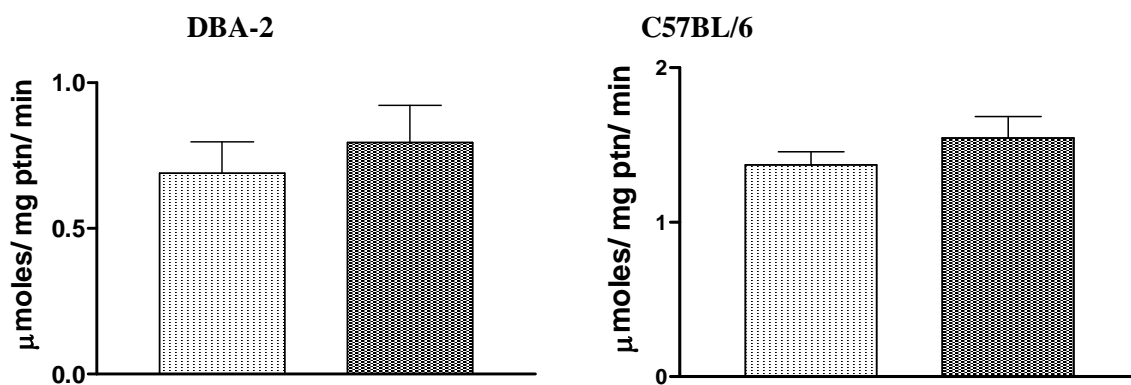


Figura 4.11 - Atividade de GST citosólica em camundongos DBA-2 e C57BL/6 infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadriculado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A atividade é expressa como μmoles de 1-cloro-2,4-dinitrofenil-glutationa/mg proteína/minuto. As diferenças não são significativas (teste *t* de Student, $p > 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

4.1.4 – Níveis hepáticos da glutathiona reduzida em camundongos infectados com *P. berghei* (ANKA)

Determinamos os níveis da glutathiona reduzida (GSH) no fígado de camundongos infectados e não infectados das linhagens examinadas neste estudo. Como pode ser visto na Figura 4.12, a infecção não alterou os níveis de GSH em camundongos DBA-2. As concentrações de glutathiona no fígado dos DBA2 controles (N=7) e infectados com *P. berghei* foram $86,29 \pm 3,04$ e $76,87 \pm 3,4$ nanomoles de glutathiona/mg de proteína, respectivamente. Entre os camundongos da linhagem C57BL/6, a infecção causou uma redução dos níveis hepáticos de GSH. Nos C57BL/6, as concentrações da glutathiona foram $28,4 \pm 3,91$ e $16,91 \pm 3,03$ nanomoles de glutathiona/mg proteína nos controles (N=6) e infectados (N=8), respectivamente. Esses resultados sugerem que na linhagem C57BL/6, que tem níveis basais de GSH menores do que a DBA-2, a infecção grave causou uma depleção moderada dos níveis hepáticos da glutathiona.

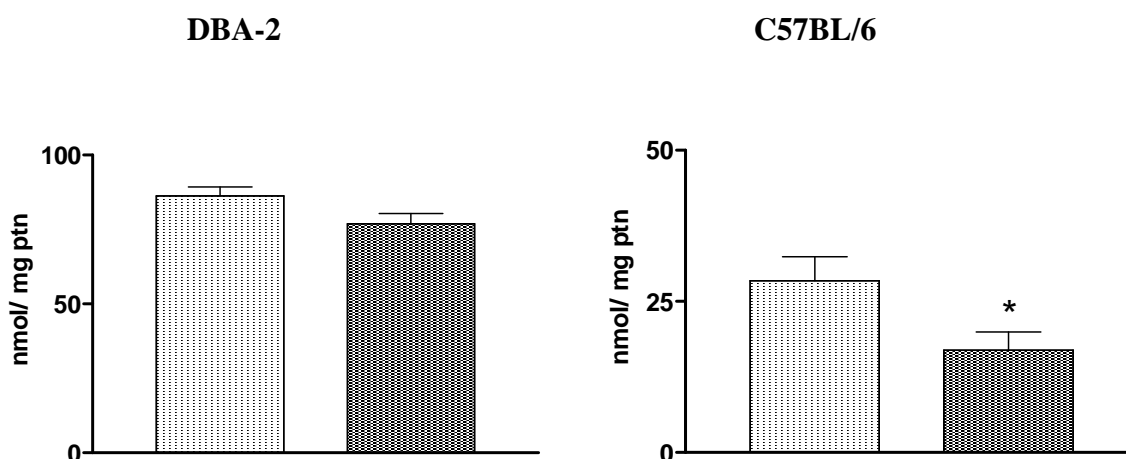


Figura 4.12 – Concentração da glutathiona reduzida (GSH) no sobrenadante hepático nas linhagens DBA-2 e C57BL/6 infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (quadrado branco e negro) e seus controles (pontilhado). A concentração da glutathiona é expressa como nmoles de glutathiona/mg proteína. As diferenças significativas estão assinaladas com um asterisco (teste *t* de Student, $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

4.2 – Modulação da genotoxicidade de xenobióticos pela infecção com *P. berghei* (ANKA)

O fato da malária causada pelo *P. berghei* ANKA alterar a atividade de isoformas CYP envolvidas no metabolismo de xenobióticos, sugere que a infecção deve modificar também a cinética e, portanto, os efeitos terapêuticos e tóxicos de fármacos e outras substâncias químicas. De certa forma, como mencionamos na Introdução deste trabalho, há

evidências de que isto ocorre em seres humanos durante episódios de malária. Foi demonstrado, por exemplo, que a eliminação de alguns fármacos antimaláricos (*e.g.*, quinina) e de outros xenobióticos (*e.g.*, antipirina) são mais lentos em pacientes com malária falciparum (Pukrittayakamee *et al.*, 1997). Não encontramos, entretanto, nenhum estudo experimental ou clínico que tivesse investigado eventuais modificações dos efeitos tóxicos de xenobióticos (*e.g.*, genotoxicidade e carcinogenicidade) durante a malária.

É interessante salientar que, neste estudo, verificamos que a malária altera a atividade de algumas isoformas CYP (CYP1A1/2, 2B9/10, 2A5 e 2E1) que têm papel de destaque na toxicologia, porque estão envolvidas na ativação e desintoxicação de substâncias genotóxicas e carcinogênicas de grande importância. A família CYP1, com as subfamílias 1A e 1B, por exemplo, participa da ativação metabólica, e também da desintoxicação, de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), importantes carcinógenos (genotóxicos) ambientais produzidos pela queima de combustíveis fósseis. As isoformas CYP2A5 (ortólogo murino da CYP2A6 humana) e 2E1, por outro lado, ativam os potentes carcinógenos N-nitrosodietilamina e N-nitrosodimetilamina, respectivamente (Fujita e Kamataki, 2001). As nitrosaminas são carcinógenos genotóxicos quase onipresentes no ambiente humano, sendo produzidas endogenamente pela flora do trato gastro-intestinal (TGI) a partir de alimentos ricos em nitratos/nitritos, e ocorrendo em grande quantidade na fumaça do cigarro, em borrachas e em vários outros produtos. As isoformas CYP da subfamília 2B, conjuntamente com as da 3A, têm importante papel na ativação de aflatoxinas, carcinógenos potentes produzidos pelo fungo *Aspergillus flavus* e contaminantes frequentes de cereais em regiões tropicais, além de ativar o fármaco antineoplásico – na verdade, pró-fármaco – ciclofosfamida (CPA). Embora a CPA seja utilizada no tratamento de vários tipos de cancer, em virtude da alta sensibilidade das células tumorais, ela é um agente alquilante do DNA e, portanto, produz efeitos genotóxicos e é capaz de induzir – anos após a cura do tumor primário – o aparecimento de tumores secundários nos pacientes tratados.

Verificamos que a malária altera a atividade de várias isoformas CYP, deprimindo algumas e induzindo outras. Além disso, via de regra, para os efeitos genotóxicos/carcinogênicos de xenobióticos, contribuem reações de ativação e desintoxicação catalisadas por diferentes enzimas. Neste contexto, não é possível antecipar, a partir apenas das alterações observadas de atividade e expressão de isoformas CYP, que impacto a infecção malárica teria no efeito genotóxico de determinado xenobiótico.

Este estudo foi realizado para investigar se e como a malária causada pelo *P. berghei* em camundongos C57BL/6 modula os efeitos de carcinógenos genotóxicos diretos e indiretos (*i.e.*, que dependem de ativação metabólica).

A genotoxicidade foi avaliada pela frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) com micronúcleos (MN-PCE) na medula óssea dos camundongos. Os PCEs são eritrócitos jovens encontrados na medula óssea que, tal como os eritrócitos maduros (normocromáticos, NCE), que são lançados na circulação, não apresentam mais núcleo. Embora o núcleo já tenha sido expulso, os PCEs (jovens), ao contrário dos NCEs (maduros), ainda exibem retículo endoplasmático remanescente, o que confere a eles coloração mais azulada (policromática) com o Giemsa, que os diferencia do aspecto mais homogêneo, normocromático dos NCEs. Em células nucleadas, os micronúcleos são pequenas massas de material nuclear que aparecem como um satélite do núcleo. Essas pequenas massas, que coram como o núcleo principal, correspondem a fragmentos de quebras cromossômicas ou a cromossomos inteiros, que são eliminados do núcleo na mitose. Os micronúcleos permanecem nos PCEs (MN-PCE) após a expulsão do núcleo na divisão das células precursoras, sendo de fácil visualização. Como os MNs resultam de quebras cromossômicas, com o aumento do dano (efeito genotóxico, clastogênico) há um aumento da frequência de células (PCEs) com micronúcleos (MN-PCEs) na medula. Neste tipo de ensaio, o efeito mielotóxico (sobre a proliferação das células da medula óssea) pode ser evidenciado pela alteração da razão entre eritrócitos jovens (PCEs) e maduros (NCEs) na medula.

4.2.1 Alteração da genotoxicidade da ciclofosfamida na infecção com *P. berghei* (ANKA)

Inicialmente, examinamos em camundongos C57BL/6 (fêmeas) não infectados (CON, controles) a relação entre a dose de ciclofosfamida (CPA) e a elevação da frequência de MN-PCEs na medula óssea removida 24 horas após o tratamento. Como mostrado na Figura 4.13 A, no intervalo de doses testado (12,5; 25 e 50 mg/kg i.p.), a CPA elevou de forma dose relacionada a frequência de células micronucleadas (MN-PCE), sem causar redução estatisticamente detectável da razão PCE/NCE, o que indica que, nestas doses, a CPA não deprimiu de forma significativa a proliferação celular na medula óssea. A partir desses resultados, escolhemos a dose intermediária CPA (25 mg/kg i.p.) para investigar se a infecção causada pelo *P. berghei* (ANKA) modificaria o efeito deste clastógeno. Os camundongos infectados (MAL) receberam uma injeção de CPA (25 mg/kg i.p.) quando exibiam parasitemias (mediana, mínimo-máximo) de 15,4% HP (9,2 - 30,3% HP) no dia 13 (13-16) após a infecção e foram mortos para remoção das medulas ósseas, 24 e 48 horas após o tratamento. Os controles não infectados (CON) receberam tratamento idêntico, sendo mortos concomitantemente com os infectados. A elevação da incidência de MN-PCE induzida pela CPA (25 mg/kg i.p.) foi atenuada, enquanto a razão PCE/NCE foi aumentada 24 horas após o tratamento nos camundongos infectados com *P. berghei* ANKA (MAL) em relação ao

observado nos respectivos controles não infectados (CON) (Figura 4.13 B). Quando as medulas foram removidas 48 horas após o tratamento com a CPA, a incidência de MN-PCEs foi consideravelmente menor tanto nos controles (CON) quanto nos infectados (MAL), não sendo mais detectada a diferença entre os dois grupos. A razão PCE/NCE, todavia, estava aumentada entre os infectados, sugerindo que ocorreu nestes animais uma estimulação da proliferação das células na medula óssea.

Esses resultados indicam que a malária (*P. berghei*) atenuou o efeito clastogênico da CPA, promutágeno que é ativado metabolicamente por isoformas CYP das subfamílias 2B e 3A. Em um outro grupo de camundongos C57BL/6, que não foram tratados com CPA, verificamos (tal como havíamos visto no experimento anteriormente relatado neste trabalho) que a atividade de BROD hepática, catalisada por CYP2B9/10, estava deprimida em camundongos infectados com *P. berghei* ANKA (parasitemia: 25%, 12-67% HP) em relação ao registrado em controles não infectados (Figura 4.16). Neste trabalho, não avaliamos diretamente o efeito da infecção sobre a atividade de isoformas da subfamília CYP3A, mas a depressão das atividades de CYP2B, constatada neste e no estudo anterior, é consistente com a interpretação de que a depressão das atividades dessas isoformas pela malária tornou mais lenta a conversão da CPA em seus metabólitos ativos, acarretando a atenuação do efeito genotóxico.

A CPA, como havíamos mencionado, é usada como medicamento (pró-farmaco) anti-tumoral e imunossupressor. Como os efeitos terapêuticos da CPA dependem da mesma via de ativação metabólica envolvida nos efeitos genotóxicos, os resultados aqui apresentados sugerem que os efeitos anti-tumorais e imunossupressores do fármaco também devem ser atenuados no curso da infecção malárica.

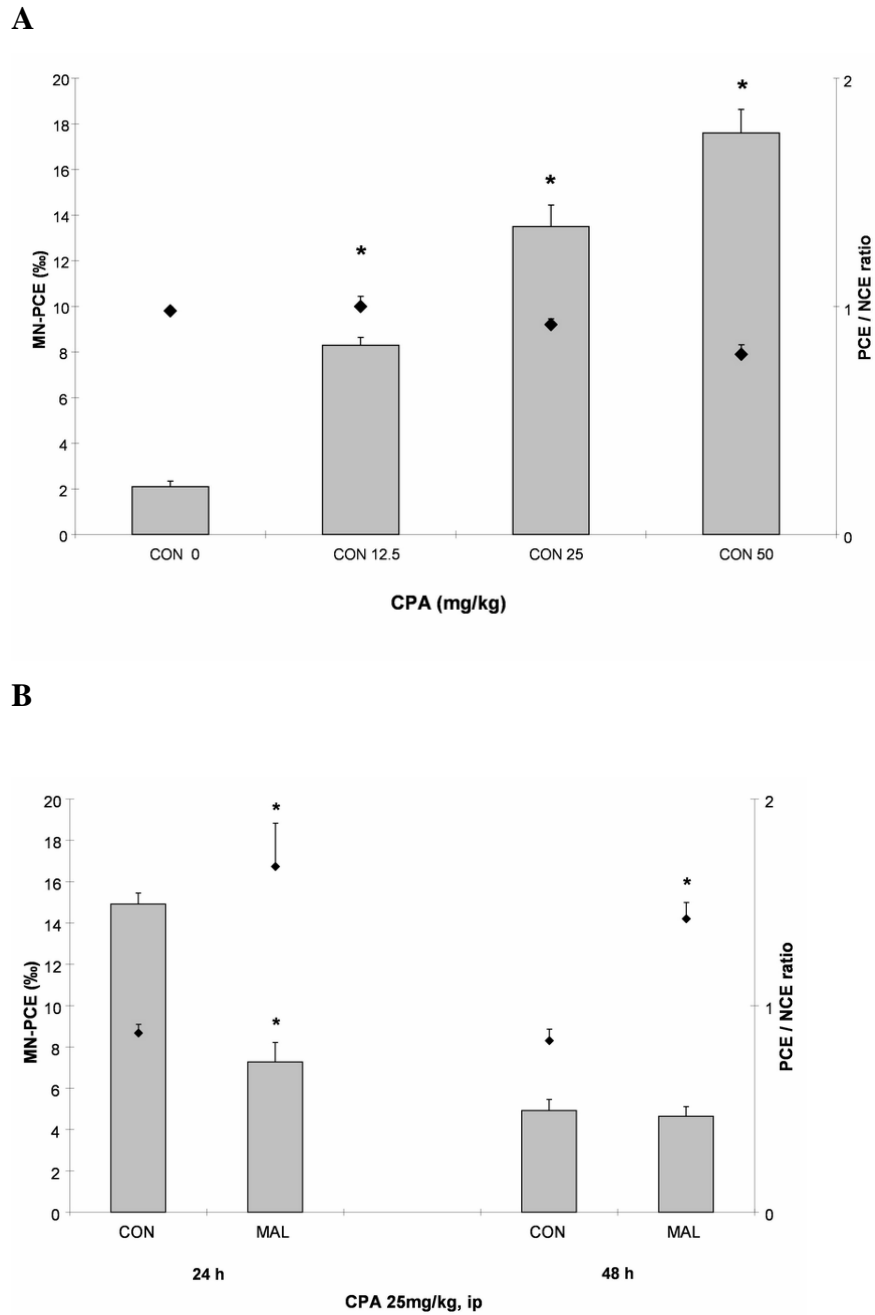


Figura 4.13 – (A) Efeito da ciclofosfamida (CPA 0, 12,5, 25 e 50 mg/kg i.p.) sobre a frequência (%) de MN-PCE (colunas) e razão PCE/NCE (losangos negros) na medula óssea de C57BL/6 não infectadas. (B) Efeitos da CPA (25 mg/kg i.p.) sobre a frequência (%) de MN-PCE (colunas) e razão PCE/NCE (losangos negros) na medula óssea de fêmeas C57BL/6 infectadas com *P. berghei* (MAL) e não infectadas (CON). A cultura da medula óssea durou 24 ou 48 horas. As comparações foram feitas com os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. As diferenças ($p < 0,05$) estão indicadas com um asterisco (* \neq CON 0). Os dados estão apresentados como médias \pm EPM.

4.2.2 Alteração da genotoxicidade do dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA) na infecção com *P. berghei* (ANKA)

A influência da infecção com *P. berghei* sobre o efeito genotóxico do DMBA em camundongos C57BL/6 fêmeas foi examinada de forma semelhante. Neste caso, entretanto, a dose do clastógeno (50 mg/kg i.p.) e o tempo ideal para remoção da medula óssea (48 horas pós-tratamento) foram escolhidos com base em estudos anteriores (não mostrados). Neste experimento, os camundongos apresentavam taxa de parasitemia (mediana, mínimo-máximo) de 30,0 % HP (9,7-68,0% HP) no dia pós-infecção (12, 10-14) em que foram tratados. Como pode ser visto na Figura 4.14, a infecção diminuiu o efeito clastogênico do DMBA (50 mg/kg i.p.), clastógeno que, como os demais PAHs, é ativado por isoformas da subfamília CYP1A. É interessante destacar que, nos microsossomos hepáticos dos mesmos camundongos não infectados (CON) e infectados (MAL), em que havíamos determinado a atividade de BROD, medimos também a atividade de EROD, mediada por isoformas CYP1A. A Figura 4.16 mostra que a atividade de EROD estava reduzida no fígado dos camundongos infectados (MAL), em relação aos controles não-infectados (CON), corroborando o que já havíamos visto no estudo anterior. Esses resultados são compatíveis com a interpretação de que a malária, deprimindo a atividade de isoformas CYP da subfamília 1A, torna mais lenta a conversão do DMBA (e possivelmente de outros PAHs) em seus metabólitos ativos e, consequentemente, atenua os seus efeitos genotóxicos.

4.2.3 Alteração da genotoxicidade do etilmetanosulfonato (EMS) na infecção com *P. berghei* (ANKA)

Neste trabalho, analisamos também o efeito da infecção com *P. berghei* (ANKA) sobre a genotoxicidade do EMS, um agente alquilante cuja clastogenicidade não depende de ativação metabólica. O efeito do EMS foi avaliado em camundongos infectados com taxas de parasitemia (mediana, mínimo-máximo) por volta de 15,2% HP (11,0-23,6% HP alcançadas por volta do dia 14 (9-14) após a infecção com *P. berghei* (ANKA). Neste caso, verificamos que o efeito do clastógeno direto (EMS) nos camundongos infectados (MAL) não foi atenuado, como ocorreu com os clastógenos indiretos CPA e DMBA, mas foi exacerbado em relação ao efeito registrado nos controles não-infectados (CON) (Figura 4.15). É conhecido que a molécula não transformada do EMS é capaz de alquilar o DNA e produzir o efeito clastogênico, mas não é claro como o EMS é metabolizado e eliminado no camundongo. Se a eliminação do EMS depender de oxidações mediadas por isoformas CYP, cuja atividade é deprimida na malária, é possível que a exacerbação do efeito genotóxico observado no presente estudo tenha sido devida à eliminação mais lenta do clastógeno em questão.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados indicam que a genotoxicidade de xenobióticos é modulada na malária causada pelo *P. berghei* (ANKA) em camundongos C57BL/6. Nesse caso, a infecção atenuou o efeito genotóxico de clastógenos que dependem de ativação metabólica, mediada por isoformas das subfamílias 1A, 2B e 3A, e, por outro lado, exacerbou o efeito de um clastógeno direto. Essa modulação pode ter sido devida à depressão da atividade das isoformas envolvidas na conversão dos clastógenos indiretos em seus metabólitos ativos, e à diminuição das atividades de isoformas CYPs que catalisam reações importantes para a eliminação do clastógeno direto.

Esta primeira etapa do trabalho já foi publicada e consta do ANEXO 2 (Trabalhos Publicados).

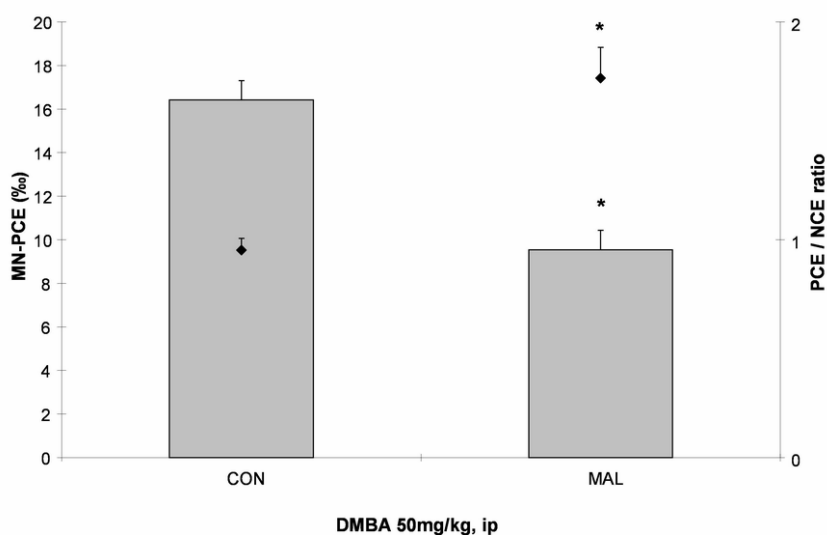


Figura 4.14 – Frequência (%) de MN-PCE (colunas) e razão PCE/NCE (losangos negros) na medula óssea de fêmeas C57BL/6 não infectadas (CON) e infectadas com *P. berghei* (MAL) tratadas com 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA, 50 mg/kg i.p.). As diferenças ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney) entre tratados e controles estão assinaladas com um asterisco (*). Os dados estão apresentados como médias±EPM.

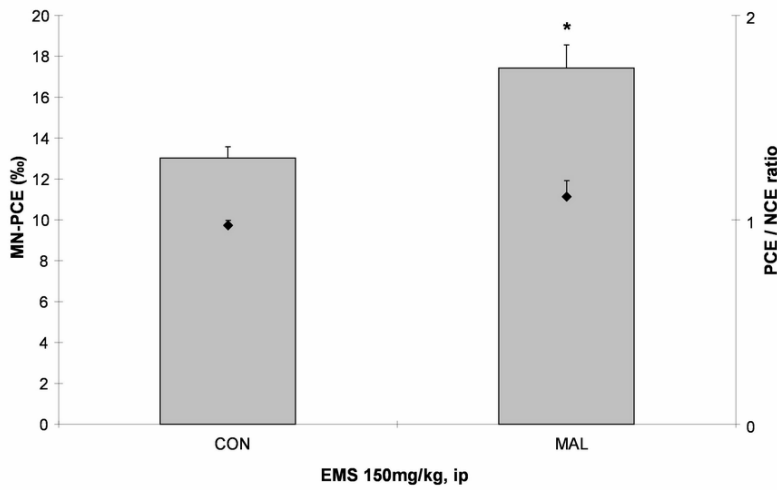


Figura 4.15 – Frequência (%) de MN-PCE (colunas) e razão PCE/NCE (losangos negros) na medula óssea de fêmeas C57BL/6 não infectadas (CON) e infectadas com *P. berghei* (MAL) tratadas com etilmetanosulfonato (EMS 150 mg/kg i.p.). As diferenças ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney) entre tratados e controles estão assinaladas com um asterisco (*). Os dados estão apresentados como médias \pm EPM.

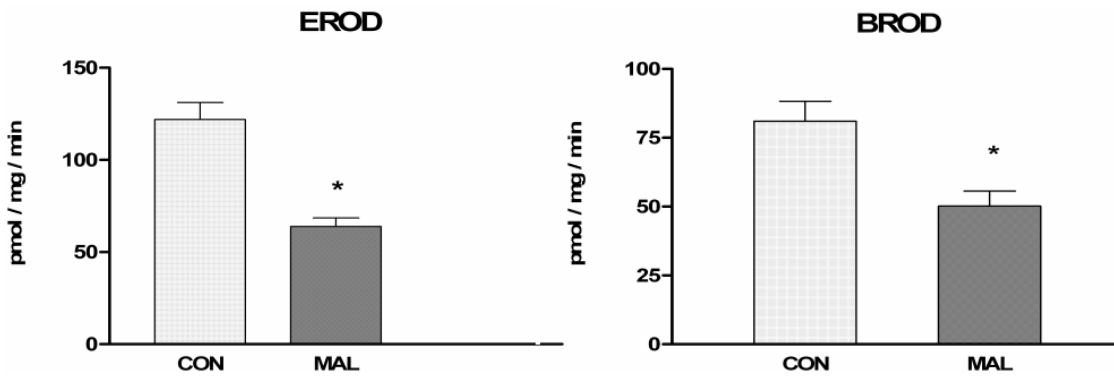


Figura 4.16 – Atividades de EROD e BROD na linhagem C57BL/6 infectada com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* e controles. A atividade é expressa como picomoles de resorufina/mg proteína/minuto. O asterisco (*) indica que o grupo infectado difere do controle (teste *t* de Student $p < 0,05$). As colunas representam médias \pm EPM.

4.3 – Modulação da atividade de enzimas citocromo P450 hepáticas durante a evolução temporal da malária letal (*P. berghei* ANKA) e não-letal (*P. chabaudi*) em camundongos

Na primeira etapa deste trabalho, verificamos que no quadro da malária grave (terminal) causada pela infecção de camundongos (C57BL/6 e DBA-2) com *P. berghei* ANKA, ocorria uma depressão das atividades catalíticas de isoformas das subfamílias CYP1A (EROD) e 2B (BROD), que contrastava com a exacerbação das reações de hidroxilação da cumarina (COH, mediada por CYP2A5) e do *p*-nitrofenol (PNPH, CYP2E1) na fração microsomal hepática. Constatamos ainda que neste quadro de malária grave, as atividades de enzimas microsomais (UGT e GST) e citosólicas (GST) de conjugação (fase 2) e os níveis da glutatona permaneceram inalterados no fígado dos dois hospedeiros.

Nesta segunda etapa, investigamos as alterações da atividade catalítica das enzimas das subfamílias CYP1A (EROD) e 2B (BROD), e da isoforma CYP2A5 (COH), que ocorrem ao longo da evolução clínica da malária letal (*P. berghei* ANKA) e não-letal (*P. chabaudi*) nas duas linhagens de camundongos.

4.3.1 – Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção letal (*P. berghei* ANKA) em camundongos DBA-2

Os camundongos DBA-2 fêmeas infectados com *P. berghei* ANKA nesta etapa apresentaram uma evolução clínica semelhante à que havíamos observado na etapa anterior. As taxas de parasitemia alcançaram 6,78% HP no dia quatro, 26% HP no dia 16, e aproximadamente 40% HP no dia 20 após a infecção (Figura 4.17). Sintomas como progressiva perda de peso, piloereção e hipoatividade começaram a aparecer a partir do dia 8 e estiveram presentes até o dia 20 após a infecção. No dia 20 pós-infecção, alguns animais apresentavam também taquipnéia e aparentavam estar moribundos. A partir do dia 20 houve elevada mortalidade (mortes devidas à infecção e, portanto, não programadas) entre os camundongos DBA-2 infectados, razão pela qual este foi o tempo mais longo de evolução da infecção analisado neste experimento.

Como pode ser visto na Figura 4.17, nos camundongos infectados o peso do baço aumentou consideravelmente a partir do dia 8, atingindo nos dias 16 e 20 pós-infecção, peso (700 ± 30 mg) que correspondia a quase 10 vezes o peso ($80 \text{ mg} \pm 40 \text{ mg}$) do órgão nos animais controles não-infectados. A hepatomegalia nos camundongos infectados foi mais discreta (menos que 2 vezes) e mais tardia do que a esplenomegalia, sendo detectada apenas a partir do dia 16 pós-infecção (Figura 4.17). Tanto o baço quanto o fígado dos animais infectados além de estarem aumentados, apresentavam também uma coloração negra.

Plasmodium berghei ANKA

Camundongos DBA-2 ♀

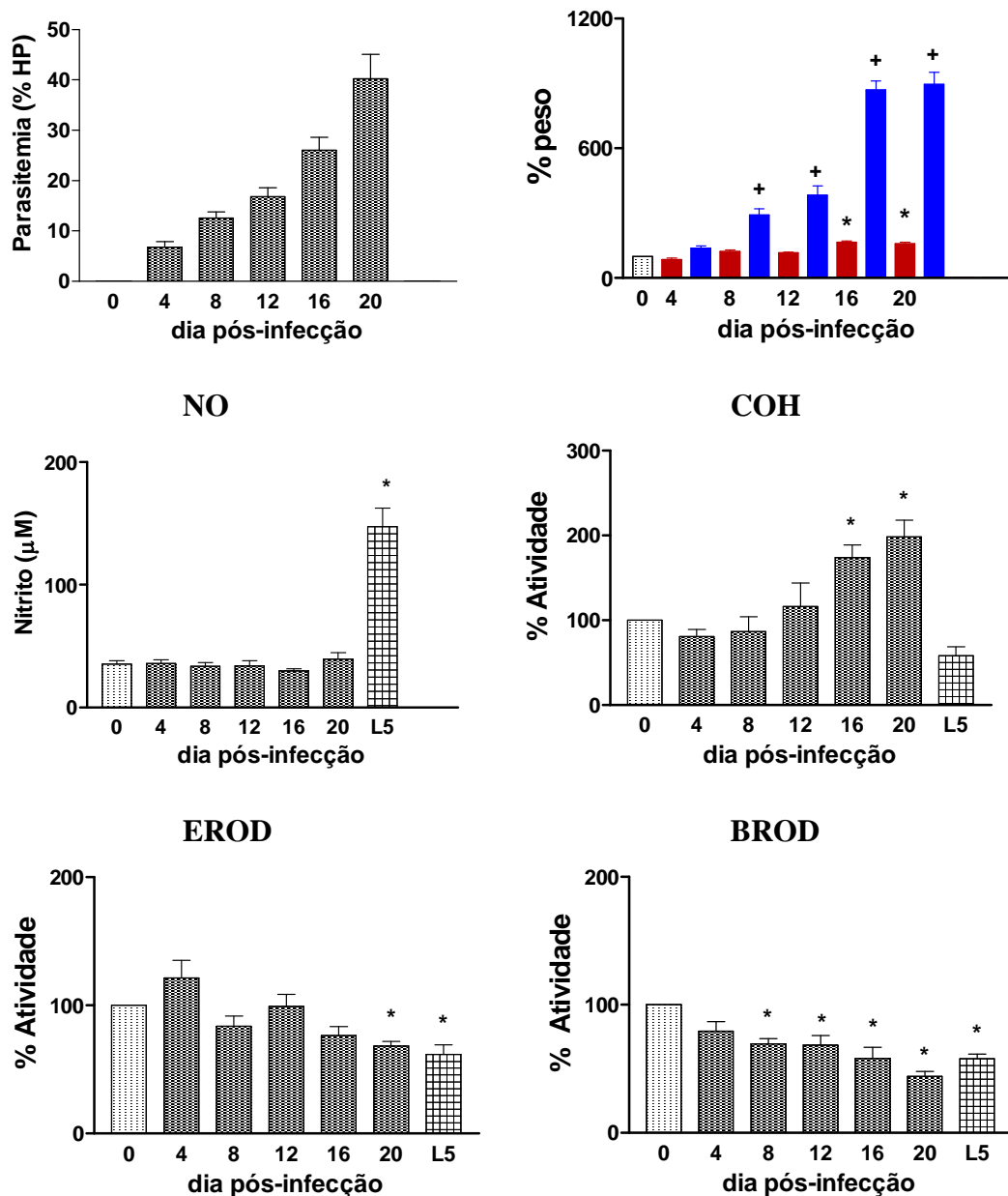


Figura 4.17 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP2A5 (COH), 1A1/2 (EROD) e 2B9/10 (BROD) em microsomas hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas) infectados com *P. berghei* ANKA. Os painéis mostram as alterações, a partir do dia da infecção (dia 0, 10^6 HP/animal i.p.), da taxa de parasitemia (% HP), do peso do fígado e baço (%), da concentração sérica de nitrito (μ M) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD), e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases. Os pesos dos órgãos e as atividades enzimáticas estão representados como % do valor médio dos controles não infectados (dia 0 =100 %). Os valores são médias \pm EPM. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*) para as atividades e peso do fígado (vermelho) ou cruz (+) para o peso do baço (azul). Os valores (100 %) dos controles foram: peso do fígado = $0,99 \pm 0,02$ g; peso do baço = $0,08 \pm 0,04$ g; COH = $193,86 \pm 27,01$ umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $94,73 \pm 40,98$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $74,62 \pm 21,17$ pmol resorufina/mg ptn/min. L5: LPS 5 mg/kg peso i.p., 6 horas antes.

A concentração de óxido nítrico (NO) permaneceu inalterada no soro dos camundongos infectados com *P. berghei* (ANKA), não diferindo dos níveis de NO registrados nos animais controles não infectados ($35,37 \pm 2,76 \mu\text{M}$) durante a evolução da doença, (*i.e.*, nos dias 4, 8, 12, 16 e 20 pós-infecção). Esta ausência de efeito da malária sobre os níveis séricos de NO contrasta com a acentuada elevação produzida pela injeção de LPS (5 mg/kg *i.p.*, 6 horas antes) em camundongos DBA-2 não-infectados (Figura 4.17).

Tal como havia sido observado na etapa anterior deste trabalho, o *P. berghei* ANKA causou, quando a infecção atingiu alta morbidade e níveis elevados de parasitemia (maior que 20% HP), depressão das atividades catalíticas de CYP1A (EROD) e 2B9/10 (BROD) que contrasta com a indução de CYP2A5 (COH) no fígado dos camundongos DBA-2 (Figura 4.17). Nesta etapa, foi possível verificar que a depressão da atividade de CYP1A e a indução de CYP2A5 só aparecem no estágio avançado de evolução da malária, (*i.e.*, a partir do dia 16 após a infecção), quando a parasitemia é superior a 25% HP e hepatomegalia e acentuada esplenomegalia estão presentes. A supressão da atividade de CYP2B9/10, entretanto, foi progressiva ao longo da infecção e detectada mais precocemente, no dia 8 pós-infecção, quando a taxa de parasitemia ainda não era muito alta (*i.e.*, aproximadamente 12% HP), não havia aumento visível do fígado e a esplenomegalia era apenas moderada (Figura 4.17).

O LPS de *E. coli* administrado por via *i.p.* na dose de 5 mg/kg causou, seis horas após a injeção, redução das atividades de CYP1A (EROD) e 2B9/10 (BROD), comparável à produzida pelo *P. berghei* ANKA no dia 20 pós-infecção mas, ao contrário do parasito, a endotoxina não alterou a atividade de CYP2A5 (COH) (Figura 4.17).

4.3.2 – Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção letal (*P. berghei* ANKA) em camundongos C57BL/6

Nos camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA, a parasitemia já havia atingido 9,25% HP no dia 2, caiu para 5,5% HP no dia 4, retornou a 9,38% HP no dia 6 e manteve-se em 14,11 e 13,9% HP nos dias 8 e 10 pós-infecção (Figura 4.18). Os camundongos infectados permaneceram praticamente assintomáticos até o dia 8 pós-infecção, quando começaram a apresentar sintomas compatíveis com comprometimento neurológico (malária cerebral) tais como hipoatividade, ataxia e *roll over*. Nos dias 9 e 10 houve acentuada mortalidade entre os animais infectados de modo que, de um grupo de sete camundongos que haviam sido destinados a avaliação no dia 10 pós-infecção, apenas três sobreviveram (42,9%) até o dia programado para a morte dos animais. Neste experimento, nenhum camundongo infectado com *P. berghei* sobreviveu além do dia 10 pós-infecção, não sendo possível, portanto, realizar as avaliações programadas para datas posteriores. Não

ocorreram, por outro lado, mortes não programadas entre os controles não-infectados. As concentrações de nitrito/nitrato sérico (NO) nos camundongos infectados não diferiram das registradas nos controles não infectados ($37,97 \pm 2,4 \mu\text{M}$, média \pm EPM) durante a evolução da infecção (dias 2, 4, 6, 8 e 10 pós-infecção), embora um grupo de camundongos não infectados tratados com LPS (5 mg/kg i.p., 6 h pós-tratamento) tenha apresentado, como esperado, acentuada elevação do NO sérico (Figura 4.18). O peso do fígado dos camundongos infectados com *P. berghei* não diferiu daquele dos controles não-infectados nos dias 2, 4, 6, 8 e 10 pós-infecção. O peso do baço, entretanto, aumentou nos animais infectados em relação ao peso do órgão nos controles não-infectados ($90 \pm 10 \text{ mg} = 100 \%$), a partir do dia 6 ($130 \pm 5 \text{ mg}$), mantendo-se entre $170 \pm 7 \text{ mg}$ e $140 \pm 30 \text{ mg}$, entre os dias 8 e 10 pós-infecção, respectivamente (Figura 4.18).

Neste experimento, em que a infecção dos camundongos C57BL/6 com *P. berghei* ANKA evoluiu a curto prazo (oito a dez dias), predominantemente para um quadro de malária cerebral com desfecho letal, não observamos alterações das atividades catalíticas de CYP1A (EROD) e 2B (BROD) em relação às atividades registradas em microsossomos hepáticos de controles não-infectados (Figura 4.18). As médias das atividades de CYP2A5 (COH) nos camundongos infectados foram, aparentemente, mais elevadas do que as registradas nos controles não infectados, particularmente nos dias 8 e 10 pós-infecção, mas possivelmente em decorrência da grande dispersão (DP) dos valores individuais em torno da média e do tamanho da amostra, a análise estatística não detectou diferenças entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$) (Figura 4.18). Digno de nota também é o fato do tratamento com LPS (5 mg/kg i.p.) ter elevado os níveis de NO, mas não ter alterado significativamente as atividades catalíticas de CYP1A (EROD), 2B (BROD) e 2A5 (COH), seis horas após o tratamento. É possível que no C57BL/6, a depressão de CYP1A e 2B por esta dose de LPS possa ocorrer em um momento mais tarde, diferente do que notamos no DBA-2.

A evolução clínica da infecção dos camundongos C57BL/6 com *P. berghei* ANKA nesta etapa diferiu daquela observada na primeira etapa deste trabalho. Embora na etapa anterior tivéssemos notado alguns animais com sintomas neurológicos sugestivos de malária cerebral, que evoluíam a curto prazo para a morte sem atingir parasitemias muito elevadas, a maior parte dos camundongos infectados progrediu para quadros com elevada parasitemia, piloereção e taquipnéia acentuadas. Na primeira etapa, a infecção evoluiu por mais tempo antes dos camundongos serem mortos (dia 12 ou posterior), ocasião em que exibiam também hepato e esplenomegalias bem mais acentuadas. Não é claro que fatores determinaram essa diferença entre os experimentos quanto à proporção de camundongos infectados que evoluíram para um quadro de malária cerebral (mesmo inóculo, parasita e hospedeiro). De

qualquer modo, o fato de não termos reproduzido no segundo experimento a depressão de CYP1A e 2B e indução de CYP2A5 observadas nos C57BL/6 no primeiro experimento, provavelmente ocorreu devido às diferenças entre experimentos em termos de evolução clínica da infecção.

4.3.3 - Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção não letal (*P. chabaudi chabaudi*) em camundongos C57BL/6

Para investigar a modulação das atividades de CYP em modelo murino de malária não-letal (infecção com *Plasmodium chabaudi chabaudi*), realizamos um experimento preliminar em que acompanhamos a evolução da parasitemia no camundongo C57BL/6 após a injeção de 2×10^7 HP por via intraperitoneal (Figura 4.19, gráfico superior).

Neste experimento, a taxa de parasitemia foi 2,9% HP vinte e quatro horas após a inoculação, aumentando gradualmente a partir de então até alcançar o máximo de 38,4% HP (pico de parasitemia) no dia 5 pós-infecção. No dia 9 pós-infecção, as taxas em queda chegaram a 5,33% HP, permanecendo em níveis semelhantes até o dia 19 pós-infecção, quando a taxa de parasitemia atingiu níveis inferiores a 1%.

A partir do curso temporal da parasitemia determinado neste experimento preliminar, definimos que as avaliações das atividades das CYPs hepáticas seriam realizadas no início da infecção (dia 2), no dia do pico da parasitemia (dia 5) e próximo a ele (dia 6), no período de recuperação pós-pico quando a parasitemia retornou a níveis baixos (dias 10 e 14) e, por último, quando a infecção evoluía francamente para a cura com parasitemia inferior a 1% (dia 19 pós-infecção).

No experimento subsequente, em que avaliamos o efeito da infecção não letal (*P. chabaudi*) sobre a atividade de CYPs hepáticos, a evolução temporal da parasitemia seguiu o mesmo padrão registrado no experimento preliminar, mas no dia do pico (dia 5 pós-infecção), as taxas de parasitemia atingiram 50% HP (Figura 4.20).

Até o dia 5 pós-infecção, os camundongos C57BL/6 estavam praticamente assintomáticos e na necrópsia (dia 2), fígados e baços apresentavam tamanho e aspecto normais. Nos dias de parasitemia máxima - dias 5 e 6 - notamos piloereção moderada e discreta hipoatividade. Esses sinais clínicos, menos intensos e frequentes do que os aparentes na infecção com *P. berghei*, foram os únicos notados nos camundongos infectados com *P. chabaudi* e, praticamente, desapareceram no período de recuperação que se seguiu ao dia do pico de parasitemia. No dia 5, o peso e o aspecto do fígado permaneciam inalterados, mas o peso do baço estava aumentado. A partir do dia 6 pós-infecção, o peso do fígado dos infectados não diferia do peso dos controles, mas o baço estava aumentado e nos infectados,

os dois órgãos tornaram-se mais escuros, adquirindo tonalidade parda. A partir do dia 10, fígados e baços dos camundongos infectados adquiriram cor negra.

Plasmodium berghei ANKA

Camundongos C57BL/6 ♀

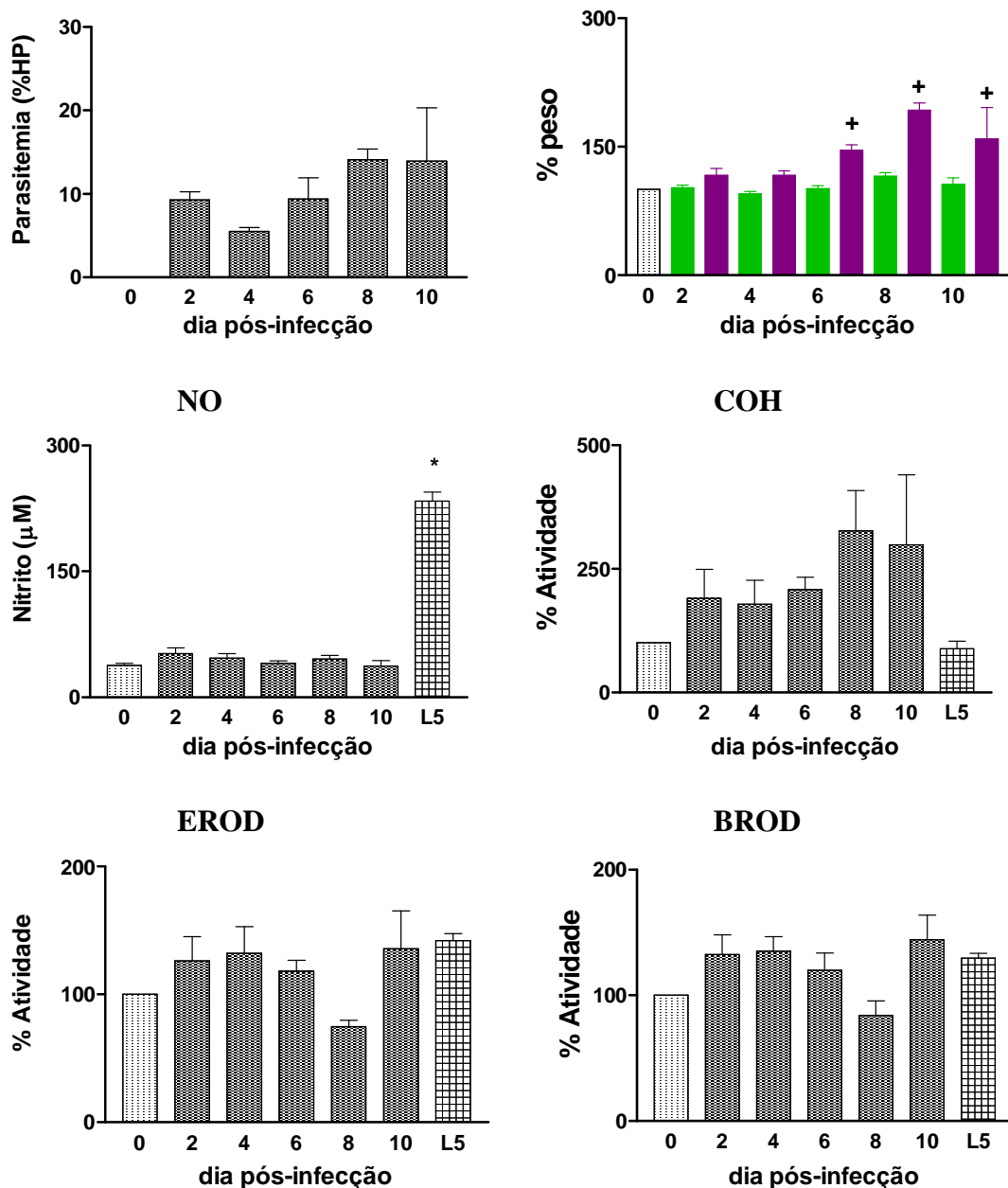


Figura 4.18 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP2A5 (COH), 1A1/2 (EROD) e 2B9/10 (BROD) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas) infectados com *P. berghei* ANKA. Os painéis mostram as alterações, a partir do dia da infecção (dia 0, 10⁶HP/animal i.p.), da taxa de parasitemia (%HP), do peso do fígado e baço (%), da concentração sérica de nitrito (µM) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD), e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases. Os pesos dos órgãos e as atividades enzimáticas estão representados como % do valor médio dos controles não infectados (dia 0 =100%). Os valores são médias±EPM. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles (p<0,05) são assinaladas por um asterisco (*) para as atividades e peso do fígado (verde) ou cruz (†) para o peso do baço (roxo). Os valores (100%) dos controles foram: peso do fígado = 0,99±0,05 g; peso do baço = 0,09±0,01 g; COH = 9,81±2,48 umbeliferona/mg ptn/min; EROD = 103,14±33,49 pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = 87,29±12,3 pmol resorufina/mg ptn/min. L5: LPS 5 mg/kg peso i.p., 6 horas antes.

A hepatomegalia (aumento de 1,6 vezes em relação aos controles) foi detectada apenas nos dias 14 e 19 pós-infecção. A esplenomegalia, detectada inicialmente no dia 5 (aumento de 3,7 vezes em relação aos controles), acentuou-se progressivamente no período pós-pico de parasitemia, de tal forma que no dia 19 pós-infecção, os baços dos infectados pesavam 13,5 vezes mais do que os baços dos controles não-infectados (Figura 4.20). Como esperado, não foram observadas mortes (não programadas) entre camundongos infectados e respectivos controles não-infectados.

A infecção elevou apenas discretamente (menos que 1,5 vezes) os níveis séricos de óxido nítrico (NO) no dia de pico (dia 5 pós-infecção) da parasitemia (*i.e.*, $68,65 \pm 6,56 \mu\text{M}$ nos infectados contra $51,12 \pm 2,36 \mu\text{M}$ nos controles não-infectados). Não houve qualquer outra alteração dos níveis séricos de NO nos camundongos C57BL/6 durante a evolução da infecção com *P. chabaudi* (Figura 4.20). Digno de registro, entretanto, foi o fato do soro dos infectados nos dias de parasitemia mais elevada (dias 5 e 6 pós-infecção) apresentar cor fortemente avermelhada, indicando a ocorrência de hemólise. Por outro lado, o soro dos camundongos controles, assim como o dos infectados em todos os outros dias, pré- e pós-pico de parasitemia, foi consistentemente límpido. Assim, a hemólise neste dia específico, provavelmente foi devida à evolução da infecção com *P. chabaudi* e não ao procedimento de coleta e manipulação do sangue dos camundongos.

Nos camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi*, a atividade catalítica da CYP1A (EROD) hepática foi deprimida em relação à atividade registrada nos respectivos controles não infectados (dia 0) nos dias 2, 5 e 6 (44%, efeito mais intenso) pós-infecção, enquanto a atividade de CYP2B9/10 (BROD) foi reduzida (20%) apenas no dia do pico de parasitemia (dia 5) (Figura 4.20). A atividade catalítica de CYP2A5 (COH), por outro lado, permaneceu inalterada, não diferindo da atividade dos controles não infectados em nenhum momento da evolução da malária não letal em fêmeas C57BL/6 (Figura 4.20).

4.3.4 – Alterações das atividades de CYP1A, 2B e 2A5 durante a evolução da infecção não letal (*P. chabaudi chabaudi*) em camundongos DBA-2

Antes de investigar a modulação de CYP durante a evolução da malária murina não letal em camundongos DBA-2 determinamos, em ensaio preliminar, a evolução temporal da parasitemia em camundongos fêmeas desta linhagem infectados com *P. chabaudi chabaudi* (inóculo = 2×10^7 HP i.p.). Como pode ser visto na Figura 4.19, a evolução temporal da parasitemia foi semelhante à observada na infecção da linhagem C57BL/6 com o *P. chabaudi* (taxa máxima de parasitemia no dia 5), exceto pelo fato dos DBA-2 exibirem um segundo pico de parasitemia, de menor amplitude, nos dias 14-15 pós-infecção (Figura 4.19). A partir

dessa observação preliminar, escolhemos os dias 2 (pré-pico), 5 e 6 (pico de parasitemia), 10 (“vale”, ou dia de parasitemia baixa pós-pico principal), 14 (pico secundário de menor amplitude) e 19 pós-infecção (recuperação após o segundo pico) para analisar as alterações de atividade de CYP durante a malária não letal em camundongos DBA-2.

No experimento principal, o curso temporal das alterações da taxa de parasitemia dos camundongos DBA-2 infectados reproduziu, essencialmente, o que havia sido observado no ensaio preliminar (*i.e.*, o pico da parasitemia ocorreu no dia 5, 38,6% HP, caindo para 21,44% HP no dia 6 e 1,98% HP no dia 10, subindo novamente para 20,56% HP - segundo pico - no dia 14 e declinando para taxas inferiores a 1% no dia 19 pós-infecção (Figura 4.21).

Sinais clínicos de infecção (piloereção moderada e hipoatividade discreta) apareceram apenas nos dois dias de parasitemia mais elevada (dias 5 e 6 pós-infecção), evoluindo a infecção praticamente de forma assintomática fora deste curto intervalo. O aspecto do fígado e do baço examinados na necrópsia não diferiu entre infectados e controles não-infectados até o dia 6 pós-infecção. No dia 10 pós-infecção, entretanto, os dois órgãos exibiam cor negra e assim permaneceram até o último dia (dia 19) pós-infecção em que foram examinados. O peso do fígado estava aumentado no dia 10 pós-infecção (120%), e assim manteve-se nos dias subsequentes (14 e 19). A esplenomegalia, por outro lado, foi constatada no dia 5 (300%), progredindo a partir de então, a ponto do peso do baço atingir aproximadamente 600% do peso do órgão dos controles não infectados (=100%) entre os dias 10 e 19 pós-infecção (Figura 4.21).

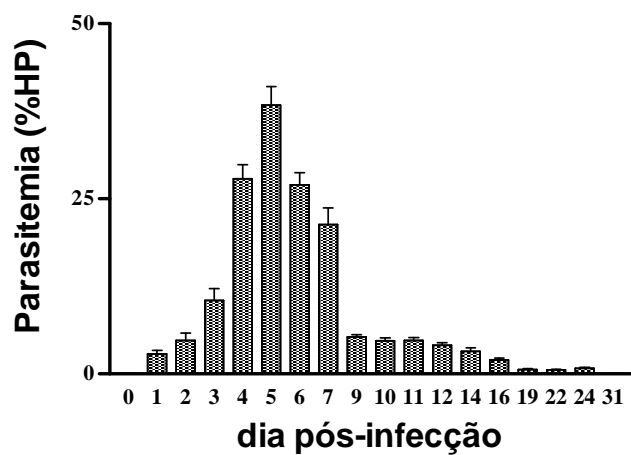
No dia 6 pós-infecção, as concentrações de nitrito sérico (NO) dos camundongos infectados ($65,41 \pm 6,39 \mu\text{M}$) estava discretamente aumentada (1,5 vezes) em relação aos níveis registrados nos respectivos controles ($42,25 \pm 1,7 \mu\text{M}$). Este foi, todavia, o único momento da evolução da infecção com *P. chabaudi* em que os níveis de NO no soro sanguíneo diferiram entre camundongos controles e infectados (Figura 4.21). Da mesma forma que ocorreu com os camundongos C57BL/6, o soro dos camundongos DBA-2 exibia cor fortemente avermelhada nos dias 5 e 6 pós-infecção, sugerindo a ocorrência de hemólise. O soro dos controles não infectados e os soros dos animais infectados obtidos antes e depois deste curto intervalo estavam consistentemente límpidos. Não ocorreram mortes não programadas de camundongos controles ou infectados confirmando que, como esperado, a infecção com *P. chabaudi* não foi letal.

Em contraste com o que havíamos observado com os camundongos C57BL/6, as atividades catalíticas de CYP1A (EROD) e 2B9/10 (BROD) permaneceram inalteradas no fígado durante toda a evolução clínica da infecção não letal (*P. chabaudi*) nos DBA-2 (Figura 4.21). A atividade catalítica de CYP2A5 (COH) dos DBA-2, entretanto, estava claramente

induzida (80%) no dia da parasitemia máxima (dia 5 pós-infecção) neste modelo de malária não letal (COH, controles *versus* infectados, $149,43 \pm 8$ vs $273,58 \pm 30,30$ pmoles umbeliferona/mg proteína/minuto) (Figura 4.21).

Plasmodium chabaudi

Camundongos C57BL/6 ♀



Camundongos DBA-2 ♀

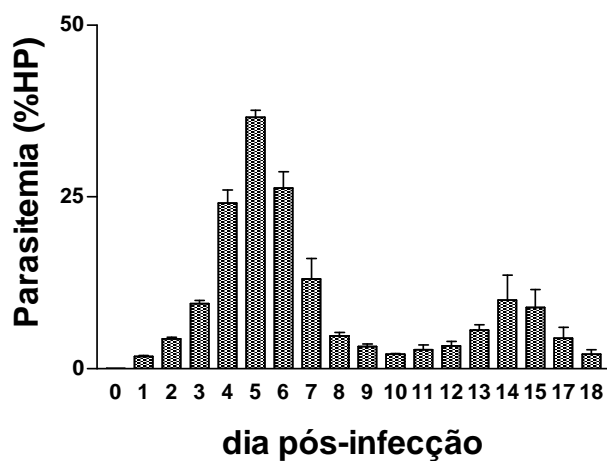


Figura 4.19 – Evolução da parasitemia em fêmeas C57BL/6 (histograma superior) e DBA-2 (inferior) após infecção com *Plasmodium chabaudi* (inóculo = 2×10^7 HP i.p., dia 0). As alturas das barras representam o valor médio \pm EPM. Parasitemia: % de hemácias parasitadas (HP).

Plasmodium chabaudi

Camundongos C57BL/6 ♀

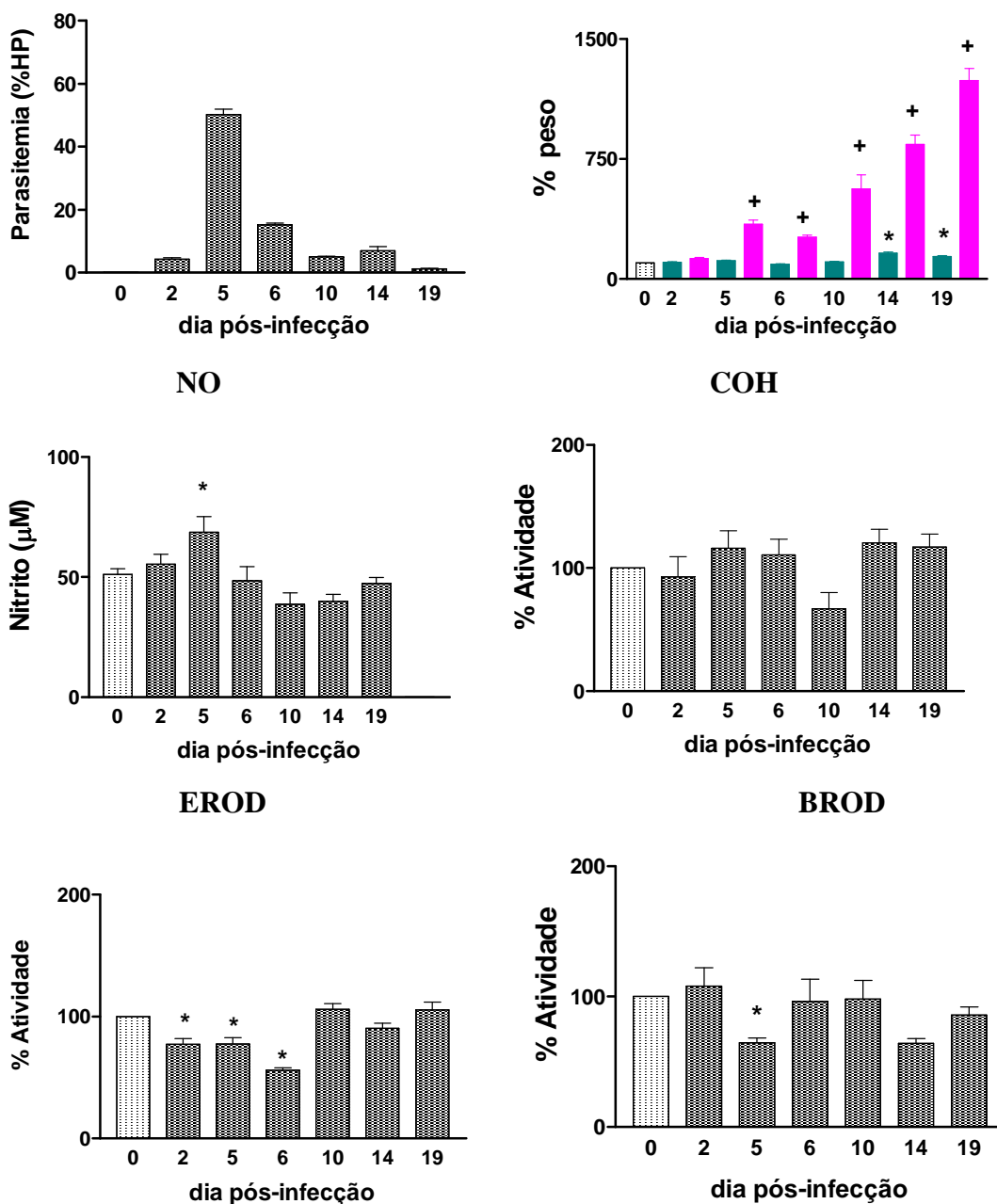


Figura 4.20 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP2A5 (COH), 1A1/2 (EROD) e 2B9/10 (BROD) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas) infectados com *P. chabaudi*. Os painéis mostram as alterações, a partir do dia da infecção (dia 0, 10^7 HP/animal i.p.), da taxa de parasitemia (%HP), do peso do fígado e baço (%), da concentração sérica de nitrito (μ M) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD), e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases. Os pesos dos órgãos e as atividades enzimáticas estão representados como % do valor médio dos controles não infectados (dia 0 =100%). Os valores são médias \pm EPM. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*) para as atividades e peso do fígado (verde) ou cruz (+) para o peso do baço (rosa). Os valores (100%) dos controles foram: peso do fígado = $0,83 \pm 0,02$ g; peso do baço = $0,06 \pm 0,003$ g; COH = $16,49 \pm 1,17$ umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $182,42 \pm 5,76$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $121,24 \pm 6$ pmol resorufina/mg ptn/min.

Plasmodium chabaudi

Camundongos DBA-2 ♀

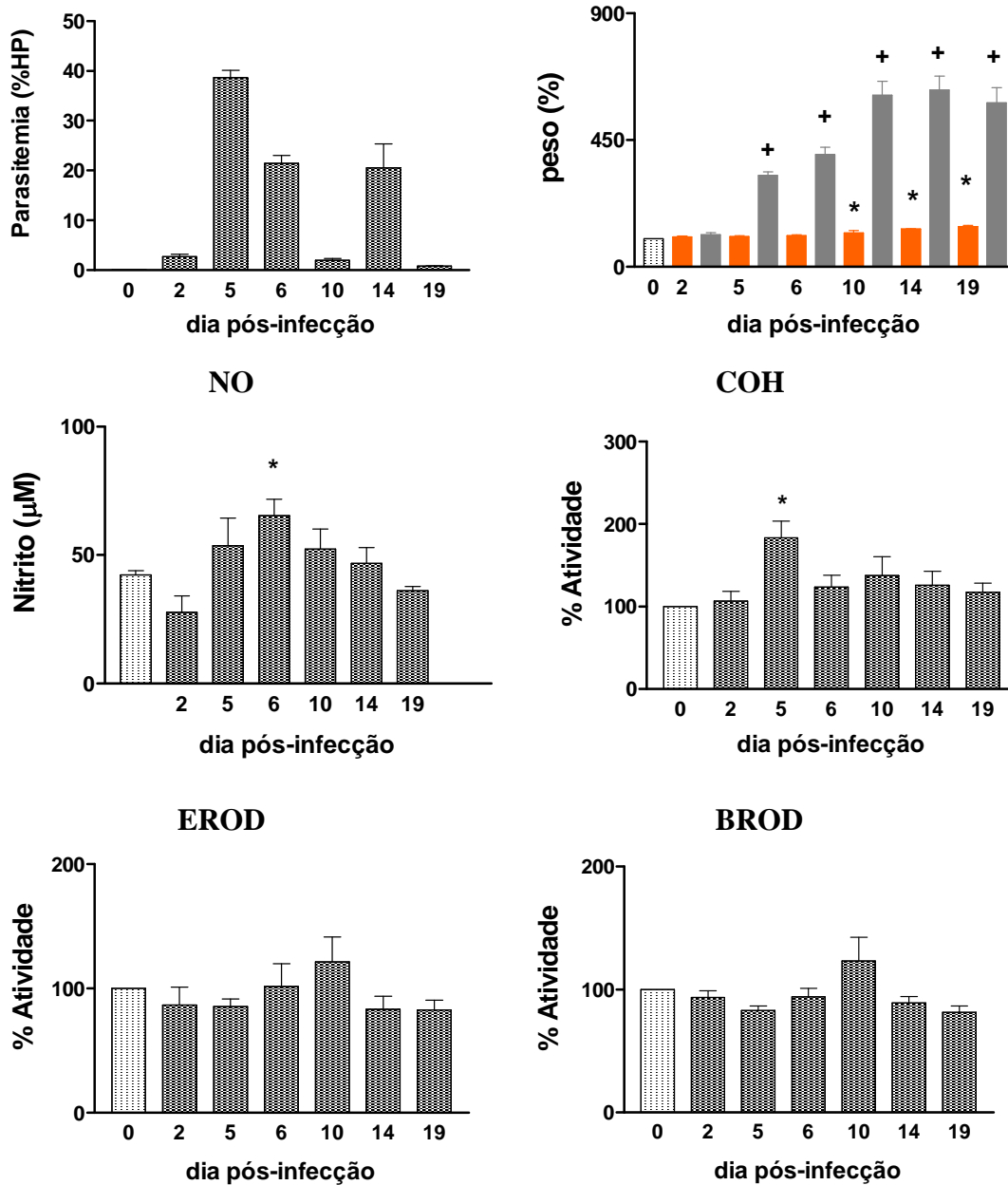


Figura 4.21 – Evolução clínica e alterações das atividades de CYP2A5 (COH), 1A1/2 (EROD) e 2B9/10 (BROD) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas) infectados com *P. chabaudi*. Os painéis mostram as alterações, a partir do dia da infecção (dia 0, 10^7 HP/animal i.p.), da taxa de parasitemia (%HP), do peso do fígado e baço (%), da concentração sérica de nitrito (μ M) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD), e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases. Os pesos dos órgãos e as atividades enzimáticas estão representados como % do valor médio dos controles não infectados (dia 0 =100%). Os valores são médias \pm EPM. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*) para as atividades e peso do fígado (laranja) ou cruz (+) para o peso do baço (cinza). Os valores (100%) dos controles foram: peso do fígado = $1,08 \pm 0,01$ g; peso do baço = $0,11 \pm 0,005$ g; COH = $149,43 \pm 8$ umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $130,78 \pm 6,7$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $73,7 \pm 3,1$ pmol resorufina/mg ptn/min.

4.4. – Elevação dos níveis de óxido nítrico e alterações da atividade de citocromos P450 das subfamílias 1A, 2A e 2B no fígado de camundongos DBA-2 tratados com LPS

4.4.1– Curso temporal da elevação dos níveis de óxido nítrico no soro e das alterações de CYP1A1/2, 2A5 e 2B9/10 no fígado, após o tratamento com LPS

Na etapa anterior deste trabalho, não evidenciamos elevação dos níveis de óxido nítrico no soro de camundongos DBA-2 e C57BL/6 durante a evolução da malária letal (*P. berghei* ANKA). Naquela etapa verificamos também que, exceto por discreta elevação no dia do pico da parasitemia, a concentração sérica de óxido nítrico (NO) permaneceu praticamente inalterada durante a evolução da infecção não letal (*P. chabaudi*) nos dois hospedeiros. Esta aparente ausência de relação entre níveis de NO no soro e alterações de monooxigenases hepáticas nos modelos murinos de malária letal e não letal, nos motivou a investigar se em camundongos DBA-2, as elevações de NO e as modificações de atividade de CYP (CYP1A1/2, 2A5 e 2B9/10) produzidas pelo LPS estão associadas em termos de dose-resposta e curso temporal.

Inicialmente, para avaliar a relação dose-efeito e o curso temporal, tratamos camundongos DBA-2 com uma única administração de LPS (2, 5 ou 20 mg/kg i.p.) e avaliamos a resposta em termos de alterações dos níveis séricos de NO e das atividades catalíticas de CYPs hepáticos, seis, doze e vinte-e-quatro horas após o tratamento.

Como esperado, a injeção de LPS elevou os níveis de nitrito (NO) no soro e deprimiu as atividades de isoformas CYP no fígado (Figuras 4.22, 4.23 e 4.24). As três doses de endotoxina (2, 5 e 20 mg/kg) aumentaram as concentrações de NO sérico 6 e 12 horas após o tratamento. Vinte e quatro horas após a injeção de LPS, os níveis de NO permaneceram aumentados apenas com a maior dose utilizada (20 mg/kg), já tendo retornado aos valores basais com as duas menores doses, 2 e 5 mg/kg. Os aumentos foram de aproximadamente quatro a sete vezes seis horas após a injeção, de cinco (2 mg/kg) a onze (5 e 20 mg/kg) vezes doze horas após, e seis vezes (20 mg/kg) vinte e quatro horas após o tratamento, já tendo retornado aos níveis basais após o maior intervalo de tempo com as menores doses (ANOVA e teste de comparação das médias de Dunnett, $p < 0,05$).

O LPS nas três doses administradas e nos três intervalos de tempo pós-injeção analisados (6, 12 e 24 horas) deprimiu, consistentemente (30 a 40%), a atividade catalítica de CYP1A1/2 (EROD) no fígado dos camundongos DBA-2. A atividade de CYP2B9/10 (BROD) também foi deprimida (aproximadamente 30%) pela menor dose de LPS (2 mg/kg), 6 e 12 horas após o tratamento, mas não diferiu da atividade dos controles 24 horas após a injeção. A dose intermediária de LPS (5 mg/kg) reduziu (cerca de 30%) a atividade de CYP2B9/10 (BROD) nos três intervalos pós-administração analisados (6, 12 e 24 horas),

enquanto entre os camundongos que receberam a maior dose (20 mg/kg), a diminuição de BROD (30 %) em relação aos controles foi detectada, estatisticamente, apenas 12 e 24 horas após o tratamento.

Em contraste com o que foi observado para as atividades de CYP1A1/2 e 2B9/10, o tratamento com as duas maiores doses de LPS (5 e 20 mg/kg) não alterou a atividade catalítica de CYP2A5 em nenhum dos três intervalos de tempo pós-administração analisados (Figuras 4.22, 4.23 e 4.24). Na menor dose (2 mg/kg), entretanto, o LPS causou acentuada (65%) diminuição da atividade de CYP2A5 (COH) 6 horas após o tratamento (COH: controle x LPS, média±EPM: 216,72±23,8 x 75,89±13,47 pmoles de umbeliferona/mg proteína/minuto). Depressão marcante de CYP2A5 (66%; COH, controle x LPS, 216,72±23,8 x 68,91±12,54 pmoles umbeliferona/mg proteína/minuto) foi observada também 24 horas após o tratamento com a dose mais baixa de LPS (2 mg/kg) (Figura 4.24).

Como tem sido descrito que há uma flutuação circadiana das atividades catalíticas de CYP2A5, é importante mencionar os horários de tratamento e morte dos animais. No caso do intervalo mais curto (6 horas), o tratamento foi realizado pela manhã e, portanto, os animais foram mortos à tarde do mesmo dia, enquanto no caso do intervalo de 12 horas, os camundongos foram tratados no início da noite e mortos na manhã do dia seguinte. O intervalo de 24 horas foi entre tratamento e morte à tarde. Os controles foram mortos concomitantemente com os tratados com LPS a cada intervalo pós-administração; não foram observadas diferenças de atividade de COH entre os controles mortos pela manhã (12 horas, 247,33±37,23 pmoles umbeliferona/mg proteína/minuto) e os mortos à tarde (6 e 24 horas, 182,5±24,6 pmoles umbeliferona/mg proteína/minuto) (teste *t* de Student, $p > 0,05$).

Analisados conjuntamente, esses resultados sugeriram que após o tratamento com LPS, a elevação dos níveis séricos de NO foi, via de regra, acompanhada por depressão das atividades catalíticas de CYP1A1/2 e 2B9/10 no fígado, embora 24 horas após a injeção da menor dose da endotoxina (2 mg/kg), a concentração de NO retornou ao nível basal, mas a atividade de CYP1A1/2 (EROD) permaneceu deprimida (Figura 4.24).

LPS de *Escherichia coli*

Camundongos DBA-2 ♀

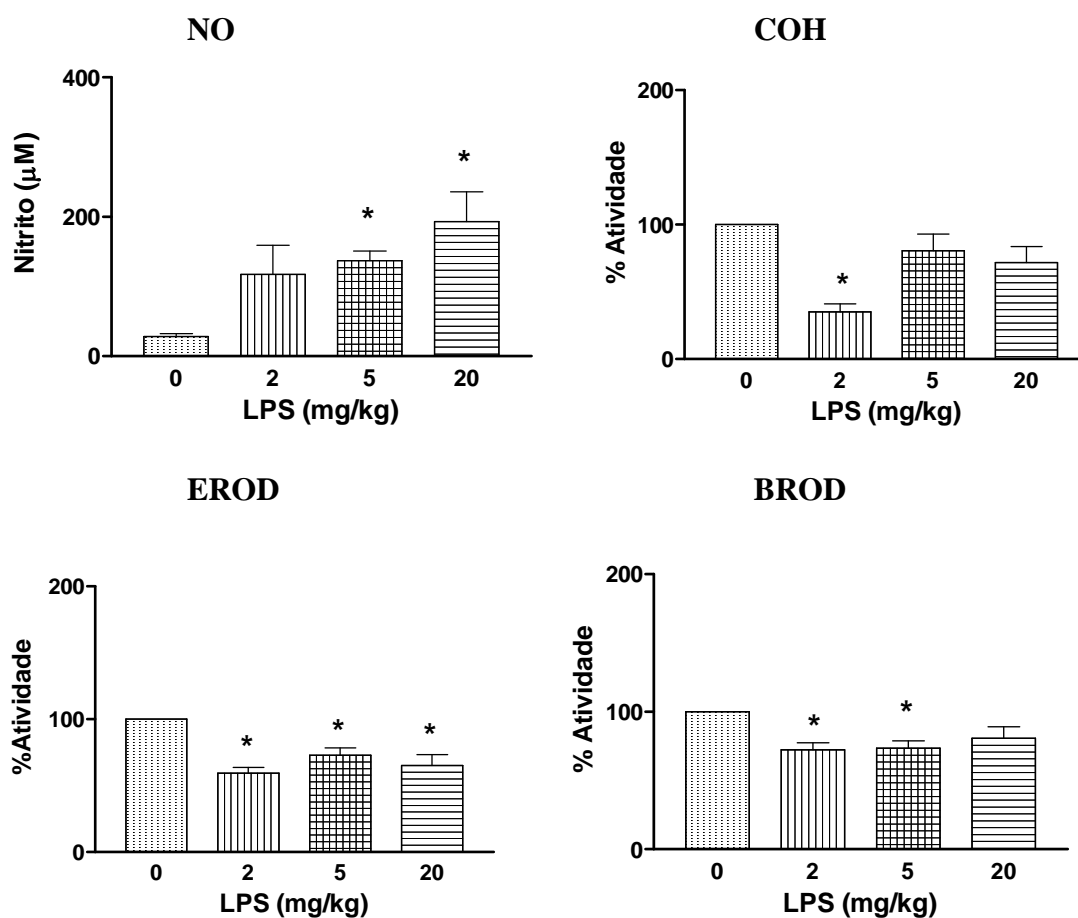


Figura 4.22 – Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD) e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 2, 5 e 20 mg/kg peso e mortos 6 horas após a injeção. Os valores são médias \pm EPM. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*). Os valores (100 %) dos controles foram: COH = $216,72 \pm 23,8$ pmol umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $76,63 \pm 4,72$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $71,61 \pm 4,07$ pmol resorufina/mg ptn/min.

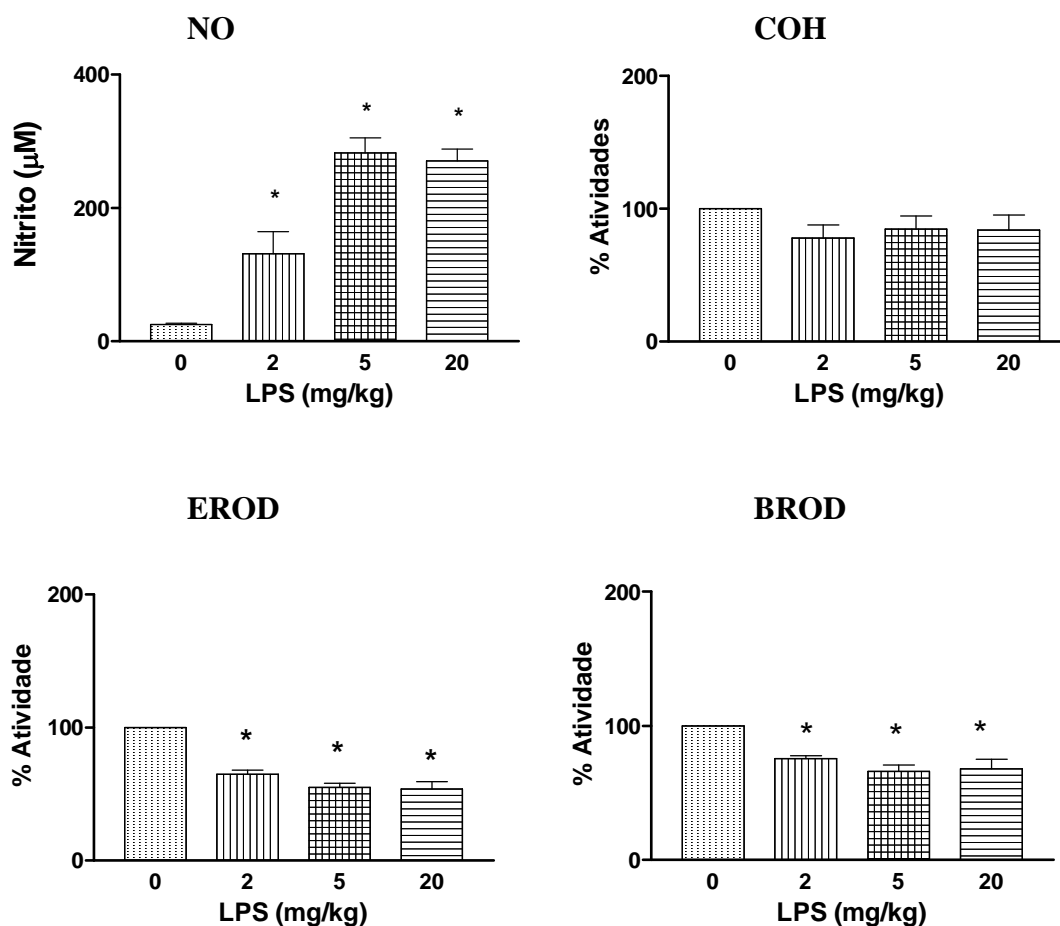


Figura 4.23 – Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD) e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 2, 5 e 20 mg/kg peso e mortos 12 horas após a injeção. Os valores são médias \pm EPM. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*). Os valores (100 %) dos controles foram: COH = $216,72 \pm 23,8$ pmol umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $76,63 \pm 4,72$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $71,61 \pm 4,07$ pmol resorufina/mg ptn/min.

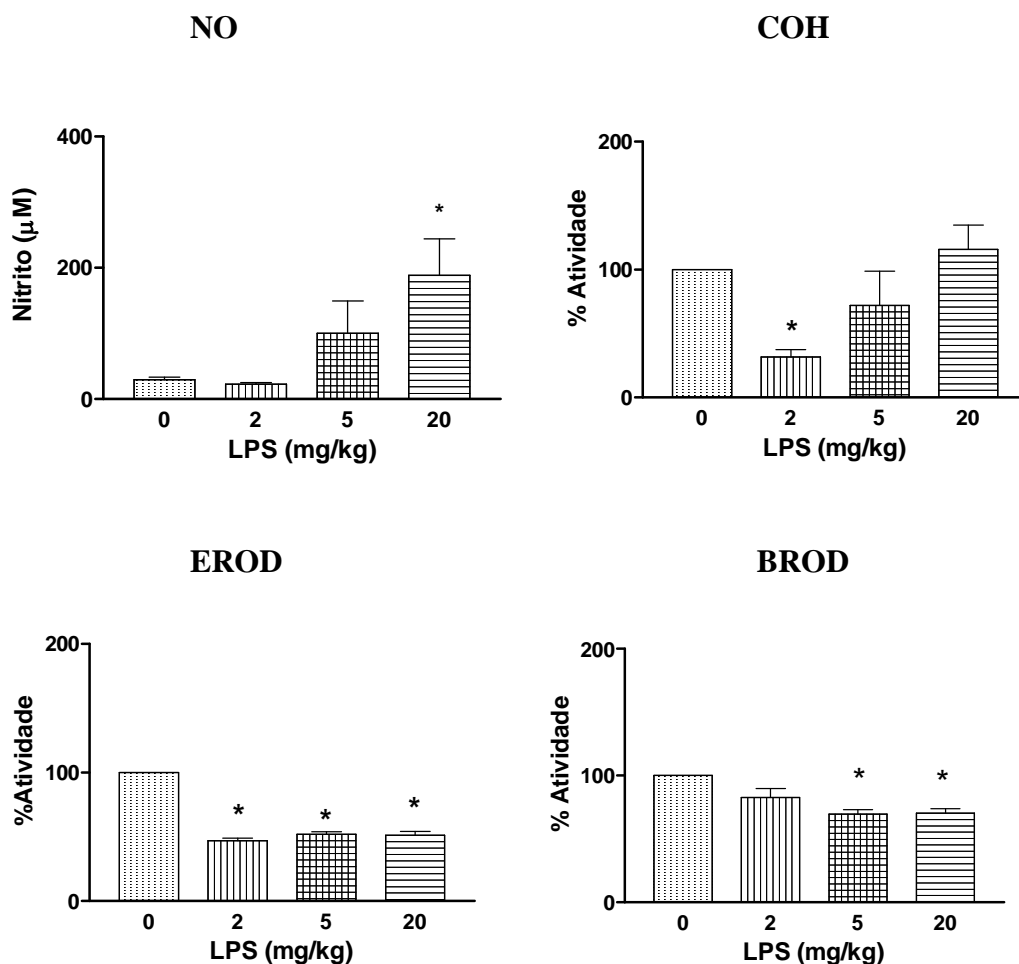


Figura 4.24 – Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD) e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 2, 5 e 20 mg/kg peso e mortos 24 horas após a injeção. Os valores são médias \pm EPM. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*). Os valores (100 %) dos controles foram: COH = $216,72 \pm 23,8$ pmol umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $76,63 \pm 4,72$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $71,61 \pm 4,07$ pmol resorufina/mg ptn/min.

É interessante notar que a magnitude do efeito depressor sobre as atividades de CYP1A1/2 e 2B9/10 foi semelhante, independente da dose de LPS administrada, diferindo a resposta entre doses em termos da duração, mas não da intensidade do efeito (*e.g.*, na menor dose, mas não nas demais, a redução de BROD desapareceu 24 horas após o tratamento) (Figura 4.24). A clara depressão da atividade catalítica de CYP2A5 (COH) na menor dose de LPS testada (2 mg/kg, 6 e 24 horas), mas não nas duas doses mais elevadas (5 e 20 mg/kg), sugeriu que poderia estar ocorrendo neste caso uma relação dose resposta não linear e não monotônica (*i.e.*, curva dose-efeito em U).

Para examinar melhor essas relações dose-resposta, decidimos expandir o intervalo de doses de LPS testadas (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 10,0 mg/kg *i.p.*), determinando as atividades catalíticas de CYP1A1/2 (EROD), 2B9/10 (BROD) e 2A5 (COH) no fígado dos camundongos (DBA-2) 24 horas após o tratamento (Figura 4.25). Neste caso, como no experimento anterior, o tratamento e a morte ocorreram no período da tarde.

As doses de LPS de 0,05 até 5,0 mg/kg (inclusive) não aumentaram o nível de NO sérico neste intervalo de tempo pós-administração, mas as doses mais elevadas (10,0 e 20,0 mg/kg) provocaram aumento acentuado dos níveis de nitrito (*e.g.*, controles x LPS 10 mg/kg: $27,39 \pm 2,21$ x $153,95 \pm 43,66$ μ M; ou 5,6 vezes). (Figura 4.25).

De forma surpreendente, observamos uma clara depressão da atividade catalítica de CYP2A5 (COH) entre os camundongos tratados com a menor dose de LPS testada (0,05 mg/kg). Todas as doses subseqüentes de LPS, numa escala crescente de doses até 2,0 mg/kg, inclusive, causaram acentuada depressão de CYP2A5 (COH). A atividade de CYP2A5 (COH) no fígado dos camundongos tratados com as três maiores doses de LPS (5, 10 e 20 mg/kg), entretanto, não diferiu da atividade registrada nos respectivos controles. Estes resultados são consistentes com o que havíamos notado no experimento anterior e parecem confirmar a nossa suspeita de que a relação dose-resposta nesse caso não é monotônica, assumindo a curva dose-efeito a forma de um “U” (Figura 4.25).

É interessante ressaltar ainda que, neste amplo intervalo de doses baixas, que vão de 0,05 até 1,0 mg/kg, o tratamento com LPS deprimiu a atividade de CYP2A5 (COH), mas não elevou os níveis de NO, nem alterou as atividades de CYP1A1/2 e 2B9/10 (EROD e BROD), que foram reduzidas em doses mais elevadas (Figura 4.25). Esse resultado (efeito de doses baixas) sugere que a regulação negativa da atividade de CYP2A5 é altamente sensível à endotoxina. O tipo de relação dose-resposta observado – depressão em doses baixas e recuperação em doses mais altas, ou curva em “U” - também revela a complexidade da regulação de CYP2A5 por estímulos inflamatórios. A indução de CYP2A5 (murina) e 2A6 (humana) no fígado tem sido descrita em processos inflamatórios – com substancial dano aos

hepatócitos - resultantes de infecções, como as causadas pelos trematódeos *F. hepatica* e *O. viverrini* (Galtier *et al.*, 1987; Biro-Sauver *et al.*, 1994; Sommerville *et al.*, 1995; Topfer *et al.*, 1995; Satarug *et al.*, 1996), malária (De-Oliveira *et al.*, 2006) e hepatites virais e bacterianas (Chomarat *et al.*, 1997; Sipowicz *et al.*, 1997). Em outros processos inflamatórios, com menor intensidade de dano aos hepatócitos, como o que ocorre na esquistossomose crônica em camundongos, foi relatado que há uma depressão da atividade catalítica (COH) de CYP2A5 no fígado (Conte *et al.*, 2007). Os relatos de efeitos do LPS sobre a atividade de CYP2A5 encontrados na literatura são até certo ponto conflitantes (ausência de efeito, depressão e indução) (Gilmore *et al.*, 2003; Abu-Bakar *et al.*, 2005) mas, ao que sabemos, nenhum autor examinou – como fizemos - os efeitos de uma ampla gama de doses de LPS e, principalmente, de doses baixas de endotoxina em camundongos que expressam bem a enzima (*e.g.*, DBA-2). É possível que, administrando doses de LPS ainda mais altas do que a máxima testada neste trabalho (20 mg/kg), nos deparássemos com um quadro sintomático semelhante a sepses, envolvendo comprometimento de múltiplos órgãos (inclusive o fígado), e tivéssemos então uma clara indução da CYP2A5 (COH) hepática em DBA-2. Se isto de fato ocorre, então as relações entre dose do LPS e efeito sobre a atividade de CYP2A5 seriam descritas, num intervalo ainda mais amplo de doses, por curva do tipo “J” (com inversão do sentido do efeito) e não por uma do tipo “U” (com reversão, mas não inversão) como vimos.

LPS de *Escherichia coli*

Camundongos DBA-2 ♀

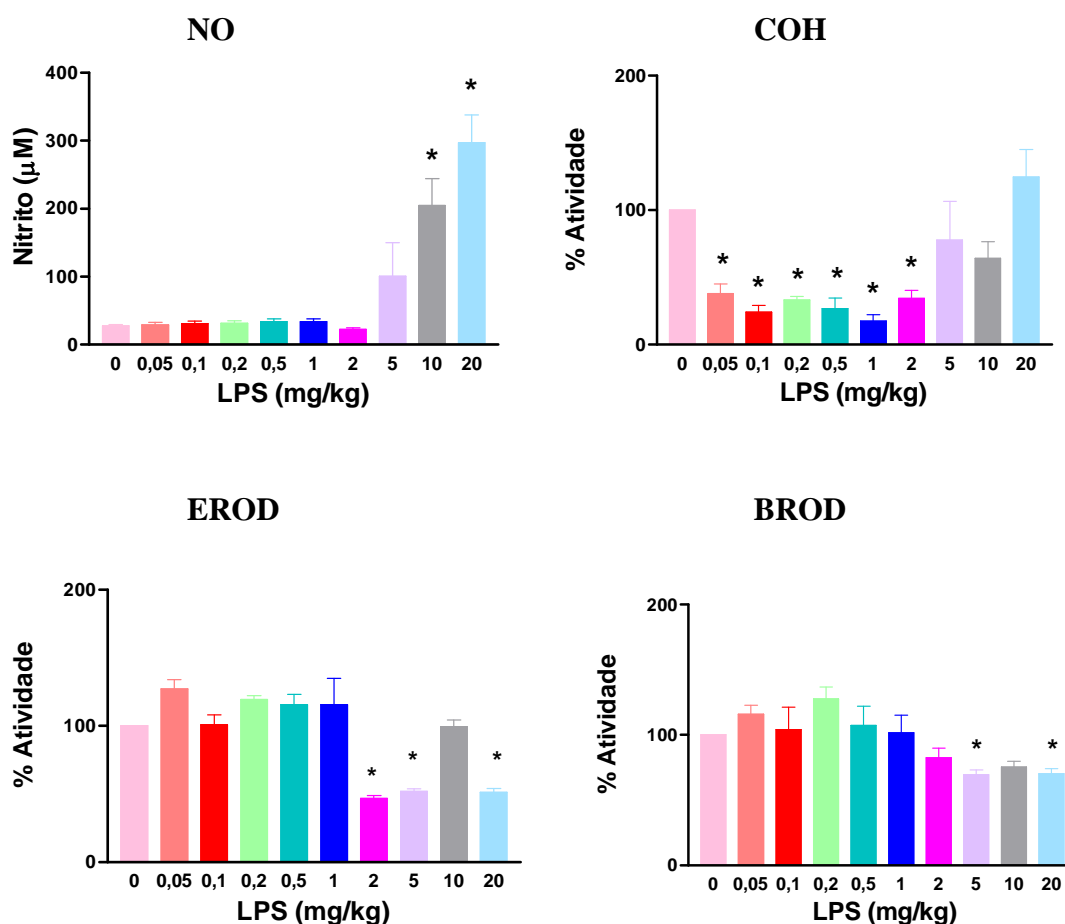


Figura 4.25 – Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD) e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20 mg/kg peso e mortos 24 horas após a injeção. Os valores são médias \pm EPM. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de Dunnett antes da transformação em percentuais. As diferenças dos controles ($p < 0,05$) são assinaladas por um asterisco (*). Os valores (100 %) dos controles foram: COH = $201,44 \pm 21,02$ pmol umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $89,8 \pm 7,22$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $73,67 \pm 3,66$ pmol resorufina/mg ptn/min.

4.4.2 – Indução da NOS2 (mRNA) em fígado, baço e cérebro de camundongos DBA-2 infectados com *P. berghei* (ANKA) e tratados com LPS

Como anteriormente relatado neste trabalho, não detectamos qualquer alteração dos níveis de óxido nítrico (NO) no soro sanguíneo, ao longo da evolução da infecção de camundongos C57BL/6 e DBA-2 com *P. berghei* ANKA. Apesar de não mostrarem alterações dos níveis séricos basais de NO, os camundongos exibiram nos estágios mais avançados da infecção com este parasito, depressão das atividades catalíticas de isoformas das subfamílias CYP1A e 2B e indução de CYP2A5 no fígado. À primeira vista, essa observação poderia sugerir que a elevação dos níveis de NO não é essencial para as alterações, particularmente para a depressão das atividades de CYP que ocorrem na malária. Entretanto, existe a possibilidade da infecção malárica causar uma elevação – via indução da NOS2 - dos níveis de NO localmente no órgão alvo em que as atividades das CYPs foram medidas (*i.e.*, no fígado) sem alterar os níveis no soro sanguíneo. Isto poderia ocorrer, por exemplo, em virtude do sequestro do NO pela hemoglobina e outras hemoproteínas presentes no sangue, tal como sugerido por Sobolewsky *et al.* (2005).

Como é difícil medir diretamente os níveis de NO ou a atividade de NOS2 no tecido hepático, decidimos verificar se a NOS2 está induzida neste órgão, quantificando o mRNA por RT-PCR quantitativo. Se não houvesse evidência de indução da NOS2, poderíamos então excluir a possibilidade de que o NO fosse essencial para as alterações de CYP observadas.

As determinações foram feitas em camundongos DBA-2 e C57BL/6 infectados com *P. berghei* (ANKA) mortos quando a parasitemia atingiu taxas superiores a 40% HP e respectivos controles não infectados. Incluímos também um grupo de camundongos tratados com uma injeção única de LPS (5 mg/kg *i.p.*) mortos 12 horas após o tratamento e respectivos controles não tratados. Complementarmente, analisamos também a indução de NOS2 no baço e no cérebro dos camundongos.

Os níveis relativos de mRNA de NOS2 representados nas figuras dizem respeito aos valores obtidos para os controles e infectados normatizados para o menor valor do controle não infectado. Como a expressão constitutiva da enzima (NOS2) é muito baixa, é esperado que os níveis em controles não infectados sejam também muito baixos (*i.e.*, biologicamente insignificantes). Nessas condições, a hipótese testada é tipicamente unidirecional: Hipótese alternativa: o tratamento (infecção ou LPS) induziu a NOS2 (aumenta o mRNA) *versus* Hipótese de nulidade: o tratamento não induziu a NOS2. Em todos os casos, portanto, as hipóteses foram testadas pelo teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$, unidirecional.

Os resultados apresentados nas Figuras 4.26 A e 4.27 A indicam, claramente, que a NOS2 foi induzida no fígado de camundongos C57BL/6 e DBA-2 infectados com *P. berghei*.

Digno de nota é o fato da magnitude da indução da NOS2 no fígado ter sido muito mais pronunciada entre os DBA-2 do que entre os C57BL/6. A NOS2 também estava induzida no baço dos camundongos infectados das duas linhagens (Figuras 4.26 B e 4.27 B). No cérebro, a expressão de NOS2 foi muito baixa e não foi induzida pela infecção em nenhuma das duas linhagens murinas (Figuras 4.26 C e 4.27 C).

O tratamento com LPS também induziu a NOS2 no fígado de DBA-2 (única linhagem tratada com a endotoxina), mas nesse caso não foi possível detectar o aumento dos níveis relativos de mRNA no baço. Como a avaliação foi feita 12 horas após o tratamento com LPS 5 mg/kg, é possível que a indução do mRNA já tivesse declinado a ponto de não ser detectada no baço. Tal como observada com a infecção, não foi possível evidenciar indução de NOS2 pelo LPS no cérebro dos camundongos (Figura 4.28 A, B e C).

Esses resultados indicam que, a despeito da ausência de alterações dos níveis séricos de NO, a infecção com *P. berghei* (ANKA) induziu a NOS2 no fígado e no baço. Não é possível, portanto, descartar a possibilidade de ter ocorrido também uma elevação local dos níveis de NO no tecido hepático. Em decorrência deste fato, não é possível também excluir a possibilidade de que a elevação do NO contribua de alguma forma para as alterações de atividade de CYP observadas na malária causada pelo *P. berghei*.

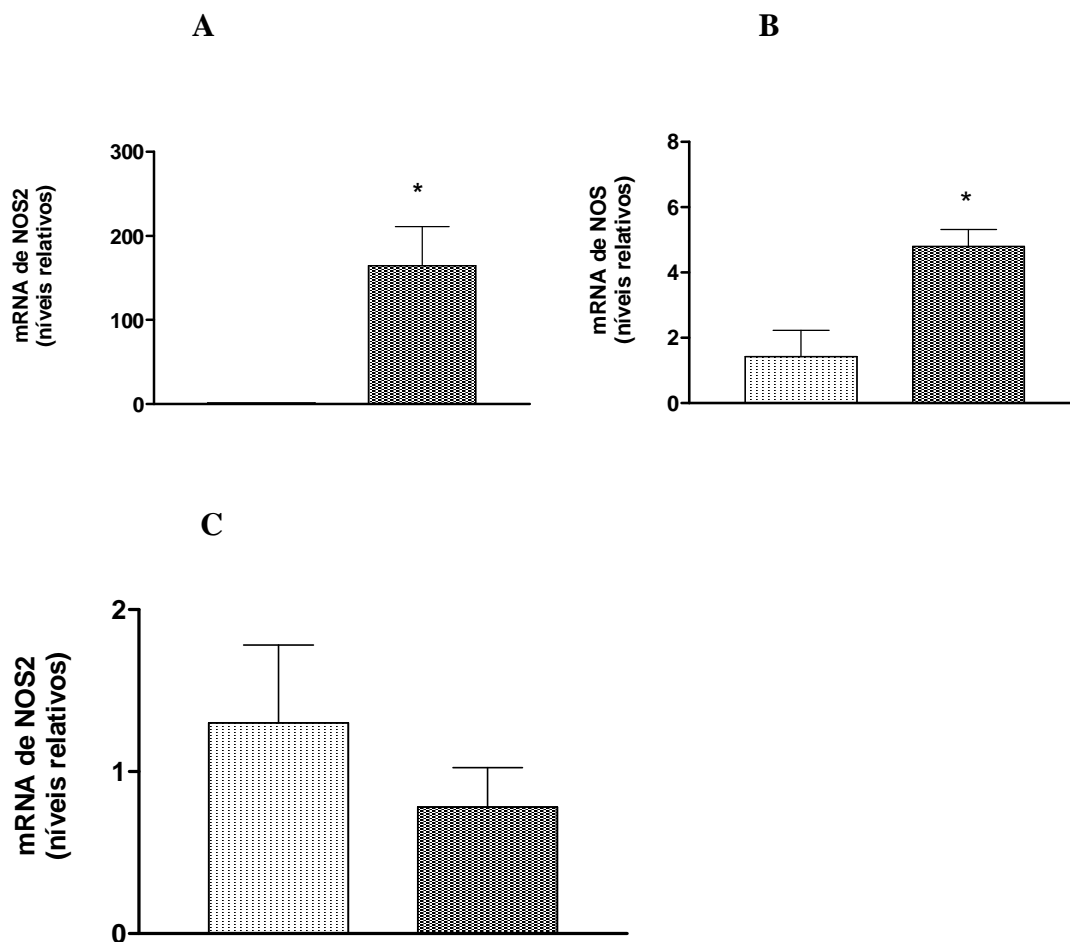


Figura 4.26 – Indução do mRNA de NOS2 nos fígados (A), baços (B) e cérebros (C) de DBA-2 infectados com *P. berghei* (quadrulado branco e negro) e no controle (pontilhado). Os valores são médias±EPM. Os dados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças dos controles são assinaladas por um asterisco (*) ($p < 0,05$).

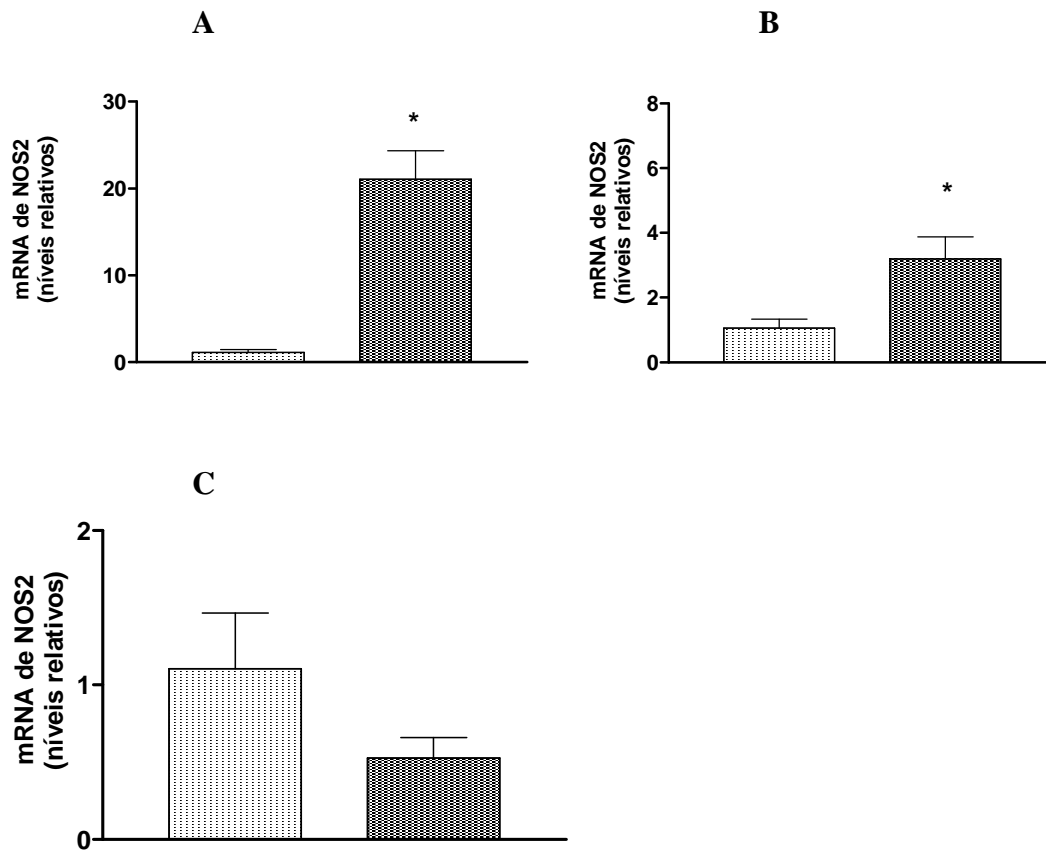


Figura 4.27 – Indução do mRNA de NOS2 nos fígados (A), baços (B) e cérebros (C) de C57BL/6 infectados com *P. berghei* (quadrado branco e negro) e no controle (pontilhado). Os valores são médias±EPM. Os dados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças dos controles são assinaladas por um asterisco (*) ($p < 0,05$).

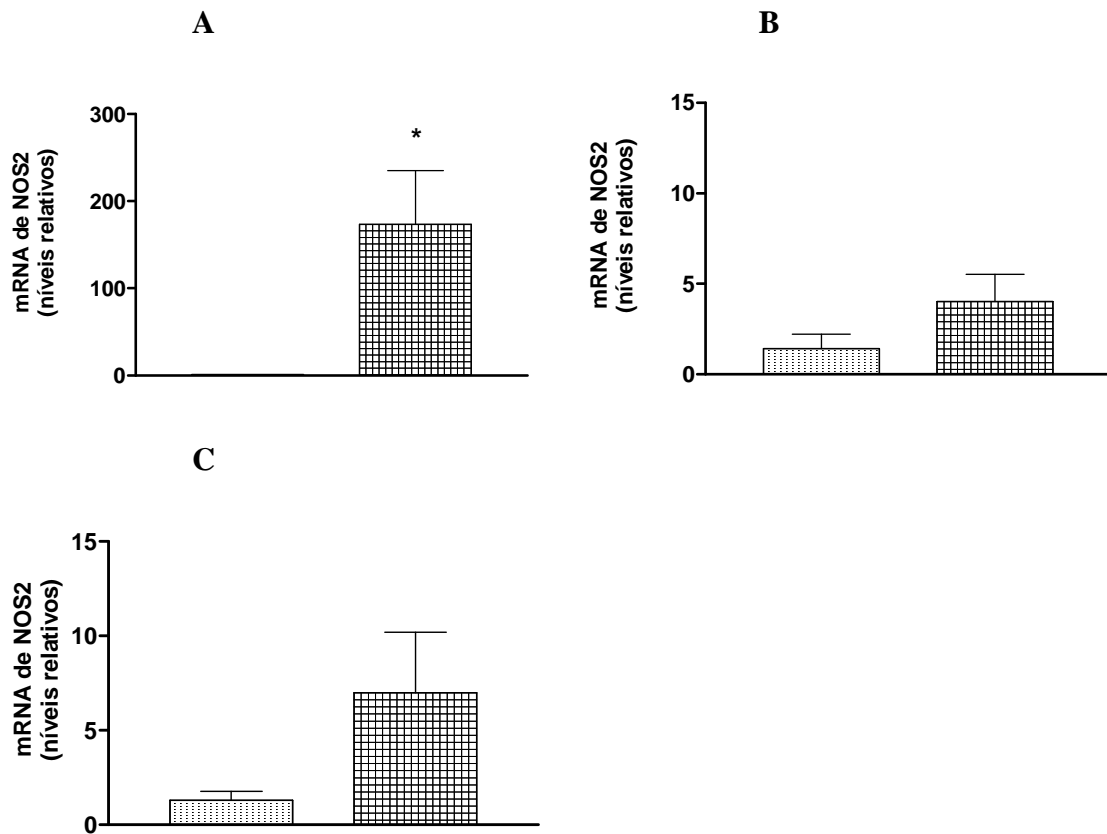


Figura 4.28 – Indução do mRNA de NOS2 nos fígados (A), baços (B) e cérebros (C) de DBA-2 tratados com LPS 5 mg/kg (quadriculado) mortos 12 horas após o tratamento e no controle (pontilhado). Os valores são médias±EPM. Os dados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças dos controles são assinaladas por um asterisco (*) ($p < 0,05$).

4.4.3 – Efeitos do bloqueio da NOS2 sobre as alterações de atividade de CYP1A1/2, 2A5 e 2B9/10 induzidas pelo LPS

Para investigar se a elevação da concentração de NO estava associada à depressão das atividades de CYP1A (EROD) e CYP2B (BROD), ambas desencadeadas pela administração do LPS, decidimos bloquear farmacologicamente a produção de NO pela NO-sintase induzível (NOS2, ou iNOS), enzima que é induzida pelo tratamento com a endotoxina.

Neste experimento utilizamos a aminoguanidina (AG) para inibir a produção de NO pela NOS2 (iNOS) e examinamos os níveis séricos de NO e as atividades de EROD, BROD e COH, 12 horas após a administração de LPS (5 mg/kg i.p.). Para analisar se o bloqueio da NOS2 modifica a modulação da atividade das CYPs hepáticas pela endotoxina, uma única dose de AG (50 e 100 mg/kg) foi injetada por via i.p. 30 minutos antes do tratamento com LPS (5 mg/kg i.p.) sendo os animais mortos 12 horas depois (período da manhã). Um grupo de camundongos foi tratado apenas com PBS (controle), enquanto um outro grupo recebeu apenas a injeção de LPS. Investigamos também, em dois grupos adicionais, se a AG *per se*, nessas doses e condições de tratamento, alteraria a atividade das CYP estudadas. Os resultados desse experimento são apresentados na Figura 4.29 e mostram que, como esperado, a AG bloqueou a elevação de NO sérico induzida pelo LPS, sendo esta inibição parcial na menor dose (50 mg/kg) e total na maior dose (100 mg/kg) empregada. O tratamento com AG, nas duas doses testadas, não alterou a atividade catalítica de CYP2A5 (COH), mas deprimiu claramente a atividade de CYP1A1/2 (EROD). A atividade de CYP2B9/10, por outro lado, não foi alterada pela menor dose (50 mg/kg), mas foi inibida pela maior dose de AG (100 mg/kg) (Figura 4.29). Como esperado, o LPS deprimiu a atividade de CYP1A1/2 (EROD), depressão esta que se manteve nos grupos que receberam AG (50 e 100 mg/kg) antes do tratamento com a endotoxina. Entretanto, a AG *per se* nas duas doses testadas produziu inibição da atividade de CYP1A1/2 (EROD) de intensidade comparável à observada nos grupos tratados com LPS. Assim sendo, não é possível saber se, nesse caso, a elevação de NO está associada à depressão da atividade catalítica, porque a AG – por algum mecanismo ainda a esclarecer – inibiu a atividade de CYP1A1/2 (EROD). A atividade de CYP2B9/10 (BROD) também foi inibida pelo tratamento com LPS, inibição esta que se manteve em níveis equivalentes nos camundongos que receberam a maior dose de AG (100 mg/kg) 30 minutos antes da injeção de endotoxina. Esta dose de AG, todavia, também deprimiu a atividade de CYP2B9/10 em camundongos que não receberam LPS (Figura 4.29). A atividade de CYP2B9/10 nos camundongos que receberam a menor dose de AG (50 mg/kg), antes da injeção do LPS, não diferiu da atividade registrada nos controles, sugerindo que esta dose do bloqueador de NOS2 reverteu os efeitos depressores da endotoxina. É interessante notar que

esta dose de AG não afetou a atividade de BROD e causou um bloqueio apenas parcial da elevação de NO sérico. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que a elevação do NO desempenha um papel chave na inibição da atividade e expressão de isoformas da subfamília 2B causada pelo LPS. A hipótese de que o NO é o mediador da depressão generalizada de CYP produzida pelo tratamento com LPS tem sido sustentada por Khatsenko e outros autores (Khatsenko *et al.*, 1993, 1997; Wink *et al.*, 1993), mas é contestada por Edward Morgan e outros pesquisadores. Entretanto, mesmo afirmando que as depressões de CYP causadas pela endotoxina ocorrem, de um modo geral independentemente da elevação do NO, Morgan *et al.* (Sewer e Morgan, 1998; Ferrari *et al.*, 2001) mencionam a regulação negativa da expressão e atividade de CYP2B pelo LPS como uma possível exceção a esta regra. Os nossos resultados mostram que é difícil verificar essa hipótese empregando o bloqueio farmacológico da NOS2 pela AG, porque as doses desse fármaco que não deprimem CYP2B, coincidentemente, não bloqueiam totalmente a elevação do NO sérico. Indícios de que outros bloqueadores menos seletivos de NOS2 (*e.g.*, L-NAME) também inibem a atividade de isoformas CYP hepáticas em roedores tem dificultado a interpretação dos resultados de vários estudos anteriores publicados por Oleg Khatsenko e por outros autores sobre o papel do NO na modulação dessas enzimas pelo LPS (Khatsenko *et al.*, 1997).

A AG per se nas duas doses testadas e o tratamento com o LPS isoladamente não afetaram a atividade de CYP2A5 (COH), o que contrasta vivamente com o que observamos em relação às atividades de CYP1A1/2 e 2B9/10. Entretanto, o tratamento dos camundongos com AG, e em seguida com LPS (AG+LPS), parece ter induzido (aproximadamente 1,7 vezes) a atividade catalítica de CYP2A5 em relação aos níveis registrados nos controles, efeito este observado consistentemente com as duas doses do bloqueador de NOS2 (50 e 100 mg/kg) (Figura 4.29). Esse achado inesperado, assim como a grande sensibilidade da regulação negativa de CYP2A5 ao tratamento com LPS e a curva dose resposta não monotônica que havíamos constatado no experimento anterior, ilustram bem como é complexa a resposta desta isoforma aos estímulos inflamatórios.

Os valores numéricos relativos às Figuras 4.17 a 4.29 constam das Tabelas 4.1 a 4.46 do ANEXO 1.

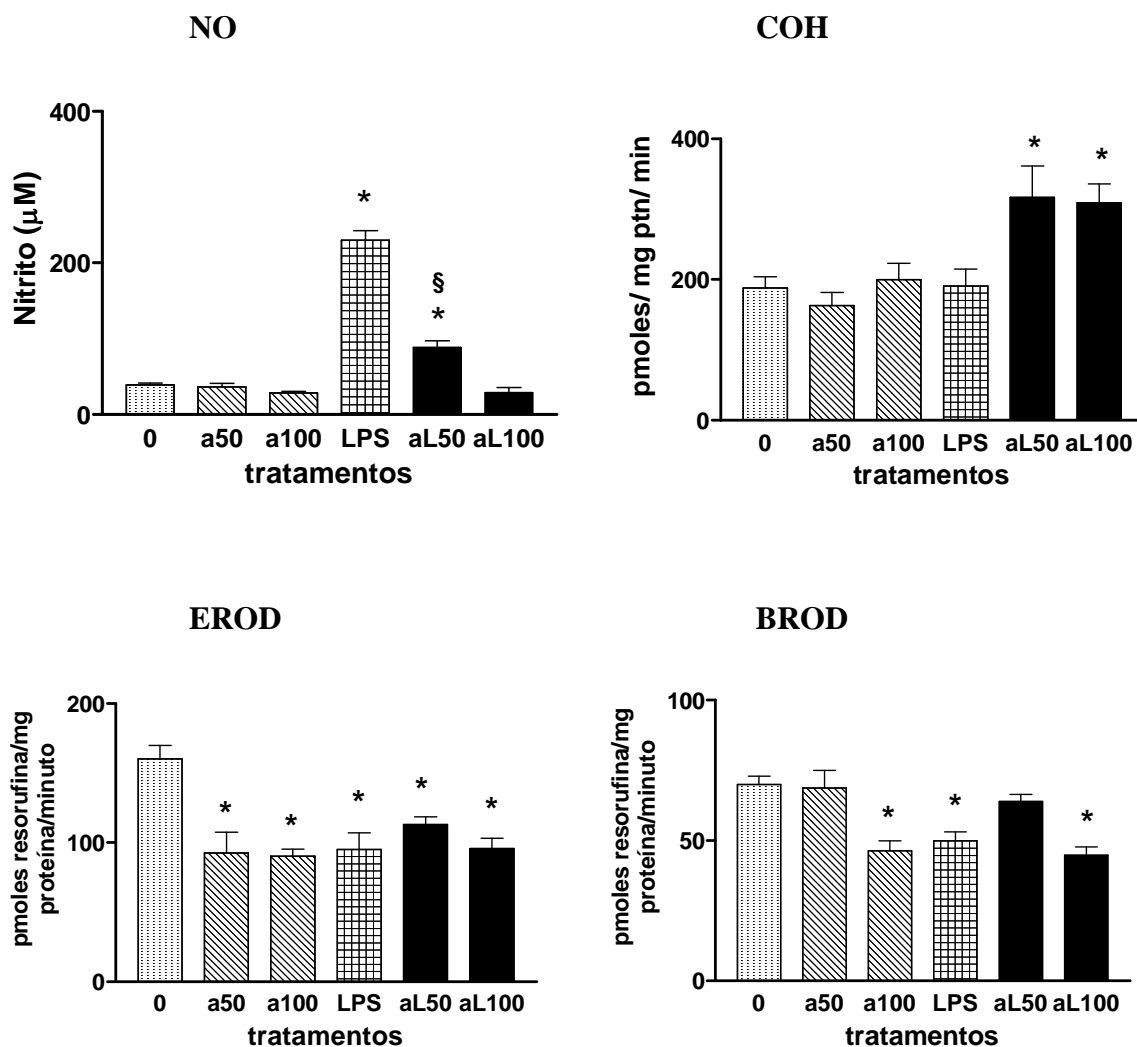


Figura 4.29 - Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades (%) da cumarina-hidroxilase (COH), etoxi- (EROD) e benziloxi- (BROD) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com LPS na dose de 5 mg/kg (LPS), aminoguanidina (a) nas doses de 50 e 100 mg/kg, e aminoguanidina + LPS (aL) mortos 12 horas após a injeção i.p. Os valores são médias \pm EPM. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Dunnett (* # de 0, § # LPS, $p < 0,05$). Os valores para o grupo controle foram: COH = $187,79 \pm 15,97$ pmol umbeliferona/mg ptn/min; EROD = $160,15 \pm 9,54$ pmol resorufina/mg ptn/min; BROD = $69,98 \pm 3,01$ pmol resorufina/mg ptn/min.

5- DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostraram que a malária grave causada pela infecção com *P. berghei* modula a atividade das enzimas citocromo P450 da fase 1 do metabolismo no fígado, isto é, a infecção deprime as atividades de CYP1A e CYP2B e induz CYP2A5 e 2E1, mas não altera as enzimas da fase 2 (*i.e.*, a UGT e as GST citosólica e microsomal). Notamos também que a depressão de CYP1A e 2B no C57BL/6 e a indução de CYP2A5 no DBA-2 ocorreu na malária não letal (*P. c. chabaudi*) no momento de parasitemia máxima.

Depressão de CYP1A e 2B na malária

A inibição da atividade catalítica de CYP1A1/2 que observamos no nosso estudo é consistente com o que outros autores descreveram anteriormente em ratos e camundongos infectados com *P. berghei*, determinando a atividade de monooxigenases hepáticas (inibição de EROD e da reação de hidroxilação do benzo[*a*]pireno), ou analisando *in vivo* a cinética de *probe drugs* para CYP1A1/2 (Kokwaro *et al.*, 1993_a; Kokwaro *et al.*, 1993_b). Neste trabalho, verificamos também que a infecção diminuiu os níveis da apoproteína CYP1A1 na fração microsomal hepática, o que indica que a depressão da atividade catalítica foi, em parte (ou totalmente), devida à menor quantidade da enzima. Em princípio, a redução dos níveis da proteína CYP1A1 poderia dever-se à diminuição da síntese e/ou à aceleração da degradação. Entretanto, dados de outro estudo realizado recentemente no nosso laboratório (Carvalho, 2008), mostraram que a infecção com *P. berghei* (ANKA) causa uma acentuada diminuição dos níveis de mRNA de CYP1A1/2 no fígado de camundongos *Swiss Webster* machos. É provável, portanto, que a síntese de proteínas CYP1A (e de outras isoformas) esteja diminuída na malária (*i.e.*, a infecção causaria uma regulação negativa da enzima ao nível pré-traducional: transcrição diminuída ou aceleração da degradação do mRNA).

Embora CYP1A1/2 seja regulada pelo receptor Ah (AhR) no C57BL/6 e no DBA-2, Arpiainem *et al.* (2005) demonstraram que essas duas linhagens respondem diferentemente à indução por ligantes do AhR. Os autores notaram que, na linhagem DBA-2, as respostas à indução pelo TCDD e pela β -naftoflavona eram menos intensas do que as observadas com o C57BL/6. Neste estudo com *P. berghei*, a depressão da atividade catalítica de CYP1A1/2 ocorreu de forma semelhante nas duas linhagens (*i.e.*, as diferenças entre linhagens quanto ao AhR não parecem ter tido influência nesta regulação negativa em resposta a um agente biológico).

No experimento subsequente, procuramos verificar quando a depressão da atividade catalítica de CYP1A aparece ao longo da evolução da infecção com *P. berghei*. O estudo do curso temporal da inibição de EROD no C57BL/6, no entanto, foi prejudicado pelo

desenvolvimento precoce de um quadro neurológico compatível com malária cerebral em uma proporção muito maior de animais do que aquela que tinha sido observada no experimento anterior. Neste experimento, os C57BL/6 foram mortos quando apresentavam taxas de parasitemia menores do que as registradas no primeiro experimento e não foi detectada depressão da atividade de EROD (CYP1A). Esses resultados parecem sugerir que o quadro clínico de malária cerebral, embora seja muito grave e evolua rapidamente para a morte do camundongo, não está associado a alterações de atividade de CYPs hepáticos. Nos camundongos DBA-2 infectados com *P. berghei* que, diferentemente dos C57BL/6, não exibiram sintomas neurológicos, a depressão da atividade de CYP1A só foi detectada no dia 20 pós-infecção, quando as taxas de parasitemia eram muito elevadas. A princípio, esses resultados obtidos com *P. berghei* poderiam sugerir que a depressão de CYP1A apareceria apenas na fase terminal da evolução letal da malária, quando as taxas de parasitemia são também muito elevadas. No entanto, na infecção dos camundongos C57BL/6 com *P. c. chabaudi*, houve uma clara inibição da atividade de CYP1A (EROD) nos dias pós-infecção 2, 5 e 6, ou seja, em torno do pico de parasitemia. Neste caso, a queda posterior das taxas de parasitemia foi acompanhada por uma reversão da depressão (*i.e.*, por um retorno da atividade de EROD aos níveis registrados nos controles não infectados). Esta evolução temporal mostra que a depressão da atividade de CYP1A é reversível e está de alguma forma associada a eventos que ocorrem quando a parasitemia é elevada. A regulação negativa de CYP1A, portanto, não está necessariamente associada ao quadro clínico da fase terminal da infecção.

A depressão da atividade de CYP2B9/10 (BROD) observada neste estudo ainda não havia sido descrita em modelo murino de malária. A resposta inibitória de CYP2B9/10 à infecção pelo *P. berghei* foi semelhante nas duas linhagens de camundongos estudadas. No primeiro experimento, notamos uma depressão de BROD em animais com elevada parasitemia e quadros de malária grave. Entretanto, a análise da evolução temporal da depressão de BROD revelou que a inibição da atividade catalítica de CYP2B9/10 na linhagem DBA-2 teve início bem antes da fase terminal da infecção em que as taxas de parasitemia eram elevadas. A depressão de BROD em camundongos DBA-2 foi detectada no dia 8 pós-infecção, quando os sintomas ainda eram discretos e a parasitemia era pouco superior a 10%. Como já havíamos comentado, os camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei* no segundo experimento evoluíram precocemente para um quadro de malária cerebral. Tal como ocorreu com CYP1A, não detectamos alterações de atividade de CYP2B (BROD) nos camundongos C57BL/6 neste segundo experimento com *P. berghei* ANKA.

Na infecção não letal pelo *P. c. chabaudi*, BROD não foi alterada nos DBA-2, mas no C57BL/6 a atividade catalítica da CYP2B9/10 foi deprimida no dia 5 pós-infecção, que

coincidiu com o pico de parasitemia. Como havíamos visto em relação à atividade de CYP1A, houve também uma reversão da inibição da atividade de CYP2B com a queda (pós-pico) das taxas de parasitemia. A depressão das atividades de CYP2B, portanto, também pode ser transitente e não está necessariamente associada a um comprometimento hepático irreversível no quadro terminal da infecção.

Esta reversão da inibição das atividades de CYP1A e 2B ao longo da evolução da malária não letal causada pelo *P. c. chabaudi* sugere também que, dificilmente, a depressão poderia ser atribuída ao acúmulo de hemozoína no fígado. Na malária não letal no C57BL/6, a depressão das atividades de EROD e BROD, que foram observadas em torno do pico da parasitemia – dias 2 a 6 pós-infecção - já havia retornado ao normal no dia 10 (EROD) e no dia 6 pós-infecção (BROD), mas o peso do fígado permaneceu aumentado durante a evolução posterior da infecção. É factível supor que durante o período de recuperação, a destruição das hemácias infectadas prosseguiu e a hemozoína continuou a ser depositada por algum tempo no fígado e baço, tornando os órgãos aumentados e enegrecidos até o final do período de observação, no dia 19 pós-infecção. Diante destas observações, é válido supor que o acúmulo de hemozoína não deve ter sido responsável pela inibição das atividades de CYP1A1/2 e CYP2B9/10 tanto na malária letal, quanto na não letal, nas duas linhagens de camundongos estudadas.

A elevação dos níveis de NO é necessária para a regulação negativa de CYP1A e 2B na malária?

Como comentado na Introdução deste trabalho, foi proposto que a elevação dos níveis de NO seria um elo necessário na cadeia de eventos que leva à regulação negativa da atividade de CYP por estímulos inflamatórios. Embora esta hipótese inicialmente formulada por Khatsenko *et al.* (1993) se aplique a infecções e processos inflamatórios em geral, ela é apoiada fundamentalmente por evidências obtidas em experimentos envolvendo a administração de endotoxina (LPS). Neste estudo, procuramos investigar se a elevação dos níveis de NO seria necessária para desencadear a depressão das atividades de CYP1A e 2B hepáticas que ocorre na malária murina.

Embora o exato papel do NO na resolução da infecção e na patogênese da malária, incluindo o aparecimento da malária cerebral, permaneça até certo ponto controverso, há vários estudos sugerindo que há uma elevação dos níveis do óxido nítrico no curso da infecção murina (Taylor-Robinson e Smith, 1999; Nahrevanian e Dascombe, 2001; Van der Heyde *et al.*, 2000).

Nahrevanian e Dascombe (2001), por exemplo, relataram que em camundongos (C57BL/6) infectados com *P. berghei* há um aumento transitório de NO plasmático no dia 3 pós-infecção seguido por queda no dia 5, quando as taxas de parasitemia subiram e atingiram os valores máximos. No nosso experimento, entretanto, nenhum aumento de NO sérico foi notado durante a evolução da infecção com *P. berghei*, quer entre os camundongos C57BL/6, quer entre os DBA-2. Por outro lado, no modelo de infecção não letal (*P. c. chabaudi*), notamos um pequeno aumento (menor que 2 vezes) do NO sérico no sexto (DBA-2) e no quinto (C57BL/6), ou seja, em torno do dia do pico de parasitemia.

Em camundongos C57BL/6 infectados com *P. chabaudi*, Nahrevanian e Dascombe (2001) evidenciaram um aumento de óxido nítrico plasmático já no primeiro dia de infecção, quando as parasitemias ainda eram muito baixas, seguido por uma queda no sétimo dia e nova elevação dos níveis de NO a partir do dia 14, quando as taxas de parasitemia em declínio atingiram os menores valores. Taylor-Robinson e Smith (1999), entretanto, descreveram um comportamento do NO na malária murina (camundongos NIH) causada pelo *P. chabaudi* que é bem diferente do que foi descrito por Nahrevanian e Dascombe (2001).

A evolução temporal da parasitemia e as alterações da concentração de nitrito após a infecção de camundongos NIH com *P. c. chabaudi* AS descritas por Taylor-Robinson e Smith (1999) são consistentes com o que notamos nas infecções com o *P. c. chabaudi*, exceto que no nosso caso, o dia da parasitemia máxima antecedeu em quatro a cinco dias o dia do pico de parasitemia observado por aqueles autores (pico no décimo dia). Taylor-Robinson e Smith (1999) determinaram, diariamente, os níveis de nitrito e encontraram uma elevação acentuada do NO em um único dia, que coincidiu com o dia da taxa máxima de parasitemia (*i.e.*, no dia 10 após a infecção). No nosso estudo, a elevação do NO também ocorreu no dia em que registramos a taxa máxima de parasitemia (*i.e.*, quinto dia após a infecção no C57BL/6 e sexto dia no DBA-2). É possível que o menor inóculo, de 10^5 hemácias parasitadas usado por Taylor-Robinson e Smith (1999) ou a diferença da linhagem murina (NIH) usada, explique o retardo do pico em relação aos que observamos.

É interessante notar que os aumentos de NO que observamos nas infecções com o *P. c. chabaudi* foram irrisórios se comparados ao aumento de aproximadamente 100 vezes na concentração de NO encontrado por Taylor-Robinson e Smith (1999). No nosso estudo, entretanto, notamos que nas infecções com *P. chabaudi*, no dia do pico da parasitemia (*i.e.*, nos dias 5, C57BL/6, e 6, DBA-2), todos os soros dos animais infectados (mas não os dos controles) apresentavam intensa cor vermelha, indicativa de hemólise. Esta hemólise não foi devido ao procedimento de coleta, porque não foi observada entre os controles não infectados nem entre os infectados antes e depois deste dia. Não observamos também hemólise nos

experimentos de infecção com *P. berghei*. Esta hemólise, obviamente, pode ter atenuado os níveis de NO medidos pela reação de Griess. Como Taylor-Robinson e Smith (1999) não relataram hemólise e registraram níveis muito mais elevados de NO, é possível que a coleta de sangue realizada por esses autores tenha antecedido a ruptura em massa das hemácias, o que não teria ocorrido no nosso caso. De qualquer modo, os resultados de Taylor-Robinson e Smith (1999) sugerem que a elevação de NO ocorreria apenas por período muito breve (menor que 24 horas) e que algumas horas poderiam fazer diferença em termos da magnitude da elevação de NO registrada.

O seqüestro de NO pela hemoglobina e pelo anion superóxido foi tema de artigo recente de Sobolewsky e colaboradores (2005). Embora tenha sido atribuído ao NO algum papel protetor durante a infecção malárica (na infecção aguda o *Plasmodium* induz as células Th1 a produzirem INF-gama, que ativa macrófagos a secretarem NO e EROs) os autores comentaram que no ambiente intra-eritrocitário, o plasmódio estaria relativamente protegido da ação tóxica do NO e das EROs, uma vez que habita o interior do vacúolo parasitóforo, que é circundado pela hemácia e, conseqüentemente, pela hemoglobina (*i.e.*, estaria “blindado” por ela). O seqüestro de NO e das EROs pela hemoglobina também ocorre fora da célula após a ruptura dos eritrócitos. O parasito permanece livre na circulação na forma merozoíta durante um breve período de tempo e, portanto, estaria por um tempo curto exposto à ação danosa do NO e das EROS. Todavia, é bom lembrar que a hemoglobina (Hb) livre parece ser mil vezes mais eficaz no seqüestro do NO do que a Hb intra-celular. Assim, a Hb liberada junto com os merozoítas, quando ocorre a ruptura da hemácia, continuaria a proteger o plasmódio contra o efeito parasiticida do NO (Liu *et al.*, 1998).

Embora os soros dos animais infectados com o *P. berghei* não tenham apresentado hemólise em nenhum momento de coleta durante a evolução da doença, o seqüestro de NO pela hemoglobina também pode ter ocorrido neste caso. Sobolewski *et al.* (2005) sugerem que a concentração da Hb livre no plasma de camundongos infectados com o *P. berghei* pode chegar a 100 μ M no animal em estágio terminal (moribundo), o que significa uma concentração muitas vezes superior à concentração da Hb que circunda o parasito quando ele está no vacúolo parasitóforo.

Exceto pela discreta e breve elevação notada na infecção pelo *P. c. chabaudi*, não observamos aumento dos níveis séricos do NO nos camundongos infectados, o que pode se dever ao sequestro e/ou a outros processos. Esses resultados sugerem, à primeira vista, que uma elevação dos níveis sistêmicos de NO não seria evento essencial para desencadear a regulação negativa das CYPs hepáticas. Existe, entretanto, a possibilidade de ter havido um aumento local da concentração de óxido nítrico no tecido hepático. Para examinar a hipótese

de que a malária poderia aumentar os níveis hepáticos de NO, sem repercussões sistêmicas, investigamos se haveria indução do mRNA da NOS2 (iNOS) neste órgão em camundongos infectados com *P. berghei*.

Como o mRNA da NOS2 estava induzido nos fígados tanto dos DBA-2 quanto dos C57BL/6 infectados com *P. berghei*, não foi possível descartar a hipótese de que uma elevação dos níveis de NO naquele órgão tenha contribuído de alguma forma para a regulação negativa das atividades de CYPs hepáticos. Isto poderia ocorrer de diferentes maneiras. Por exemplo, nitrosilando fatores nucleares de transcrição, o NO poderia regular negativamente a transcrição dos genes das CYPs. O NO poderia também atuar diretamente sobre a enzima. As hemoproteínas, como exemplificado por Sobolewski *et al.* (2005) para hemoglobina, são capazes de seqüestrar o NO com avidéz. Como os citocromos P450 também são hemoproteínas, é razoável supor que o NO poderia ligar-se à porção heme da proteína ou nitrosilar resíduos de aminoácidos (*e.g.*, cisteína) existentes em partes críticas da estrutura da enzima, comprometendo a afinidade pelo substrato e, conseqüentemente, diminuindo a atividade catalítica.

É importante destacar que a ligação do NO ao grupo prostético heme parecer ser lábil e prontamente reversível (Wink *et al.*, 1993). Neste caso, esta inibição da enzima pode ocorrer *in vivo*, e alterar a cinética de fármacos e outros xenobióticos, mas não seria evidenciada quando o órgão é removido e a atividade enzimática é determinada na fração microssomal. Durante o preparo dos microssomos, a ligação ao grupo heme provavelmente seria desfeita. A nitrosilação de resíduos de aminoácidos na proteína, entretanto, poderia dar lugar a uma inibição mais estável e duradoura.

A avaliação do mRNA da NOS2 nos animais com malária não letal pelo *P. chabaudi* está em andamento.

Mecanismos pelos quais a malária poderia modular a atividade de CYP1A e 2B

Beigneux *et al.* (2002) observaram que a reação de fase aguda em camundongos tratados com LPS resultava em depressão do mRNA dos receptores CAR e PXR e de seu parceiro RXR, o que ocorria quatro horas após o tratamento com a endotoxina e perdurava por pelo menos 16 horas. Essa diminuição da expressão de receptores nucleares (CAR, PXR e RXR) era acompanhada pela redução dos níveis dos mRNAs de CYP2B10 e 3A no fígado. É interessante ressaltar que Akira e Kishimoto (1992), em revisão dos estudos sobre o assunto, haviam enfatizado que um sítio de ligação ao NF- κ B está presente nos genes de proteínas de fase aguda e de citocinas, como IL-6 e IL-8.

Balmer *et al.* (2000), por outro lado, investigaram a reação de fase aguda sistêmica em modelos murinos de malária eritrocítica. Esses autores infectaram camundongos NIH com os plasmódios *P. chabaudi*, *P. vinckei* (letal e não letal) e *P. berghei* (letal) e observaram que houve uma produção acentuada da proteína amilóide P, a principal proteína de fase aguda de camundongos, cujo nível máximo foi alcançado no dia 10 pós-infecção.

Os nossos resultados mostraram que a atividade de CYP2B9/10 estava deprimida desde o dia 8 pós-infecção, quando as parasitemias ainda eram inferiores à 20%. Na infecção pelo *P. chabaudi*, verificamos que CYP2B9/10 (BROD) não foi alterada no camundongo DBA-2, mas no C57BL/6 a depressão da atividade catalítica destas isoformas ocorreu de forma pontual no dia 5 pós-infecção, coincidindo com o único momento em que houve uma (discreta) elevação dos níveis de NO.

Considerando essas observações e os nossos resultados, é razoável supor, ainda que de forma especulativa, que: 1) uma interação entre proteínas de fase aguda e fatores de transcrição, como NF- κ B, poderia levar à depressão do mRNA de CAR e, conseqüentemente, à uma inibição de CYP2B9/10 e também que 2) a nitrosilação pelo óxido nítrico de um ou mais fatores de transcrição envolvidos na regulação do receptor CAR poderia levar à depressão de CYP2B9/10 nas infecções letais e não letais.

Diante do que comentamos na Introdução deste trabalho sobre a modulação de CYP1A por estímulos inflamatórios, poderíamos especular que a inibição de CYP1A1/2 poderia se dar: 1) pela interação entre citocinas, fatores de transcrição e co-reguladores com o receptor AhR, levando à supressão da região promotora de *CYP1A1*, como proposto nos trabalhos de Ke (2001) e Tian (1999) e 2) pela nitrosilação de fatores de transcrição pelo óxido nítrico produzido pela NOS2 induzida e que teria escapado do seqüestro pela hemoglobina e anions superóxido.

Malária e enzimas de fase 2 do metabolismo (GST e UGT)

As glutathione S transferases (GSTs) são enzimas da fase 2 do metabolismo de grande relevância toxicológica, com destaque na área da carcinogênese química. As GST compreendem sete classes de enzimas em mamíferos, classificadas com base na similaridade entre as seqüências de aminoácidos da proteína em alpha, mu, pi, sigma, theta, ômega e zeta (Hayes *et al.*, 2005). Na fase 2 do metabolismo, as GSTs catalisam o ataque nucleofílico da glutathione aos compostos apolares (xenobióticos ou metabólitos da fase 1) que contém um átomo eletrofílico de carbono, nitrogênio ou enxofre. Esse grupo de enzimas também está envolvido no metabolismo do anion superóxido, do peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila produzidos endogenamente como conseqüência da respiração aeróbica.

Durante a resposta de defesa do organismo contra a invasão intracelular de parasitas, os fagócitos do hospedeiro produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como NO, anions superóxido e radicais hidroxila. No caso da malária, não só o organismo do hospedeiro, mas também o parasito produz grandes quantidades de peróxido de hidrogênio e anions superóxido no interior dos eritrócitos (Erel *et al.*, 1997). Atamna e Ginsburg (1993), por exemplo, demonstraram que as hemácias humanas infectadas com a forma trofozoíta do *P. falciparum* produziam duas vezes mais peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila do que as hemácias não parasitadas. Foi demonstrado também que os fagócitos de pacientes com malária aguda causada pelo *P. falciparum* produziam quantidades muito elevadas de EROS (Descamps-Latscha *et al.*, 1987).

No estresse oxidativo, em que há um desequilíbrio entre as ações dos agentes oxidantes e as defesas anti-oxidativas com vantagem para a ação pró-oxidativa, a resposta defensiva do organismo ao ataque de substâncias eletrofílicas é modulada por duas classes de fatores de transcrição, NF- κ B e AP-1 (*activator protein 1*). O elemento ARE (*antioxidant responsive element*) encontrado na região promotora do gene da GST e da superóxido-desmutase (SOD) é o mediador da indução dos genes anti-oxidantes específicos de mamíferos (Scandalios, 2005). Embora Choi e Kim (1998) tenham evidenciado a depressão dos mRNAs das isoformas hepáticas GSTA2 e A3, e, em menor grau, das GSTM1 e M2 em ratos tratados com LPS, esses autores descartam a participação do NF- κ B na regulação da expressão da GST.

Neste estudo, não encontramos alterações das atividades das GST microsomal e citosólica no fígado dos camundongos das duas linhagens (DBA-2 e C57BL/6) que foram infectadas com *P. berghei* ANKA e apresentavam elevadas taxas de parasitemia. Os estudos sobre as alterações de enzimas da fase 2 na malária são escassos, mas Ahmad e Srivastava (2007) encontraram resultados que divergem dos nossos em outro modelo murino de malária. Esses autores notaram que em camundongos DBA-2 e *Swiss Webster* infectados com *P. yoelii nigeriensis*, havia depressão da atividade da GST (citosólica e microsomal) no fígado e baço. Sohail *et al.* (2007) também encontraram uma depressão da GST no soro e plasma de indianos infectados com *P. vivax*. É possível que as aparentes discrepâncias entre este estudo e os de Ahmad e Srivastava (2007) e Sohail *et al.* (2007) quanto aos efeitos da malária sobre a atividade das GSTs se devam às diferenças quanto à gravidade do quadro clínico (parasito), quanto ao hospedeiro e quanto ao tecido em que a atividade foi determinada.

A glutationa, co-fator endógeno da reação de conjugação mediada pela GST, é um tripeptídeo não protéico (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) abundante em quase todas as células de mamíferos, que atua na defesa contra o ataque oxidativo por radicais livres,

compostos eletrofílicos, xenobióticos e outros oxidantes. Na célula, a glutatona ocorre nas formas livre e ligada à proteínas. A glutatona livre ocorre, sobretudo, na forma reduzida (GSH), que é convertida na forma oxidada, GSSG (dissulfeto de glutatona), durante o estresse oxidativo. O estado redox da glutatona depende das quantidades relativas das formas reduzida e oxidada, e a taxa GSH/GSSG, que na célula em repouso excede 100, durante o estresse oxidativo pode cair a 10 e até a 1 (Pastore *et al.*, 2003). A glutatona pode ser modulada por diferentes oxidantes e sistemas produtores de substâncias oxidativas (*e.g.*, EROs), como comentamos anteriormente e também por agentes alquilantes, citocinas, antioxidantes fenólicos, agentes que conjugam GSH, radiações e quimioterápicos, como apontado por Rahman (2005). Segundo esse autor, a síntese da glutatona é modulada, indiretamente, através do ARE e AP1, fatores de transcrição envolvidos na regulação da enzima (γ -glutamylcisteína sintetase ou glutamylcisteína ligase, GCL) que limita a taxa de síntese *de novo* da GSH. O possível envolvimento do fator de transcrição NF- κ B na modulação da expressão da subunidade catalítica da enzima GCL, e o do Nrf2, na indução do ARE dos genes das enzimas de conjugação da fase 2 e da GCL em resposta a eletrófilos, também tem sido discutido (Rahman, 2005). Para Pastore e colaboradores (2003), é possível que interações entre a GSH e o NF- κ B tenham um papel na comunicação entre a GSH e o sistema imune.

Erel *et al.* (1997) e Swarup-Mitra *et al.* (1982, apud Erel *et al.*, 1997) observaram diminuição das concentrações da glutatona intra-eritrocitária nos pacientes infectados com *P. vivax*. Srivastava *et al.* (2001), por outro lado, encontraram aumento da GSH nos eritrócitos de camundongos infectados com *P. yoelii nigeriensis* e nos eritrócitos de roedores do gênero *Mastomys* infectados com *P. berghei*. Rahman, em seu artigo de 2005, comenta a complexidade da regulação da glutatona citando vários exemplos neste sentido, como a rápida depleção intra-celular de GSH pela exposição *in vitro* de células epiteliais alveolares humanas ao TNF- α devido à oxidação da GSH para GSSG que é seguida de um aumento rebote da GSH como uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo, conseqüente à ativação da AP-1. Um estudo com fibroblastos pulmonares de ratos expostos ao óxido nítrico e seus doadores mostrou uma queda transitória da GSH, seguida pelo aumento da síntese, como conseqüência da regulação positiva (*up-regulation*) da expressão da GLC nessas células (White *et al.*, 1995).

Neste estudo, as concentrações hepáticas de glutatona estavam deprimidas nas fêmeas C57BL/6 infectadas com o *P. berghei*, mas no caso da linhagem DBA-2, não houve diferença entre infectados e controles. É importante ressaltar que as duas linhagens examinadas diferem

quanto aos níveis basais de glutathiona no fígado, sendo as concentrações da glutathiona no DBA-2 aproximadamente três vezes os níveis encontrados na linhagem C57BL/6.

Os ensaios de atividade enzimática das GSTs e a quantificação da glutathiona hepática no nosso estudo foram realizados em estágio avançado da malária, quando as taxas de parasitemia excediam 40%. Em vista do que foi anteriormente discutido, se as análises tivessem sido feitas em outros momentos durante a evolução da doença, é possível que os resultados não reproduzissem o que observamos nesta avaliação. O fato de termos encontrado depressão da glutathiona reduzida nos camundongos C57BL/6, mas não nos DBA-2, pode significar que, no momento da avaliação, o estresse oxidativo havia depletado a forma reduzida da glutathiona na primeira linhagem, enquanto, na segunda linhagem, os níveis da GSH já teriam retornado ao normal. Para uma melhor compreensão do estado redox da glutathiona na malária murina pelo *P. berghei*, mais adequado seria o acompanhamento temporal das taxas de GSH/GSSG hepáticas.

Não observamos também alteração da atividade de outra enzima da fase 2 presente na fração microsossomal hepática, a UGT. As UGTs são encontradas sobretudo no fígado, onde catalisam a conjugação ao ácido glicurônico de metabólitos de xenobióticos e de substâncias endógenas, como a bilirrubina, os hormônios esteroidais e o hormônio da tireóide. O hexobarbital, a morfina, o diclofenaco e o ácido valpróico são alguns dos inúmeros xenobióticos cujos metabólitos (ou eventualmente a molécula não transformada) são conjugados pela UGT para eliminação do organismo pela bile ou urina. A UGT também pode ser regulada pela inflamação. Neste sentido, Barbier e colaboradores demonstraram que a UGT é regulada por fatores que estão alterados na inflamação, como RXR, PPAR α e HNF4 (Barbier *et al.*, 2003_a, 2003_b, 2005 apud Aitken *et al.*, 2006). Consistente com o que Barbier e colaboradores relataram, Congiu *et al.* (2002) observaram que, em seres humanos, os níveis do mRNA da UGT hepática estão deprimidos durante a inflamação do tecido, mas permanecem inalterados na doença crônica não inflamatória. Richardson *et al.* (2006) também relataram a depressão do mRNA das isoformas UGT1A1, 1A9 e 2B5, mas não observaram alteração de outras isoformas da UGT no fígado de ratos tratados com LPS ou inoculados com *Citrobacter rodentium*, o que sugere que a inflamação/infecção deprime especificamente a expressão de algumas isoformas. Neste estudo, não observamos alteração da UGT nas linhagens estudadas, DBA-2 e C57BL/6, no quadro grave causado pela infecção com o *P. berghei*. Murdoch (1992) relatou ocorrer uma depressão da UGT em fígado isolado (*ex vivo*) de ratos infectados com *P. berghei*. Segundo os autores, este efeito da malária sobre a UGT pode ter sido devido à menor disponibilidade da UDPGA que, por sua vez, depende da disponibilidade de glicogênio, que estaria diminuída na malária.

Neste estudo, a atividade da UGT foi determinada na fração microssomal (*in vitro*) e, nesse caso, o co-fator UDPGA (extrínseco) foi acrescentado para possibilitar a reação. Assim, se a menor atividade da UGT observada por Murdoch foi devido unicamente à menor disponibilidade do co-fator, o resultado obtido por esses autores não seria reproduzido no nosso ensaio. Ismail *et al.* (1992) também descreveram uma depressão da reação de glicuronidação do paracetamol e do AZT em animais (ratos) com taxas de parasitemia entre 25 e 35% HP. Nesse estudo *in vivo*, Ismail *et al.* (1992) determinaram os níveis de conjugados na urina e, portanto, a depressão da conjugação por eles descrita também pode ter sido devida à menor disponibilidade de UDPGA, o que não influencia a velocidade da reação quando esta é medida, tal como fizemos, na fração microssomal *in vitro*. Além disso, no presente estudo, os microssomos hepáticos em que analisamos a atividade da UGT foram obtidos de camundongos com parasitemias mais elevadas (*i.e.*, superiores a 30%).

Indução de CYP2E1 e 2A5 na malária

O citocromo P4502E1 (CYP2E1) é uma isoforma CYP expressa constitutivamente e também induzível, que tem como substratos preferenciais substâncias de baixo peso molecular. O CYP2E1 é induzido pelo etanol, acetona, piridina e isoniazida (Novak e Woodcroft, 2000). Condições fisiológicas, como o nascimento e o jejum, e patológicas, como a obesidade e a diabetes, também estão associadas à indução de CYP2E1 (Chien *et al.*, 1997). A homologia entre as espécies é alta, o que resulta em uma designação única CYP2E1 para as isoformas no rato, no camundongo e em seres humanos (Lewis, 1996). A expressão de CYP2E1 é regulada em nível transcricional, mas o aumento dos níveis da proteína pode ocorrer também na ausência de alteração concomitante das concentrações do mRNA, através de mecanismos pós-transcricionais. Tanto a maior eficiência traducional, por estabilização do mRNA, quanto a degradação mais lenta, ou estabilização da proteína tem sido apontados como mecanismos envolvidos na regulação da expressão da proteína CYP2E1 (Novak e Woodcroft, 2000).

Neste estudo, empregamos a hidroxilação do *p*-nitrofenol (PNPH) como marcador da atividade de CYP2E1 no fígado. Entretanto, como salientamos na Introdução deste trabalho, a especificidade da reação de PNPH como marcadora da atividade de CYP2E1 sustentada por alguns autores tem sido posta em dúvida por outros. Este questionamento baseia-se, principalmente, no relato de que o CYP2A6 humano e o CYP2A5 murino também poderiam catalisar a reação de PNPH. A expressão de CYP2A5 varia amplamente entre linhagens murinas, mas as duas linhagens utilizadas neste estudo expressam a isoforma, sendo que o DBA-2 expressa melhor a enzima. Além disso, como constatamos, a atividade de CYP2A5

(COH) foi induzida pela infecção com *P. berghei* nos dois casos. Portanto, é possível que a maior atividade de PNPB nos camundongos infectados reflita, pelo menos em parte, a maior atividade de CYP2A5 e não de CYP2E1. Esta interpretação é sugerida pelo fato de Carvalho (2008) ter encontrado uma diminuição da atividade de PNPB e dos níveis de mRNA de CYP2E1 no fígado de camundongos *Swiss Webster* machos infectados com *P. berghei*. Os *Swiss Webster*, como verificamos em estudo anterior do laboratório (Conte *et al.*, 2007), tem atividades constitutivas de CYP2A5 (COH) muito baixas e, aparentemente, não expressam esta isoforma. Assim, o PNPB poderia ser um marcador relativamente específico de CYP2E1 no fígado dos camundongos *Swiss Webster*, mas não no caso dos C57BL/6 e DBA-2.

A CYP2A5 do camundongo, ortóloga da CYP2A3 do rato e da CYP2A6 de seres humanos, é expressa no fígado e em outros tecidos, inclusive na mucosa oral, no esôfago, nos rins, no pulmão, no cérebro e no intestino delgado. A expressão hepática de CYP2A4 e CYP2A5 em camundongos exibe um ritmo circadiano, sendo a expressão maior no período noturno (Lavery *et al.*, 1999). A CYP2A5 no fígado de camundongos pode ser induzida por substâncias químicas estruturalmente diversas, e entre as quais se destacam as hepatotoxinas pirazol e tetracloreto de carbono, os íons metálicos como cobalto, cério e índio, os agentes porfirinogênicos, como griseofulvina e tioacetamida, além do fenobarbital e do TCPOBOP (Salonpaa *et al.*, 1995; Lavery *et al.*, 1999; Gilmore e Kirby, 2004; Su e Ding, 2004). A indução de CYP2A5 em doenças infecciosas, como nas hepatites de origem viral, bacteriana e parasitária, na infecção com *Citrobacter rodentium*, na fasciolíase e na opistorquíase também foi demonstrada (Satarug *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2006). No fígado de camundongos, a indução de CYP2A4/5 pelo TCPOBOP parece indicar que o receptor CAR exerce um papel de destaque na regulação desses genes, embora os receptores PXR e PPAR α também possam estar envolvidos, como foi evidenciado com o ligante de PXR, pregnenolona carbonitrila (PCN), e com o ligante do PPAR α , Wy14,643, por Cai *et al.* (2002) e por Maglich *et al.* (2002), respectivamente. Arpiainem *et al.* (2005), por outro lado, demonstraram que o receptor AhR também está envolvido na regulação do CYP2A5 nos camundongos DBA-2N e C57BL/6. A multiplicidade de receptores e fatores nucleares aparentemente envolvidos na regulação da transcrição de CYP2A5 ilustra bem a complexidade da regulação dessa isoforma.

A indução de CYP2A5 que notamos nos camundongos DBA-2 e C57BL/6 infectados com *P. berghei* ANKA é consistente com a hipótese levantada por Gilmore e colaboradores (Gilmore *et al.*, 2003; Gilmore e Kirby, 2004) de que a indução desta isoforma está associada ao dano hepático. Esses autores estudaram, inicialmente, os efeitos do tratamento de camundongos DBA-2N com LPS de *Escherichia coli* (0,5 mg/kg) e pirazol (100 mg/kg) sobre

o mRNA, a proteína, e a atividade (COH, cumarina-hidroxilase) de CYP2A5. Embora 24 horas após os dois tratamentos os níveis da proteína de fase aguda amilóide P estivessem aumentados, o efeito sobre os níveis de mRNA, proteína e atividade (COH) foram opostos: enquanto o LPS deprimiu, o pirazol induziu CYP2A5. Ambos os tratamentos aumentaram os níveis séricos da ALT, mas este efeito, que traduz dano hepático, foi muito mais acentuado com o pirazol. A superexpressão da proteína grp78 - chaperona ligada ao retículo endoplasmático (RE) que é induzida pelo estresse oxidativo na organela - após o tratamento com o pirazol, reforçou a hipótese dos autores de que a indução de CYP2A5 estava associada à lesão hepatocelular, o que foi confirmado também pelo exame histopatológico. Esta hipótese foi adicionalmente sustentada pelo fato do pré-tratamento dos animais com vitamina E (anti-oxidante) ter atenuado a indução, e pelo fato do pré-tratamento com a butionina sulfoximina (BSO, pró-oxidante que depletava a glutathiona reduzida) ter induzido os níveis do mRNA de CYP2A5. O estresse oxidativo do RE como alteração subjacente à indução de CYP2A5 *in vitro* e *in vivo* foi o foco de um estudo subsequente de Gilmore e Kirby (2004). Para verificar se havia um elo entre a indução de CYP2A5 e o estresse do RE, os autores provocaram o estresse de diferentes maneiras: inibindo a Ca^{2+} -ATPase e a *N*-glicosilação, usando um ionóforo de cálcio, e empregando um agente redutor, o *trans*-4,5-dihidroxi-1,2-ditiano (DTT_{ox}). Os autores constataram que apenas este último (DTT_{ox}) foi capaz de induzir os níveis de mRNA de CYP2A5 nos hepatócitos dos camundongos. Com isto, Gilmore e Kirby (2004) demonstraram que a regulação positiva do CYP2A5 não estava associada a qualquer tipo de estresse do RE, mas à uma alteração do estado redox do RE, que poderia ser redutivo ou oxidativo. Como o pirazol induziu proteínas carboniladas e a GST, e os anti-oxidantes vitamina E e N-acetilcisteína reverteram o estresse oxidativo provocado por esta substância hepatotóxica, foi esclarecida a relação entre o pirazol e o dano oxidativo ao tecido.

Na malária causada pelo *P. berghei* nos camundongos DBA-2, constatamos a indução da atividade de CYP2A5 no fígado e a elevação das concentrações das transaminases ALT e AST no soro, o que é consistente com a associação, sugerida por Gilmore e colaboradores (Gilmore *et al.* 2003, Gilmore e Kirby, 2004), entre a indução da CYP2A5 e a produção de extensa lesão hepática. Não detectamos, no entanto, aumento de GST, que segundo Gilmore *et al.* (2003), seria um indicativo do estresse oxidativo, mas evidenciamos inibição da glutathiona reduzida na linhagem C57BL/6. Vale lembrar que na malária murina não letal (*P. c. chabaudi*), a indução de CYP2A5 nos camundongos DBA-2 ocorreu no dia 5 pós-infecção, exatamente no pico da parasitemia, e próximo ao único dia em que houve um discreto aumento do NO sérico, o que aconteceu no dia 6 pós-infecção. Não é possível saber, entretanto, se este aumento de NO, ou outras alterações coincidentes com ele, estão

associadas à indução da CYP2A5. Não há relatos na literatura de indução de CYP conseqüente à maior produção de NO.

É razoável supor que o mecanismo subjacente à indução de CYP2A5 na infecção letal e na infecção não letal dos camundongos DBA-2 seja, essencialmente, o mesmo. Neste sentido, é interessante mencionar o mecanismo proposto para indução de CYP2A5 em camundongos DBA-2 intoxicados agudamente com o cádmio. Alexidis *et al.* (1994) demonstraram que metais ou agentes que interferem com o equilíbrio celular do grupo heme induzem CYP2A5 e diminuem o teor total de CYP e de isoformas CYP. Abu-Bakar *et al.* (2005), por outro lado, observaram que o tratamento de camundongos DBA-2 com o cloreto de cádmio induzia acentuadamente os níveis do mRNA e da proteína e a atividade de CYP2A5 (COH). O aumento dos níveis do mRNA, da proteína e da atividade da heme-oxigenase 1 (HO-1), enzima que catalisa a etapa velocidade-limitante no catabolismo do heme, também era substancial e precedia a indução de CYP2A5. É interessante notar que: 1) a bilirrubina (BR) formada em decorrência do aumento da atividade da HO-1 era um substrato com alta afinidade para a CYP2A5, com K_m situado na mesma faixa de grandeza do K_m obtido para a cumarina, substrato preferencial da CYP2A5; 2) a BR causava uma inibição dose-dependente da atividade da COH em microssomos induzidos e 3) o anticorpo anti-CYP2A5 e a cumarina causavam uma inibição dose-dependente da degradação microssomal da BR (até aproximadamente 90%). Anteriormente, Abu-Bakar *et al.* (2004) haviam sugerido que a indução de CYP2A5 pelo cádmio envolvia o fator de transcrição Nrf2, regulador dos mecanismos de defesa celulares contra o estresse oxidativo.

Assim, foi sugerido que a indução da HO-1 pelo cádmio seria parte da defesa celular contra o estresse oxidativo, porque a produção de EROS foi acompanhada por rápida depressão de enzimas anti-oxidantes (superóxido desmutase – SOD - catalase e glutathione peroxidase - GSH-Px) e a reação catalisada pela HO-1 aumentou as concentrações tissulares dos pigmentos biliares anti-oxidantes ativos (Ossola e Tomaro, 1995; Stocker, 1990). No caso da intoxicação pelo cádmio, o mecanismo para a indução de CYP2A5 poderia ser explicado pela produção de EROs, o que ativaria fatores de transcrição associados à regulação transcricional do gene *hmx-1*, como o Nrf2, e induziria a HO-1, aumentando a degradação do heme. A conseqüência deste catabolismo acelerado do heme seria a diminuição da concentração celular do heme, o que levaria à uma redução da atividade da maioria das CYPs (hemeproteínas). Abu-Bakkar *et al.* (2005) levantaram a hipótese de que, na intoxicação pelo cádmio, o heme livre seria incorporado à apoproteína CYP2A5 (mas não à outras isoformas), porque essa enzima desempenharia um papel chave no metabolismo oxidativo da BR, seja produzindo antioxidantes que protegeriam a célula de danos futuros, seja pela manutenção do

equilíbrio entre a produção e a eliminação da BR, o que contribuiria para manter a integridade celular em condições de estresse oxidativo. Esta seria a primeira hipótese que atribui um papel fisiológico à CYP2A5. É interessante lembrar que a indução de CYP2A5 em outras situações também havia sido associada ao estresse oxidativo, como no caso da opistorquíase e do tratamento com pirazol (Kirby *et al.*, 1994; Gilmore *et al.*, 2004).

Nas infecções murinas pelos plasmódios *P. berghei* ANKA e *P. c. chabaudi*, o heme livre provavelmente está aumentado em virtude da ruptura dos eritrócitos e, portanto, a indução de CYP2A5 e a depressão de CYP1A e 2B que observamos poderiam, de certa forma, se ajustar ao esquema proposto por Abu-Bakkar *et al.* (2005) para a intoxicação pelo cádmio. Assim, a indução de CYP2A5 resultaria do estresse oxidativo a que estaria submetido o tecido hepático na malária, e nessas condições, seria um mecanismo voltado para o restabelecimento da homeostase celular.

A ocorrência de estresse oxidativo no fígado, nas condições em que verificamos a indução de CYP2A5 em camundongos infectados com *P. berghei* ou *P. c. chabaudi*, precisa ser caracterizada de forma mais abrangente. Neste sentido, ensaios que avaliam a presença de estresse oxidativo (e.g., substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARs), bem como a determinação da atividade da heme-oxigenase, estão em andamento no nosso laboratório.

Digno de nota neste contexto é o argumento de Ryter e Tyrrell (2000) de que a indução da HO é uma resposta celular ubíqua ao estresse oxidativo, e que as consequências desta indução poderiam ser tanto pró-oxidativas quanto anti-oxidativas, dependendo do potencial redox celular e do destino metabólico do ferro liberado pela degradação do heme.

Como sugerido por alguns autores, e apontado anteriormente nesta discussão, a isoforma CYP2A5 parece ter regulação ao mesmo tempo complexa e singular, que difere daquela da maioria das outras CYPs. Os dados que foram apresentados neste trabalho sobre as alterações de atividade da CYP2A5 (COH) no fígado de camundongos DBA-2 tratados com endotoxina (LPS) ilustram bem este fato. O LPS causou uma clara depressão da atividade de CYP2A5 em doses muito baixas (50 µg/kg a 2 mg/kg), muito inferiores às doses que elevaram o nível do NO sérico e que diminuíram a atividade de outras isoformas (e.g., CYP1A e 2B). Esta depressão de CYP2A5, entretanto, foi revertida à medida que as doses de LPS aumentaram, desaparecendo o efeito supressor nas doses mais elevadas de LPS. Pode-se dizer que a curva dose-resposta neste caso assumiu a forma de um “U”. É possível que viéssemos a nos deparar com uma indução da atividade de CYP2A5 (COH), em relação aos controles não-tratados, se tivéssemos elevado mais a dose do LPS (*i.e.*, alcançado as doses que desencadeiam um quadro típico de choque séptico). Se isso ocorresse, então a curva dose-efeito assumiria a forma de um “J”. Esse comportamento sugere que o mesmo estímulo pró-

inflamatório (LPS) poderia, dependendo da dose, deprimir ou induzir CYP2A5, sendo esta isoforma extremamente sensível à resposta depressora. Em outras palavras, numa escala crescente de intensidade do estímulo inflamatório, a CYP2A5 seria deprimida quando as outras isoformas ainda não são afetadas e voltaria à atividade basal ou estaria induzida, quando as demais isoformas são deprimidas. No momento, é difícil explicar os mecanismos subjacentes a esta transição na regulação da enzima. Outro fato surpreendente, e ainda sem explicação, foi a resposta de CYP2A5 (COH) ao tratamento combinado de uma dose alta de LPS (que não deprimiu a enzima) mais um inibidor da NOS2 (aminoguanidina). Nessas circunstâncias, como descrito nos resultados, houve uma clara indução da atividade de CYP2A5. A resposta da CYP2A5 ao tratamento com LPS, ao longo de um amplo intervalo de doses, merece ser mais estudada e pode ser uma abordagem útil para esclarecer a forma como essa isoforma singular é regulada na inflamação. Os dados existentes na literatura sobre os efeitos do LPS na expressão e atividade de CYP2A5 referem-se, na maioria dos casos, a doses pontuais, em geral altas, e deram origem a interpretações divergentes.

6 - CONCLUSÃO

Em linhas gerais, confirmamos neste trabalho as evidências da literatura sugestivas de que a malária deprime a atividade de isoformas citocromo P450 hepáticas e, além disso, mostramos que na infecção murina há indução de uma enzima em particular, a CYP2A5, ortóloga da 2A6 humana. A contribuição original deste estudo se estende também à observação que enzimas de conjugação (fase 2 do metabolismo de xenobióticos) presentes nas membranas do retículo endoplasmático (UGT e GST microssomais) ou livres no citosol (GST), não são afetadas de forma evidente pela malária. Este trabalho acrescenta ainda ao que havia sido até agora descrito, a demonstração de que a modulação da atividade de CYPs hepáticas ocorre não apenas em quadros terminais da malária murina grave e letal, mas também durante o curso da infecção não letal, nos momentos de parasitemia mais elevada. Contribuição adicional deste estudo é a comprovação de que as alterações do metabolismo de xenobióticos causadas pela malária podem levar a alterações do efeito de substâncias genotóxicas *in vivo*. A investigação do possível papel do óxido nítrico como mediador das alterações de atividade e expressão de CYP, não permitiu descartar essa hipótese mas, por outro lado, mostrou que há clara indução (mRNA) da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2 ou iNOS) no fígado e no baço dos camundongos infectados com *P. berghei*, a despeito do fato dos níveis séricos de NO permanecerem inalterados. Por último, evidenciamos, em uma série paralela de experimentos, com o emprego de um estímulo pró-inflamatório, o LPS de *E. coli*, que a atividade de CYP2A5 é regulada negativamente por doses extremamente baixas da endotoxina e que, à medida que as doses aumentam, há uma reversão do efeito depressor notado nas doses baixas, revelando que a relação dose-resposta nesse caso é não monotônica e do tipo “U” ou “J”.

As principais conclusões alcançadas neste trabalho podem ser pontualmente destacadas como se segue.

- 1- Na malária grave causada pelo *P. berghei* ANKA, há uma depressão da atividade (EROD) e expressão (proteína) de isoformas da subfamília CYP1A e da atividade (BROD) de CYP2B no fígado de camundongos C57BL/6 e DBA-2 fêmeas.
- 2- Contrastando com a depressão das CYP1A e 2B, há indução da CYP2A5 na malária grave causada pelo *P. berghei* em camundongos C57BL/6 e DBA-2. Na linhagem DBA-2, constatamos que a indução de CYP2A5 ocorre concomitantemente com a elevação dos níveis de transaminases (ALT e AST) no soro, o que é consistente com a hipótese de que a indução da isoforma está associada ao dano hepático.

- 3- Na infecção malárica letal (*P. berghei*) não houve alteração evidente da atividade das enzimas de conjugação (fase 2 do metabolismo) microsossomais (UGT e GST) e citosólicas (GST) analisadas no fígado dos camundongos (C57BL/6 e DBA-2).
- 4- A infecção letal com o *P. berghei*, entretanto, diminuiu os níveis hepáticos de glutathione reduzida (GSH) no camundongo C57BL/6, o que sugere uma exacerbação do estresse oxidativo nessa fase da malária.
- 5- Na malária grave causada pelo *P. berghei* em camundongos C57BL/6, houve uma modificação do efeito genotóxico de substâncias químicas, com a atenuação do efeito de clastógenos que necessitam de ativação metabólica, como a ciclofosfamida (CPA, CYP2B e 3A) e o 7,12-dimetildibenzo[*a*]antraceno (DMBA, CYP1A), e a intensificação do efeito de clastógenos de ação direta (EMS, etilmetanosulfonato). As alterações do metabolismo de xenobióticos causadas pela malária, portanto, resultaram em modificação da susceptibilidade do hospedeiro aos efeitos genotóxicos de substâncias químicas.
- 6- As alterações da atividade de isoformas CYP ocorreram não apenas no estágio terminal da malária murina letal, mas também durante a infecção de evolução não letal, particularmente nos momentos em que a parasitemia é mais elevada. Na infecção não letal com o *P. c. chabaudi*, observamos uma depressão da atividade catalítica de CYP1A e 2B (C57BL/6) e uma indução de CYP2A5 (DBA-2) no dia (ou em torno do dia) em que a taxa de parasitemia é máxima.
- 7- A reversão das alterações de atividade de CYP, ao longo da evolução da infecção não letal (*P. c. chabaudi*), enquanto ainda persistiam o aumento de peso e o aspecto mais escuro do fígado, sugerem que a modificação das enzimas não se deveu ao acúmulo de hemozoína no órgão.
- 8- Não houve elevação dos níveis de óxido nítrico no soro sanguíneo de camundongos C57BL/6 e DBA-2 ao longo da evolução da infecção com *P. berghei*. Na infecção com *P. c. chabaudi*, entretanto, houve discreto aumento (menor que 2 vezes) do nível sérico do NO apenas no dia da parasitemia máxima.
- 9- A malária causada pelo *P. berghei* ANKA aumentou os níveis de mRNA (RT-PCR quantitativo) da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 e DBA-2. A infecção, por outro lado, não induziu a NOS2 no cérebro desses camundongos. A indução da NOS2 no fígado não permite

descartar a hipótese de que a elevação do NO desempenha um papel na regulação negativa de CYP observada na malária, tal como sugerido por outros autores para a depressão de CYP em resposta a estímulos pró-inflamatórios de origem bacteriana (*e.g.*, LPS).

- 10- A depressão da atividade de CYP2B (BROD) causada pelo LPS foi revertida por uma dose de aminoguanidina (inibidor da NOS2) que foi suficiente para bloquear a elevação dos níveis séricos de NO, mas que *per se* não alterou a atividade da isoforma CYP no fígado dos camundongos DBA-2. Esse resultado é consistente com evidências apresentadas por outros autores sugerindo que o NO desempenha um papel na depressão da atividade de CYP2B produzida por estímulos inflamatórios (*e.g.*, LPS).
- 11- A atividade catalítica da CYP2A5 hepática foi deprimida pelo tratamento de camundongos DBA-2 com doses extremamente baixas de LPS. Numa escala crescente de doses, este efeito depressor de doses baixas de LPS (em que não ocorreu depressão de outras isoformas nem elevação do NO) foi revertido em doses mais elevadas, caracterizando uma relação dose-resposta não monotônica do tipo “U” ou “J”.
- 12- A complexidade da regulação de CYP2A5 por estímulos inflamatórios foi evidenciada ainda pelo fato da aminoguanidina (50 e 100 mg/kg i.p.) e do LPS (5 mg/kg i.p.), quando administrados concomitantemente, mas não quando injetados isoladamente, terem induzido a enzima.

7 - PERSPECTIVAS

As perspectivas, ao curto e médio prazo, de desenvolvimento da linha de investigação que iniciamos com este trabalho são as seguintes:

1. Aprofundar a investigação dirigida ao esclarecimento dos mecanismos envolvidos na modulação da expressão e atividade de isoformas CYP hepáticas nos modelos murinos de malária que empregamos neste trabalho. A nossa intenção é acompanhar a regulação das diferentes isoformas quantificando o mRNA (por RT-PCR quantitativo) no tecido. Essa abordagem parece ter algumas vantagens em relação à medida da atividade catalítica para estudar a modulação das CYPs na malária. As modificações fisiopatológicas, incluindo as alterações de produção de citocinas, parecem ocorrer de forma rápida durante a evolução da infecção (ciclo eritrocítico) para a morte, para um quadro de comprometimento neurológico (malária cerebral) ou para a resolução (infecções não letais). Nessas circunstâncias, se a regulação ocorre principalmente ao nível gênico, a quantificação do mRNA deve permitir um controle mais fino e sensível das alterações desencadeadas pela doença. A atividade das isoformas talvez traduza melhor o que pode ocorrer em termos de consequências para o indivíduo (modificações farmacocinéticas e de toxicidade), mas é um indicador mais tardio do que ocorre ao nível da transcrição, já que o reflexo em termos de alteração da atividade depende, por exemplo, da renovação (*turnover*) da proteína. Neste caminho, pretendemos ainda investigar de que forma a modulação de CYP é influenciada pela expressão de citocinas (pró- e anti-inflamatórias) que nos parecem ser – de alguma forma – importantes atores nesse processo.

2. Investigar – através dos níveis de mRNA – se a modulação descrita no fígado ocorre também em outros tecidos (extra-hepáticos), com destaque para o cérebro, baço, rins e pulmões. Aqui também o emprego da metodologia do RT-PCR quantitativo parece ser fundamental, porque a medida da atividade só é viável em tecidos em que é abundante a expressão da isoforma examinada.

3. Estudar o papel do heme livre, de moléculas produzidas pelo parasita e do estresse oxidativo na regulação das CYP hepáticas, com ênfase na regulação da CYP2A5, ortóloga da CYP2A6 humana. Como discutimos ao longo deste trabalho, a CYP2A5 parece participar do catabolismo da bilirrubina e ter um papel nos processos fisiológicos voltados para a manutenção da homeostase celular. Para investigar como esses fatores afetam a regulação de CYP2A5 e de outras isoformas, pretendemos utilizar sistemas celulares *in vitro* (e.g., culturas de hepatócitos) e, nesses sistemas, quantificar a expressão (níveis do mRNA) de isoformas, receptores e fatores nucleares de transcrição. Substâncias que interferem (e.g.,

inibidores) com a expressão dos diferentes receptores e fatores de transcrição seriam também utilizados nesses sistemas *in vitro*.

4. Esclarecer como se dá a regulação negativa da atividade catalítica de CYP2A5 por doses baixas de LPS. Pretendemos também verificar se, como supomos, há uma regulação positiva desta isoforma em doses mais elevadas de LPS e no choque séptico. Se isto de fato ocorre, fica claro que há uma transição da regulação negativa para a positiva dependendo da intensidade do estímulo inflamatório. Neste caso, pretendemos investigar que eventos são determinantes desta transição de uma para outra resposta.

5. Verificar se há indução (mRNA, RT-PCR quantitativo) da NOS2 no fígado, baço e cérebro de camundongos em diferentes momentos (além do que avaliamos neste trabalho) da evolução da malária murina letal (*P. berghei*) e não letal (*P. c. chabaudi*). Pretendemos, complementarmente, determinar a atividade da NOS2 no cérebro e baço, já que há dificuldades técnicas para fazê-lo no fígado.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel EL, Bammler TK, Eaton DL. Biotransformation of methyl parathion by glutathione S-transferase. *Toxicol Science*. 2004;79:224-32.

Abu-Bakar A, Satarug S, Marks GC, Lang MA, Moore MR. Acute cadmium chloride administration induces hepatic and renal CYP2A5 mRNA, protein and activity in the mouse: involvement of transcription factor NRF2. *Toxicol Lett*. 2004 Mar 21;148(3):199-210.

Abu-Bakar A, Moore MR, Lang MA, Evidence for induced microsomal bilirubin degradation by cytochrome P450A5. *Biochem Pharmacol*. 2005;70:1527-35.

Agrawal A. Studies on drug metabolizing enzymes during artheeter treatment of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infected mice cerebral microvessels. *J Commun Dis*. 2005;37(1): 44-50.

Ahmad R, Srivastava AK. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on hepatic and splenic glutathione-S-transferase(s) in Swiss albino and db/+ mice: efficacy of mefloquine and menadione in antimalarial chemotherapy. *Parasitology*. 2007 Jul;134(Pt 7):931-38.

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

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

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

Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev*. 1992 Jun;127:25-50.

Alexidis AN, Rekka EA, Kourounakis PN. Influence of mercury and cadmium intoxication on hepatic microsomal CYP2E and CYP3A subfamilies. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1994 Jul;85(1):67-72.

Allis JW, Robinson BL. A kinetic assay for p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. *Anal Biochem.* 1994;219:49-52.

Al-Mofleh IA, al-Khuwaitit SA, Mahmoud AA, Kyegombe DB, al-Tuwaijris AS. Hepatic microsomal protein and cytochrome P-450 in Balb/c mice infected with *Leishmania*. *J Gastroenterol Hepatol.* 1989;4(6):513-19.

Alvares AP, Ueng TH, Scheibel LW, Hollingdale MR. Impairment of hepatic cytochrome P-450 dependent monooxygenases by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1984 Nov;13(3):277-82.

Anderson GR, Hasan A, Yin H, Qadri I, Quattrochi LC. Regulation of the CYP1A1 gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin but not by beta-naphthoflavone or 3-methylcholanthrene is altered in hepatitis C virus replicon-expressing cells. *Mol Pharmacol.* 2006;70(3):1062-70.

Ansher S, Thompson W, Snoy P, Habig W. Role of endotoxin in alterations of hepatic drug metabolism by diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect Immun.* 1992 Sep;60(9):3790-98.

Ansher S, Thompson W, Bridgewater J, Snoy P. Pertussis toxin-induced alterations of murine hepatic drug metabolism following administration of diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect Immun.* 1993 Oct;61(10):4240-47.

Ansher SS, Thompson W. Modulation of hepatic mRNA levels after administration of lipopolysaccharide and diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed (DTP vaccine) to mice. *Hepatol.* 1994 Oct;20(4Pt1):984-91.

Armstrong SG, Renton, KW. Mechanism of hepatic cytochrome P450 modulation during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Mol Pharmacol.* 1993_a;44(3):677.

Armstrong S, Renton KW. Hepatic cytochrome P450 and related drug biotransformation during an outbreak of mouse hepatitis virus in a colony of Swiss BALB/c mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993 *b*;71(2):188-90.

Armstrong SG, Renton, KW. Factors involved in the down-regulation of cytochrome P450 during *Listeria monocytogenes* infection. *Int J Immunopharmacol.* 1994;16(9):747-54.

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

Ashino T, Oguro T, Shioda S, Horai R, Asano M, Sekikawa K et al. Involvement of interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha in CYP3A11 and 2C9 down-regulation by *Bacillus Calmette-Guerin* and lipopolysaccharide in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 2004 Jul;32(7):707-14.

Ashino T, Arima Y, Shioda S, Iwakura Y, Numazawa S, Yoshida T. Effect of interleukin-6 neutralization on CYP3A11 and metallothionein-1/2 expressions in arthritic mouse liver. *Eur J Pharmacol.* 2007 Mar 8;558(1-3):199-207.

Atamna H, Ginsburg H. Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Oct;61(2):231-41.

Awney HA, Ghzlan HE, Sheweita SA, Mostafa MH. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection increased the mutagenicity of benzo(a)pyrene, the activity of aryl hydrocarbon hydroxylase and the formation of hepatic microsomal hydrogen peroxide. *Toxicology.* 2001 Jun 21;163(2-3):213-18.

Azri S, Renton KW. Factors involved in the depression of hepatic mixed function oxidase during infections with *Listeria monocytogenes*. *Int J Immunopharmacol.* 1991;13(2-3):197-204.

Balmer P, McMonagle F, Phillips RS. Experimental erythrocytic malaria infection induces elevated serum amyloid P production in mice. *Immunol Lett.* 2000 Jun 1;72(3):147-52.

Barbier O, Duran-Sandoval D, Pineda-Torra I, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. *J Biol Chem.* 2003;*a*;278:32852-60.

Barbier O, Villeneuve L, Bocher V, Fontaine C, Torra IP *et al.* The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene. *J Biol Chem.* 2003;*b*;278:13975-83.

Barbier O, Girard H, Inoue Y, Duez H, Villeneuve L *et al.* Hepatic expression of the UGT1A9 gene is governed by hepatocyte nuclear factor 4alpha. *Mol Pharmacol.* 2005;*67*:241-49.

Batra JK, Venkitasubramian TA, Raj HG. Drug metabolism in experimental tuberculosis: I. Changes in hepatic and pulmonary monooxygenase activities due to infection. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1987;*12*(2):109-14.

Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Reduction in cytochrome P-450 enzyme is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;*293*(1):145-49.

Berg-Candolfi M, Candolfi E. Depression of the N-demethylation of erythromycin, azithromycin, clarithromycin and clindamycin in murine *Toxoplasma* infection. *Int J Parasitol.* 1996;*26*(11):1321-23.

Berg-Candolfi M, Candolfi E, Benet LZ. Suppression of intestinal and hepatic cytochrome P4503A in murine *Toxoplasma* infection. Effects of N-acetylcysteine and N(G)-monomethyl-L-arginine on the hepatic suppression. *Xenobiotica.* 1996;*26*(4):381-94.

Biro-Sauver B, Eeckhoutte C, Sutra JF, Callaja C, Alvinerie M, Galtier P. Consequences of challenge infections with *Fasciola hepatica* on rat liver P450-dependent metabolism of sex hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;*51*(3-4):209-17.

Bock KW, Burchell B, Dutton GJ, Hanninen O, Mulder GJ, Owens IS et al. UDP-glucuronosyltransferase activities Guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochem Pharmacol.* 1983;32(6) 953-55.

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

Brian de Souza J, Riley EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection.* 2002;4:291-300.

Brodie B, Gillette JR, La Du BN. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annu Rev Biochem.* 1958;27:427-54.

Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer, RT. Ethoxy-pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol.* 1985;34(18):3337-45.

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

Calleja C, Eeckhoutte C, Larrieu G, Dupuy J, Pineau T, Galtier P. Differential effects of interleukin-1 beta, interleukin-2, and interferon-gamma on the inducible expression of CYP 1A1 and CYP 1A2 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Oct 9;239(1):273-78.

Camargo, EP. 2003 Malária, Maleita, Paludismo. *In: Ciência e Cultura* Temas e Tendências ano 55: 26-29.

Cantwell CA, Sterneck E, Johnson PF. Interleukin-6-specific activation of the C/EBPdelta gene in hepatocytes is mediated by Stat3 and Sp1. *Mol Cell Biol.* 1998 Apr;18(4):2108-17.

Cao Z, Hardej D, Trombetta LD, Trush MA, Li Y. Induction of cellular glutathione and glutathione S-transferase by 3H-1,2-dithiole-3-thione in rat aortic smooth muscle A10 cells: protection against acrolein-induced toxicity, Atherosclerosis. 2003;166(2):291-302.

Cao Z, Li Y. The chemical inducibility of mouse cardiac antioxidants and phase 2 enzymes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 14;317(4):1080-88.

Carcillo JA, Doughty L, Kofos D, Frye RF, Kaplan SS, Sasser H, Burckart GJ. Cytochrome P450 mediated-drug metabolism is reduced in children with sepsis-induced multiple organ failure. 2003;29(6):980-84.

Carvalho RS. Influência da malária na biotransformação de xenobióticos: alterações na expressão/atividade de enzimas do complexo citocromo P450. Tese de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica/CCS UFRJ em 22/02/2008.

Cha YN, Edwards R. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on the hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976;199 (2):432-40.

Cha YN, Heine HS, Bueding E. Effect of unisexual *Schistosoma mansoni* infections on hepatic drug metabolism of mice. *Am J Trop Med Hyg.* 1980_a;29(2):227-33.

Cha YN, Byram Jem, Heine HS, Bueding E. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on hepatic drug-metabolizing capacity of athymic nude mice. *Am J Trop Med Hyg.* 1980_b;29 (2):234-38.

Chang KC, Bell TD, Lauer BA, Chai H. Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet.* 1978 May 27;1(8074):1132-33.

Chemin I, Ohgaki H, Chisari FV, Wild CP. Altered expression of hepatic carcinogen metabolizing enzymes with liver injury in HBV transgenic mouse lineages expressing various amounts of hepatitis B surface antigen. *Liver.* 1999;19(2):81-87.

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 Dec;307(3):1205-12.

Chien JY, Thummel KE, Slattery, JT. Pharmacokinetic consequences of induction of CYP2E1 by ligand stabilization. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(10):1165-75.

Choi SH, Kim SG. Lipopolysaccharide inhibition of rat hepatic microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase gene expression irrespective of nuclear factor-kappa B activation. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(11):1427-36.

Chomarat P, Sipowicz MA, Diwan BA, Fornwald LW, Awasthi YC, Anver MR et al. Distinct time courses of increase in cytochromes P450 1A2, 2A5 and glutathione S-transferases during the progressive hepatitis associated with *Helicobacter hepaticus*. *Carcinogenesis.* 1997;18(11):2179-90.

Coelho PM, Freire AC, Araújo FG, Pellegrino J, Pereira LH. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on pentobarbital-induced sleeping-time in mice. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26(1):186-87.

Combes V, Coltel N, Faille D, Wassmer SC, Grau GE. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 2006 May 1;36(5):541-6.

Congiu M, Mashford ML, Slavin JL, Desmond PV. UDP glucuronosyltransferase mRNA levels in human liver disease. *Drug Metab Dispos.* 2002 Feb;30(2):129-34.

Conte FP, Fidalgo-Neto AA, Manhães-Rocha DA, Paumgartten FJR, De-Oliveira ACAX. Activity of liver microsomal enzymes during the chronic phase of murine schistosomiasis. *Braz J of Med Biol Res.* 2007;40:657-62.

Coombs GH, Wolf CR, Morrison VM, Craft JA. Changes in hepatic xenobiotic-metabolising enzymes in mouse liver following infection with *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990;41(1):17-24.

Cox FEG. Major animal models in malaria research: rodent. *In: Malaria: Principles and Practice of Malariology.* Eds. Wernsdorfer WH, Sir McGregor I. Edinburgh: Churchill Livingstone 1988 Capítulo 49:1504-43.

Crawford JH, Yang S, Zhou M, Simms HH, Wang P. Down-regulation of hepatic CYP1A2 plays an important role in inflammatory responses in sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(2):501-8.

Crnic AP, Sakar D, Pompe-Gotal J, Bidin Z, Lojkic I, Cajavec S. Effects of two infectious bursal disease vaccine virus strains on hepatic microsomal enzyme activities in chickens. *Acta Vet Hung.* 2006 Jun;54(2):281-93.

De-Oliveira ACAX, Ribeiro-Pinto LF, Paumgarten FJR. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by myrcene and other monoterpenoid compounds. *Toxicol Lett.* 1997; 92:39-46.

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

De Paepe P, Belpaire FM, Buylaert WA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations when treating patients with sepsis and septic shock. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(14):1135-51.

Descamps-Latscha B, Lunel-Fabiani F, Kara-Binis A, Druilhe P. Generation of reactive oxygen species in whole blood from patients with acute falciparum malaria. *Parasite Immunol.* 1987 Mar;9(2):275-79.

Edwards G, McGrath CS, Ward SA, Supanaranond W, Pukrittayakamee S, Davis TM et al. Interactions among primaquine, malaria infection and other antimalarials in Thai subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 1993;35:193-98.

El-Bassiouni EA, Mostafa MH, El-Sewedy SM, El-Meligy S, Abdel-Aziz T, Abdel-Rafee A. Hepatic microsomal enzymes in *S. mansoni* infected mice: II. Effect of duration of infection and lindane administration on aminopyrine demethylase and aniline hydroxylase. *J Environ Sci Health.* 1984;19(2):193-207.

El-Lakkany NM, Seif El-Din SH, Badawy AA, Ebeid FA. Effect of artemether alone and in combination with grapefruit juice on hepatic drug-metabolizing enzymes and biochemical aspects in experimental *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2004 Nov;34(12):1405-12.

Emerole GO, Thabrew MI, Emeh JÁ. Altered hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme activity resulting from experimental infection of rats with *Trypanosoma b. brucei*. *Enzyme*. 1983;29(3):183-88.

Erel O, Kocyigit A, Avci S, Aktepe N, Bulut V. Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clin Biochem*. 1997;30(8):631-39.

Eum H-A, Yeom D-H, Lee S-M. Role of nitric oxide in the inhibition of liver cytochrome P450 during sepsis. *Nitric oxide*. 2006;15:423-31.

Farquhar D, Loo TL, Gutterman JU, Hersh EM, Luna MA. Inhibition of drug-metabolism enzymes in the rat after *Bacillus Calmette-Guérin* treatment. *Biochem Pharmacol*. 1976 Jul 1;25(13):1529-35.

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

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

Fowler BA, Kleinow KM, Squibb KS, Lucier GW, Hayes AW. *In: Organelles as Tools in Toxicology* cap. 33. *Principles and Methods of Toxicology*. Editor A. Wallace Hayes 3a edição. 1994, p.1222-23.

Fujita K, Kamataki T. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of N-alkylnitrosamines: application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mutat Res*. 2001 Nov 1;483(1-2):35-41.

Fukuda Y, Sassa S. Suppression of cytochrome P4501A1 by interleukin-6 in human HepG2 hepatoma cells. 1994 Mar 29;47(7):1187-95.

Funseth E, Ilback NG. Coxsackievirus B3 infection alters the uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin into various tissues of the mouse. *Toxicol*. 1994;90(1-2):29-38.

Funseth E, Payhlman M, Eloranta ML, Friman G, Ilback NG. Effects of coxsackievirus B3 infection on the acute-phase protein metallothionein and on cytochrome P-4501A1 involved in the detoxification processes of TCDD in the mouse. *Sci Total Environ.* 2002;284(1-3):37-47.

Galtier P, Eeckhoutte C, Larrieu G. *Fasciola hepatica*: liver enzymes in rats and interaction with chemical inducers. *Exp Parasitol.* 1987;63(2):189-94.

Garcia Del Busto Cano E, Renton KW. Modulation of hepatic cytochrome P450 during *Listeria monocytogenes* infection of the brain. *J Pharm Sci.* 2003;92(9):1860-68.

Gharavi N, El-Kadi AOS. Role of nitric oxide in downregulation of cytochrome P4501a1 and NADPH: quinone oxidoreductase 1 by tumour necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J Pharmac Sci.* 2007;96(10):2795-807.

Ghazal A, Mahfouz M, Makar AB. Effect of schistosomal infection and of schistosomicidal drugs on the drug metabolizing enzymes of mouse liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1974;282:181-86.

Giampietri A, Pucetti P, Contessa AR. Depression of hepatic biotransformation by chemical immunoadjuvants. *J Immunopharmacol.* 1981;3(2):251-64.

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

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

Glazier AP, Kokwaro GO, Edwards G. Possible isozyme-specific effects of experimental malaria infection with *Plasmodium berghei* on cytochrome P450 activity in rat liver microsomes. *J Pharm Pharmacol.* 1994;46(5): 352-55.

Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature.* 2002 Feb;415(7):673-76.

Griess J. P. Ber Deutsch Chem Ges. 1879;12, 426.

Griffith JW, O'Connor C, Bernard K, Town T, Goldstein DR, Bucala R. Toll-like receptor modulation of murine cerebral malaria is dependent on the genetic background of the host. J Infect Dis. 2007 Nov 15;196(10):1553-64.

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

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem. 1974;249(22):7130-39.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005; 45:51-88.

Hayney MS, Hammes RJ, Fine JP, Bianco JA. Effect of influenza immunization on CYP3A4 activity. Vaccine. 2001 Dec 12;20(5-6):858-61.

Hayney MS, Buck JM. Effect of age and degree of immune activation on cytochrome P4503A4 activity after influenza immunization. Pharmacother. 2002 Oct;22(10):1235-38.

Hernandez-Valladares M, Naessens J, Nagda S, Musoke AJ, Rihet P, ole-MoiYoi OK, Iraqi FA. Comparison of pathology in susceptible A/J and resistant C57BL/6 mice after infection with different sub-strains of Plasmodium chabaudi. Exper Parasitol. 2004;108:134-41.

<http://www.niaid.nih.gov/publications/malaria/pdf>, acessado em 14/03/2008.

Ismail S, Back DJ, Edwards G. The effect of malaria infection on 3'-azido-3'-deoxitimidina and paracetamol glucuronidation in rat liver microsomes. Biochem Pharmacol. 1992;44(9):1879-82.

Israel BC, Blouin RA, McIntyre W, Shedlofsky SI. Effects of interferon-alfa monotherapy on hepatic drug metabolism in cancer patients. Br J Clin Pharmacol. 1993 Sep;36(3):229-35.

Itoh M, Nakajima M, Higashi E, Yoshida R, Nagata K, Yamazoe Y et al. Induction of human CYP2A6 is mediated by the pregnane X receptor with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Nov;319(2):693-702.

Jann MW, Fidone GS. Effect of influenza vaccine on serum anticonvulsant concentrations. *Clin Pharm.* 1986 Oct;5(10):817-20.

Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting. *Hepatology.* 2001 Mar;33(3):668-75.

Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J.* 2002 Nov;16(13):1799-8012.

Kalsotra A, Anakk S, Brommer CL, Kikuta Y, Morgan ET, Strobel HW. Catalytic characterization and cytokine mediated regulation of cytochrome P450 4Fs in rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2007 May 1;461(1):104-12.

Kawase A, Tsunokuni Y, Iwaki M. Effects of alterations in CAR on bilirubin detoxification in mouse collagen-induced arthritis. *Drug Metab Dispos.* 2007 Feb;35(2):256-61.

Ke S, Rabson AB, Germino JF, Gallo MA, Tian Y. Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 2001 Oct 26;276(43):39638-44.

Kennedy SW, Jones SP. Simultaneous measurement of cytochrome P450 catalytic activity and total protein concentration with fluorescent plate reader. *Anal Biochem.* 1994;222:217-23.

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

Khatsenko OG, Boobis AR, Gross SS. Evidence for nitric oxide participation in down-regulation of CYP2B1/2 gene expression at the pretranslational level. *Toxicol Lett.* 1997 Feb 7;90(2-3):207-16.

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

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

Kim RB, Wilkinson GR. CYP2E1 activity is not altered by influenza vaccination. *Br J Clin Pharmacol.* 1996 Oct;42(4):529-30.

Kirby GM, Pelkonen P, Vatanasapt V, Camus A-M, Wild CP, Lang MA. Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol Carcinog.* 1994;11:81-9.

Kokwaro GO, Glazier AP, Ward SA, Breckenridge AM, Edwards G. Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on phenacetin O-deethylation by rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1993_a;45(6):1235-41.

Kokwaro GO, Ismail S, Glazier AP, Ward AS, Edwards G. Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on the metabolism of antipyrine and metronidazole in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1993_b;45(6):1243-49.

Kollara A, Brown TJ. Functional interaction of nuclear receptor coactivator 4 with aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Jul 28;346(2):526-34.

Kraemer MJ, Furukawa CT, Koup JR, Shapiro GG, Pierson WE, Bierman CW. Altered theophylline clearance during an influenza B outbreak. *Pediatrics.* 1982; 69(4):476-80.

Krakovskia ME, Ashirmetov AKh, Musabaev EI, Alieva LG. The status of the monooxygenase enzyme system of the liver in *Salmonella* infection in rats. *Vopr Med Khim.* 1989;35(4):89-91.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-85.

Langouet S, Corcos L, Abdel-Razzak Z, Loyer P, Ketterer B, Guillouzo A. Up-regulation of glutathione S-transferase alpha by interleukin 4 in human hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216(3):793-800.

Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, Schibler U et al. Circadian expression of the steroid 15 α -hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):6488-99.

Leeson GA, Biedenbach SA, Chan KY, Gbson JP, Wright GJ. Decrease in the activity of the drug-metabolizing enzymes of rat liver following the administration of tilorone hydrochloride. *Drug Metab Dispos* . 1976;4(3):232-38.

Leo KU, Grace JM, Li Q, Peggins J, Mitchell AL, Aguilar T et al. Effects of *Plasmodium berghei* infection on artheeter metabolism and disposition. *Pharmacol*. 1997 54(5):276-84.

Lescut D, Fouin-Fortunet H, Moore N, Petit J, Hecketsweiler B, Lemeland JF et al. Liver glutathione and cytochrome P450 activity in experimental infection: study of the relative effects of infectious stress and malnutrition. *Crit Care Med*. 1991;19(9):1183-87.

Lewis DFV 1996. P450 Substrate Specificity and Metabolism. *In: Cytochromes P450 Structure Function and Mechanism*. Taylor & Francis UK USA.

Li S, Hu ZH, Miao XH. Effects of chronic HBV infection on human hepatic cytochrome P450 3A. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86(38):2703-706.

Li-Masters T, Morgan ET. Down-regulation of phenobarbital-induced cytochrome P450 mRNAs and proteins by endotoxin in mice: independence from nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(12):1703-11.

Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka, Clark DA, Lancaster JR. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*. 1998;273:18709-13.

Lofgren S, Hagbjork AL, Ekman S, Fransson-Steen R, Terelius Y. Metabolism of human cytochrome P450 marker substrates in mouse: a strain and gender comparison. *Xenobiotica*. 2004 Sep;34(9):811-34.

Lopez P, Gonzalez P, Tuaton MJ, Gonzalez-Gallego J. The effects of experimental fasciolosis on bilirubin metabolism in the rat. *Exp Parasitol*. 1994;78(4):386-93.

MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*. 1987;189:103-12.

Macnee CM, Nimmo-Smith RH. Effects of *Corynebacterium parvum* vaccine on drug metabolism in the mouse. *Dev Biol Stand*. 1977 Apr 13-15;38:427-30.

Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkin-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol*. 2002;62:638-46.

Manhães-Rocha DA, Conte FP, Fidalgo-Neto AA, De-Oliveira ACAX, Ribeiro-Pinto LF, Paumgartten FJR. Alterations of hepatic microsomal enzymes in the early phase of murine schistosomiasis. *Acta Trop*. 2005;95:58-66.

Mansor SM, Ward SA, Edwards G. The effect of fever on quinine and quinidine disposition in the rat. *J Pharm Pharmacol*. 1991_a;43(10):705-8.

Mansor SM, Ward SA, Edwards G. The effect of malaria infection on antipyrine metabolite formation in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1991_b;41(8):1264-66.

Martin ST, Black SD. Detergent effects in rabbit liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase studied by means of a continuous spectrophotometric assay with *p*-nitrophenol. *Biochem Biophys Res Comm*. 1994;200(2):1093-98.

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

Masubuchi Y, Horie T. Endotoxin-mediated disturbance of hepatic cytochrome P450 function and development of endotoxin tolerance in the rat model of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Drug Metab Dis.* 2004;32(4):437-41.

Masubuchi Y, Enoki K, Horie T. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Drug Metab Disp.* 2008 Mar;36(3):597-603.

Matsuura Y, Watanabe H, Fukuda T, Yoshida T, Kuroiwa Y. A sustained increase of microsomal heme oxygenase activity following treatment of rats with Baillus Calmette-Guerin and *Corynebacterium parvum*: its possible relation to the decrease of cytochrome P-450 content. *J Pharmacobiodyn.* 1985 Aug;8(8):669-78.

McCarthy JS, Furner RL, Van Dyke K, Stitzel RE. Effect of malarial infection on host microsomal drug-metabolism enzymes. *Biochem Pharmacol.* 1970 Apr;19(4):1341-49.

Meredith CG, Christian CD, Johnson RF, Troxell R, Davis GL, Schenker S. Effects of influenza virus vaccine on hepatic drug metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 1985 Apr;37(4):396-401.

Mihaly GW, Date NM, Veenendaal R, Newman KT, Smallwood RA. Decreased hepatic elimination of pyrimethamine during malaria infection. *Biochem Pharmacol.* 1987;36(17):2827-39.

Mileva M, Tancheva L, Bakalova R, Galabov A, Savov V, Ribarov S. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and liver monooxygenase activity in experimental influenza virus infection. *Toxicol Lett.* 2000;114(1-2):39-45.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002 Feb;415(7):673-76.

Monostory K, Hazai E, Vereczkey L. Inhibition of cytochrome P450 enzymes participating in p-nitrophenol hydroxylation by drugs known as CYP2E1 inhibitors. *Chem-Biol Interac.* 2004;147:331-40.

Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM, Van Leengoed LA, Vernooy HC, Verheijden JH, Van Miert AS. A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Vet Pharmacol Ther.* 1996 Oct;19(5):382-88.

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

Montero R, Serrano L, D'avila VM, Ito A, Plancarte A. Infection of rats with *Taenia taeniformis* metacestodes increases hepatic CYP450, induces the activity of CYP1A1, CYP2B1 and COH isoforms and increases the genotoxicity of the procarcinogens benzo[a]pyrene, cyclophosphamide and aflatoxin B(1). *Mutagenesis.* 2003;18(2):211-16.

Moochhala SM. Alteration of drug biotransformation by interferon and host defence mechanism. *Ann Acad Med Singapore.* 1991 Jan;20(1):13-8.

Moreau A, Vilarem MJ, Maurel P, Pascussi JM. Xenoreceptors CAR and PXR Activation and Consequences on Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis, and Inflammatory Response. *Mol Pharm.* 2008 Jan-Feb;5(1):35-41.

Morgan ET. Regulation of cytochromes P 450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev.* 1997;29(4):1129-88.

Morgan ET. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos.* 2001;29(3):207-11.

Mostafa MH, el-Bassiouni EA, el-Sewedy SM, Akhnouk S, Tawfic T, Abdel-Rafee A. Hepatic microsomal enzymes in *Schistosoma mansoni*-infected mice: I. Effect of duration of infection and lindane administration on dimethylnitrosamine demethylases. *Environ Res.* 1984;35(1):154-59.

Murdoch RT, Ghabrial H, Smallwood RA, Morgan DJ. Effects of malaria on phenol conjugation pathways in perfused rat liver. *Biochem Pharmacol.* 1992;43(6):1229-34.

Nahrevanian H, Dascombe MJ. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. *Paras Immunol.* 2001;23:491-501.

Nebert DW. Multiple forms of inducible drug-metabolizing enzymes: A reasonable mechanism by which any organism can cope with adversity. *Mol Cell Biochem.* 1979;27(1):27-46.

Nicholson TE, Renton KW. Role of cytokines in the lipopolysaccharide-evoked depression of cytochrome P450 in the brain and liver. *Biochem Pharmacol.* 2001;62(12):1709-17.

Novak RF, Woodcroft KJ. The alcohol-inducible form of cytochrome P450 (CYP2E1): role in toxicology and regulation of expression. *Arch Pharm Res.* 2000;23(4):267-82.

OECD, Mammalian Erythrocyte micronucleus Test. OECD guidelines for the testing of chemicals. 1997;July 21:474.

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

Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 1964;239:2379-85.

Ossola JO, Tomaro ML. Heme oxygenase induction by cadmium chloride: evidence for oxidative stress involvement. *Toxicology.* 1995 Dec 15;104(1-3):141-47.

Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S et al. Heme-oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature Medicine.* 2007;13:703-10.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 2003;333:19-39.

Piquette-Miller M, Jamali F. Effect of adjuvant arthritis on the disposition of acebutolol enantiomers in rats. *Agents Actions.* 1992 Nov;37(3-4):290-96.

Piquette-Miller M, Jamali F. Selective effect of adjuvant arthritis on the disposition of propranolol enantiomers in rats detected using a stereospecific HPLC assay. *Pharm Res.* 1993 Feb;10(2):294-99.

Pitarque M, Rodríguez-Antona C, Ingelman-Sundberg M. Transcriptional Regulation of the Human *CYP2A6* Gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:814-22.

Pukrittayakamee S, Looareesuwan S, Keeratithakul D, Davis TM, Teja-Isavadharm P, Nagachinta B et al. A study of the factors affecting the metabolic clearance of quinine in malaria. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997;52(6):487-93

Rahman I. Regulation of glutathione in inflammation and chronic lung diseases. *Mutat Res.* 2005 Nov 11;579(1-2):58-80.

Reinke LA, Moyer MJ. *p*-nitrophenol hydroxylation A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Disp.* 1985;13(5):548-52.

Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 1957 Jul;28(1):56-63.

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

Renton KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Therap.* 2001;92:147-63.

Renton FW. Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab.* 2004 Jun;5(3):235-43.

Renton KW, Mannering GJ. Depression of the hepatic cytochrome P-450 mono-oxygenase by administered tilorone (2,7-bis(2-(diethylamino)ethoxy)fluoren-9-one dihydrochloride). *Drug Metab Dispos.* 1976_a;4(3):223-31.

Renton KW, Mannering GJ. Depression system of hepatic cytochrome P-450 dependent monooxygenase systems with administered interferon inducing agents. *Biochem Biophys Res Comm.* 1976_b;73(2):343-48.

Renton KW, Nicholson TE. Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Aug;294(2):524-30.

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

Rhanasto M, Raunio H, Poso A, Juvonen RO. More potent inhibition of human CYP2A6 than mouse CYP2A5 enzyme activities by derivatives of phenylethylamine and benzaldehyde. *Xenobiotica.* 2003;33:529-39.

Richardson TA, Sherman M, Antonovic L, Kardar SS, Strobel HW, Kalman D, Morgan ET. Hepatic and renal cytochrome p450 gene regulation during *Citrobacter rodentium* infection in wild-type and toll-like receptor 4 mutant mice. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(3):354-56.

Rockich K, Blouin R. Effect of the acute phase response on the pharmacokinetics of chlorzoxazone and cytochrome P-450 2E1 in vitro activity in rats. *Drug Metab Dispos.* 1999 Sep;27(9):1074-77.

Ruzicka T, Goerz G, Vizethum W, Kratka J. Effects of intravenous and intracutaneous bacillus Calmette-Guérin application on the drug-metabolizing system of the liver. *Dermatol.* 1980;160(2):135-41.

Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2000 Jan 15;28(2):289-309.

Safe S. Molecular biology of the AR receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Let.* 2001;120:1-7.

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

Sakar D, Prukner-Radovic E, Crnic A, Pompe-Gotal J, Ragland WL, Mazija H. Marek disease vaccination, with turkey herpesvirus, and enrofloxacin modulate the activities of hepatic microsomal enzymes in broiler chickens. *Acta Vet Hung.* 2004;52(2):211-17.

Salonpaa P, Krause K, Pelkonen O, Raunio H 1995. Up-regulation of CYP2A5 expression by porphyrinogenic agents in mouse liver. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995 Apr;351(4):446-52.

Samaras SC, Dietz N. Physiopathology of detoxification of pentobarbital sodium (Nembutal). *Fed Proc.* 1953;12:122-23.

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 Feb;34(2):241-48.

Satarug S, Lang MA, Yongvanit P, Sithithaworn P, Mairiang E, Mairiang P et al. Induction of cytochrome P450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasite infection, *Opisthorchiasis viverrini*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(10):795-800.

Saxena N, Saxena A, Dutta GP, Ghatak S, Pandey VC. Effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection and chloroquine on the hepatic mixed function oxidase system of mice. *Mol Biochem Parasitol.* 1987;24(3):283-87.

Scandalios JG. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jul;38(7):995-1014.

Schmidt JV, Bradfield, CA. Ah receptor signalling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;2:55-89.

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

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

Sewer MB, Morgan ET. Down-regulation of the expression of three major rat liver cytochrome P450s by endotoxin *in vivo* occurs independently of nitric oxide production. *J Pharmacol Exp Therap.* 1998;287(1):352-58.

Shedlofsky SI, Israel BC, McClain CJ, Hill DB, Blouin RA. Endotoxin administration to humans inhibit hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest.* 1994; 94(6):2209-14.

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

Shedlofsky SI, Tosheva RT, Snawder JA. Depression of constitutive murine cytochromes P450 by staphylococcal enterotoxin B. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:1295-303.

Sheweita SA, Abu El-Maati MR, El-Shahat FG, Bazeed MA. Changes in the expression of cytochrome P4502E1 and the activity of carcinogen-metabolizing enzymes in *Schistosoma haematobium*-infected human bladder tissues. *Toxicol.* 2001 Apr 12;162(1):43-52.

Sheweita SA, Mubark J, Doenhofe MJ, Mostafa MH, Margison GP, O'Connor PJ, Elder RH. Changes in the expression of cytochrome P450 isozymes and related carcinogen metabolizing enzyme activities in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Helminthol.* 2002 Mar;76(1):71-8.

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

Singh AK, Tekwani BL, Guru PY, Rastogi AK, Pandey VC. Suppression of the hepatic microsomal cytochrome P-450 dependent mixed function oxidase activities in golden hamster during *Leishmania donovani* infection. *Pharmacol Res.* 1989;21(5):507-12.

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

Sobolewski P, Gramaglia I, Frangos JA, Intaglietta M, van der Heyde H. Plasmodium berghei resists killing by reactive oxygen species. Infect and Immun. 2005;73(10):6704-10.

Sohail M, Kaul A, Raziuddin M, Adak T. Decreased glutathione S-transferase activity: diagnostic and protective role in *vivax* malaria. Clin Biochem. 2007;40(5-6):377-82.

Sommerville AC, Bygrave FL, Behm CA. A study of hepatic mitochondrial respiration and microsomal cytochrome P450 content in mice infected with the liver fluke *Fasciola hepatica*. Int J Parasitol. 1995;25(6):667-72.

Song GH, Andre RG, Scheibel LW, Wirtz RA, Strickman DA, Cheriathundam E, Alvares AP. Plasmodium berghei: sensitivity of chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive strains to irradiation and the effect of irradiated malaria parasites on cytochrome P450-dependent monooxygenases. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1995 Oct; 90(1):75-86.

Srivastava P, Tripathi LM, Puri SK, Dutta GP, Pandey VC. Effect of *Plasmodium berghei* infection and chloroquine on the hepatic drug metabolizing system of mice. Int J Parasitol. 1991;21(4):463-66.

Srivastava P, Sharma SN, Shukla OP, Pandey, VC. Studies of the hepatic mitochondrial and microsomal mixed-function oxidase system during *Plasmodium yoelii* infection and inducer treatment in Swiss albino mice. Trop Med Int Health. 1997;2(10):989-92.

Srivastava P, Pandey VC. Studies on hepatic mitochondrial cytochrome P-450 during *Plasmodium yoelii* infection and pyrimethamine treatment in mice. Ecotoxicol Environ Saf. 2000;46(1):19-22.

Srivastava S, Alhomida AS, Siddiqi NJ, Pandey VC. Changes in rodent-erythrocyte methemoglobin reductase system produced by two malaria parasites, viz. *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Plasmodium berghei*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2001 Jul;129(4):725-31.

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.

Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(2):101-12.

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

Supanarond W, Davis TM, Pukrittayakamee S, Silamut K, Karbwang J, Molunto P et al. Disposition of oral quinine in acute falciparum malaria. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;40(1):49-52.

Swarup-Mitra S, Bhattacharya J, Mukherji A. Effect of malaria on erythrocytic reduced glutathione and activity of related enzymes. *Indian J Med Res*. 1982 Nov;76:668-73.

Taylor-Robinson AW, Smith EC. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunol Lett*. 1999;67:1-9.

Tekwani BL, Tripathi LM, Mukerjee S, Gupta S, Pandey VC, Katiyar JC, Ghatak S, Shukla OP. Hepatic microsomal cytochrome P450 system during experimental hookworm infection. *Exp Mol Pathol*. 1990;52(3):330-39.

Tian Y, Ke S, Denison MS, Rabson AB, Gallo MA. Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem*. 1999 Jan 1;274(1):510-15.

Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids*. 2007;72:231-46.

- Topfer F, Lenton LM, Bygrave FL, Behm CA. Importance of T-cell-dependent inflammatory reactions in the decline of microsomal cytochrome P450 concentration in the livers of rats infected with *Fasciola hepatica*. *Int J Parasitol*. 1995;25(10):1259-62.
- Trenholme GM, Willaims RL, Rieckman KH, Frisher H, Carson PE. Quinine disposition during malaria and during induced fever. *Clin Pharmacol Ther*. 1976 Apr;19:459-67.
- Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU. Inhibition by nitric oxide of cytochrome P450 activity contributes to endotoxin-induced hypotension in rats. *Nitric oxide*. 2006;14:51-57.
- Uhl K, Grace JM, Kocisko DA, Jennings BT, Michell AL, Brewer TG. Effects of *Plasmodium berghei* infection on cytochromes P-450 2E1 and 3A2. *Eur J Drug Metab Pharm*. 1999;24(2):169-76.
- Uno S, Kawase A, Tsuji A, Tanino T, Iwaki M. Decreased intestinal CYP3A and P-glycoprotein activities in rats with adjuvant arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2007 Aug;22(4):313-21.
- Van der Heyde HC, Gu Y, Zhang Q, Sun G, Grishan MB. Nitric oxide is neither necessary nor sufficient for resolution of *Plasmodium chabaudi* malaria in mice. *J Immunol*. 2000;165:3317-23.
- Wang J, Qiu ZY, Xie W, Wu YY. Effect of *Schistosoma japonicum* infection on liver drug-metabolism enzymes of mice. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 1993;11(1):9-11.
- Westerholt A, Himpel S, Hager-Gensch B, Maier S, Werner M, Stadler J et al. Intra-graft iNOS induction during human liver allograft rejection depresses cytochrome p450 activity. *Transpl Int*. 2004;17:370-78.
- White AC, Maloney EK, Boustani MR, Hassoun PM, Fanburg BL. Nitric oxide increases cellular glutathione levels in rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Oct;13(4):442-8.

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jonse CR, Eshenaur SC, Nims RW. Inhibition of cytochrome P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300(1):115-23.

Wood AW, Conney AH. Genetic variation in coumarin hydroxylase activity in the mouse (*Mus musculus*). *Science.* 1974;185:612-614.

Wooles WR e Borzelleca JF. Prolongation of barbiturate sleeping time in mice by stimulation of the reticuloendothelial system (RES). *J Reticuloendothel Soc.* 1966;3(1):41-7.

Wu R, Cui X, Dong W, Zhou M, Simms HH, Wang P. Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells via AhR pathway: The central role of proinflammatory cytokines. *Internat J Mol Med.* 2006;18:339-46.

Yokomori N, Nishio K, Aida K, Negishi M. Transcriptional regulation by HNF-4 of the steroid 15 α -hydroxylase P450 (Cyp2a-4) gene in mouse liver. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997 Jul;62(4):307-14.

Zhou C, Tabb MM, Nelson EL, Gran F, Verma S, Sadatrafiei A et al. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappa B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2280-89.

Zhu H, Li Y, Trush MA. Characterization of benzo[a]pyrene quinone-induced toxicity to primary cultured bone marrow stromal cells from DBA-2 mice: potential role of mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995 Jan;130(1):108-20.

ANEXO 1

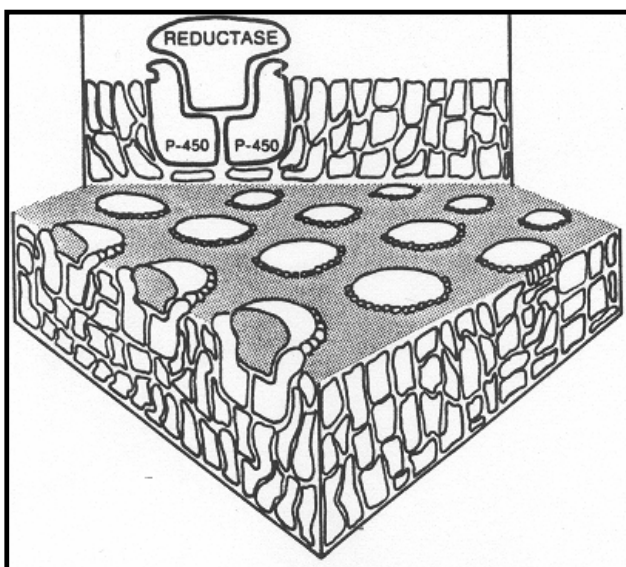
CITOCROMOS P450

As enzimas citocromo P450 (CYP) são proteínas que contêm um grupo prostético heme. Os CYP são particularmente abundantes na fração microsomal hepática, mas são encontradas em, virtualmente, todos os outros tecidos, incluindo os pulmões, o coração, o cérebro, as supra-renais, a pele e a placenta. Entre as enzimas da fase 1 do metabolismo, os CYP se destacam pela extraordinária versatilidade catalítica, desempenhando importante papel tanto na eliminação (desintoxicação) de inúmeros xenobióticos lipofílicos, como na conversão destes em metabólitos ativos, do ponto de vista farmacológico ou toxicológico. Neste cenário, os CYP são enzimas versáteis e até certo ponto redundantes, *i.e.*, não só uma mesma isoforma CYP aceita uma ampla gama de substratos estruturalmente diferentes, como, por outro lado, a conversão de uma molécula em determinado produto pode ser catalisada por diversas isoformas. Além de catalisarem a biotransformação de xenobióticos, os CYP também participam da biossíntese e degradação de substratos endógenos, como esteróides, colesterol e eicosanóides, como prostaciclina e tromboxano A₂.

Os citocromos P450 foram assim denominados por Omura e Sato (1964). O ferro do grupo heme do CYP está habitualmente no estado férrico (Fe^{3+}) e, quando reduzido ao estado ferroso (Fe^{2+}), é capaz de ligar tanto o O_2 quanto o CO. Omura e Sato (1964) observaram que, quando o ferro do grupo heme é reduzido pelo ditionito de sódio, e se liga ao CO, apresenta um pico máximo de absorção da luz a 450 nm, derivando desta propriedade, a denominação de citocromo P450 (todas as outras hemoproteínas quando ligadas ao CO exibem absorção máxima da luz a aproximadamente 420 nm). A absorção máxima a 450 nm resulta da ligação do ferro da porção heme da proteína ao ânion tiolato (S-) - 5º ligante - presente na cisteína (tiolato-cisteína) conservada no centro ativo da apoproteína. Os outros quatro locais de ligação ao ferro correspondem a átomos de nitrogênio presentes no grupo heme. Em procariotos, os CYPs estão livres, mas nas células eucarióticas eles estão ligados à membrana do retículo endoplasmático ou nas mitocôndrias. Com a homogeneização do tecido e o consequente rompimento da estrutura celular, as membranas do retículo endoplasmático contendo os CYP formam micro-esferas ou vesículas, chamadas microsomas, que ficam em suspensão no homogeneizado tissular. Portanto, esta fração subcelular que contém as enzimas CYP é denominada fração microsomal.

Os CYP catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise e são também chamadas de oxidases de função mista, porque durante a catálise, incorporam um átomo de oxigênio molecular ao substrato e outro à água. A fonte de elétrons necessária para a função catalítica é uma enzima microsomal associada ao CYP, a NADPH citocromo P450 redutase.

A superfamília de proteínas CYP é agrupada em famílias, que reúnem as isoformas que têm similaridade maior que 40% na seqüência de aminoácidos. As isoformas com similaridade que excede 55%, por sua vez, constituem uma subfamília. As famílias são identificadas por um número arábico (CYP 1, 2, 3..), e as subfamílias por uma letra maiúscula após o número indicativo da família gênica (CYP1A, 1B, 2A, 2B, 2E, 2C, 3A....). As isoformas individuais, portanto, são identificadas por um número arábico, seguido por uma letra maiúscula (subfamília) e um outro número arábico, *e.g.*, CYP1A1 é a isoforma 1 da subfamília 1A, CYP1A2, a isoforma 2 da subfamília 1A, e assim por diante.



À esquerda: Isoformas CYP e NADPH redutase na membrana do retículo endoplasmático. À direita: grupo heme e apoproteína citocromo P450.

Fontes sugeridas para consulta:

Ioannides C, Lewis DFV. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem.* 2004;4:1767-88.

<http://drnelson.utmem.edu/P450lect.htm>. Cytochrome P450s in humans Cytochrome P450s in humans Wed. Feb. 7, 2007 11 AM

ANEXO 2
TABELAS

Tabela 4.1 – Evolução temporal das taxas de parasitemia (média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10^6 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

DI	Taxa de Parasitemia(% HP)	N
4	6,78±1,08	10
8	12,50±1,25	10
12	16,80±1,80	10
16	26,03±2,57	11
20	40,19±4,86	14

Tabela 4.2 – Pesos do fígado e baço (média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10^6 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Fígado (g)	Baço (g)	N
0	0,99±0,02	0,08±0,04	15
4	0,87±0,06	0,11±0,009	10
8	1,22±0,08	0,24±0,02	10
12	1,16±0,04	0,31±0,03	9
16	1,66±0,07	0,7±0,03	11
20	1,58±0,08	0,72±0,05	14

Tabela 4.3 – Evolução temporal das concentrações de nitrito (média±EPM) no soro de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectadas com *P. berghei* (10^6 HP/animal i.p.) ou tratadas com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção N= número de animais

DI	Nitrito (μ M)	N
0	35,37±2,76	9
4	35,86±3,02	10
8	33,65±2,97	10
12	33,78±4,34	10
16	29,78±1,72	11
20	39,31±5,56	14
LPS	147,26±15,29	9

Tabela 4.4 – Evolução temporal da atividade de EROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratados com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

EROD		
DI	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	94,73±40,98	15
4	115±41,04	10
8	79,21±24,11	10
12	93,81±26,74	9
16	72,21±22,67	11
20	64,56±12,84	14
LPS	58,28±25,04	12

Tabela 4.5 – Evolução temporal da atividade de BROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratados com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

BROD		
DI	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	74,62±21,17	14
4	60,4±17,59	10
8	52,73±10	10
12	52,01±17,58	9
16	44,14±21,84	11
20	33,33±11,42	14
LPS	44,03±9,00	12

Tabela 4.6 – Evolução temporal da atividade de COH (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratados com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

COH		
DI	(pmoles umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	193,86±27,01	13
4	170,48±16,92	9
8	181,76±37,82	6
12	245,11±58,42	7
16	366,28±31,98	8
20	384,7±37,97	14
LPS	112,34±20,78	11

Tabela 4.7 – Evolução temporal das taxas de parasitemia (média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

DI	Taxa de Parasitemia (%HP)	N
2	9,25±1,0	7
4	5,5±0,47	7
6	9,38±2,56	7
8	14,11±1,27	7
10	13,92±6,4	3

Tabela 4.8 – Pesos do fígado e baço (média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Fígado (g)	Baço (g)	N
0	0,99±0,05	0,09±0,006	5
2	1,01±0,03	0,1±0,007	7
4	0,94±0,03	0,1±0,005	7
6	1,00±0,04	0,13±0,005	7
8	1,15±0,04	0,17±0,007	7
10	1,05±0,07	0,14±0,03	3

Tabela 4.9 – Evolução temporal das concentrações de nitrito (média±EPM) no soro de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectadas com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratadas com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção N= número de animais

DI	Nitrito (µM)	N
0	37,95±2,4	4
2	51,95±6,93	7
4	46,63±5,21	7
6	40,08±3,91	7
8	45,39±4,43	7
10	37,03±6,75	3
LPS	233,75±10,55	6

Tabela 4.10 – Evolução temporal da atividade de EROD (média±EPM) em microsomas hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratados com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

DI	EROD	
	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	103,14±33,49	5
2	129,99±52,49	7
4	136,19±57,01	7
6	122,03±22,87	7
8	76,11±15,25	7
10	139,85±53,27	3
LPS	146,6±14,87	7

Tabela 4.11 – Evolução temporal da atividade de BROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratados com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

BROD		
DI	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	87,29±12,3	5
2	115,58±36,73	7
4	117,94±26,65	7
6	104,6±32,01	7
8	73,44±28,33	8
10	126,02±29,54	3
LPS	113,18±8,93	7

Tabela 4.12 – Evolução temporal da atividade de COH (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. berghei* (10⁶HP/animal i.p.) ou tratados com LPS (5 mg/kg i.p.) seis horas antes da determinação.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

COH		
DI	(pmoles umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	9,81±2,48	4
2	18,68±5,77	3
4	17,53±4,73	4
6	20,4±2,44	5
8	32,03±8,07	6
10	29,24±13,93	3
LPS	8,63±1,51	6

Tabela 4.13 – Evolução temporal das taxas de parasitemia (média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.). Experimento preliminar.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Taxa de Parasitemia (% HP)	N
1	2,9±0,52	5
2	4,8±0,98	5
3	10,5±1,66	5
4	27,9±1,97	4
5	38,4±2,63	5
6	27±1,71	5
7	21,3±2,39	4
9	5,3±0,31	5
10	4,8±0,38	5
11	4,8±0,45	4
12	4,1±0,4	4
14	3,3±0,46	5
16	2±0,26	4
19	0,66±0,1	3
22	0,6±0,1	4
24	0,8±0,14	5
31	0,007±0,005	4

Tabela 4.14 – Evolução temporal das taxas de parasitemia (média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Taxa de Parasitemia (% HP)	N
2	4,29±0,56	14
5	50,19±1,68	10
6	15,2±0,59	6
10	5,0±0,25	6
14	6,97±1,4	6
19	1,27±0,17	8

Tabela 4.15 – Pesos do fígado e baço (média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Fígado (g)	Baço (g)	N
0	0,84±0,02	0,07±0,003	50
2	0,88±0,04	0,08±0,004	14
5	0,95±0,03	0,22±0,02	10
6	0,76±0,03	0,16±0,01	6
10	0,89±0,04	0,37±0,06	6
14	1,35±0,06	0,55±0,04	6
19	1,17±0,06	0,81±0,05	8

Tabela 4.16 – Evolução temporal das concentrações de nitrito (média±EPM) no soro de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectadas com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção N= número de animais

DI	Nitrito (μ M)	N
0	51,12±2,36	34
2	55,30±4,2	12
5	68,65±6,56	10
6	48,43±5,83	6
10	38,64±4,82	5
14	39,91±2,91	6
19	47,32±2,55	8

Tabela 4.17 – Evolução temporal da atividade de EROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

EROD		
DI	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	182,42±5,76	50
2	140,58±8,82	14
5	141,28±9,72	10
6	102,08±3,34	6
10	193±8,71	6
14	164,49±8,12	6
19	192,41±11,71	8

Tabela 4.18 – Evolução temporal da atividade de BROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

BROD		
DI	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	121,24±6	51
2	130,53±16,89	14
5	77,95±4,17	10
6	116,18±20,42	6
10	118,18±17,48	6
14	77,11±4,75	6
19	103,44±7,65	8

Tabela 4.19 – Evolução temporal da atividade de COH (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

DI	COH	
	(pmoles umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	16,49±1,17	49
2	15,29±2,71	14
5	19,14±2,33	10
6	18,27±2,07	6
10	11,04±2,17	6
14	19,89±1,77	6
19	19,27±1,78	8

Tabela 4.20 – Evolução temporal das taxas de parasitemia (média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.). Experimento preliminar.

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Taxa de Parasitemia (% HP)	N
1	1,8±0,14	5
2	4,3±0,27	5
3	9,5±0,49	5
4	24,1±1,91	5
5	36,6±1,05	5
6	26,3±2,34	5
7	13,1±2,97	5
8	4,7±0,5	5
9	3,3±0,32	5
10	2,1±0,13	5
11	2,8±0,68	5
12	3,3±0,62	5
13	5,6±0,81	5
14	10,0±3,56	5
15	8,9±2,62	5
17	4,4±1,25	5
18	2,1±0,66	5

Tabela 4.21 – Evolução temporal das taxas de parasitemia (média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Taxa de Parasitemia (% HP)	N
2	2,7±0,5	8
5	38,7±1,44	8
6	21,4±1,6	8
10	2,0±0,35	8
14	20,6±4,81	8
19	0,8±0,08	8

Tabela 4.22 – Pesos do fígado e baço (média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais

DI	Fígado (g)	Baço (g)	N
0	1,08±0,01	0,11±0,005	47
2	1,16±0,03	0,12±0,007	8
5	1,16±0,04	0,35±0,013	8
6	1,19±0,03	0,43±0,028	8
10	1,3±0,09	0,66±0,054	8
14	1,45±0,02	0,68±0,053	8
19	1,54±0,06	0,63±0,058	8

Tabela 4.23 – Evolução temporal das concentrações de nitrito (média±EPM) no soro de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectadas com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção N= número de animais

DI	Nitrito (μ M)	N
0	42,25±1,7	44
2	27,71±6,42	8
5	53,73±10,64	8
6	65,41±6,39	8
10	52,31±7,86	8
14	46,68±6,03	8
19	36,16±1,64	7

Tabela 4.24 – Evolução temporal da atividade de EROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

DI	EROD	
	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	130,79±6,7	48
2	113,28±18,77	8
5	111,44±8,07	8
6	132,76±24,17	8
10	158,65±26,21	8
14	108,9±13,61	8
19	108,3±9,86	8

Tabela 4.25 – Evolução temporal da atividade de BROD (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

BROD		
DI	(pmoles resorufina/mg ptn/min)	N
0	73,7±3,1	47
2	69,1±3,98	8
5	61,05±2,84	8
6	69,4±5,1	8
10	90,95±14,17	8
14	65,81±3,76	8
19	60,06±3,78	8

Tabela 4.26 – Evolução temporal da atividade de COH (média±EPM) em microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) infectados com *P. chabaudi chabaudi* (2×10^7 HP/animal i.p.).

DI = dias pós-infecção; N= número de animais.

COH		
DI	(pmoles umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	149,43±8	46
2	158,89±17,95	8
5	273,58±30,30	8
6	184,78±21,14	8
10	205,77±33,89	8
14	187,91±25,22	8
19	175,56±15,84	8

Tabela 4.27 – Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS de *E. coli* nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos seis horas após a injeção i.p.

N = número de animais

LPS (mg/kg)	Nitrito (µM)	N
0	28,31±4,10	7
2	117,1±42,1	5
5	137,02±14,16	11
20	193,04±42,95	7

Tabela 4.28 – Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos seis horas após a injeção i.p.
N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	76,63±4,72	15
2	45,38±3,38	7
5	55,7±4,43	15
20	49,82±6,30	7

Tabela 4.29 – Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos seis horas após a injeção i.p.
N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	71,61±4,07	18
2	51,72±3,67	7
5	52,59±3,89	18
20	57,77±5,97	7

Tabela 4.30 – Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos seis horas após a injeção i.p.
N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	216,72±23,8	20
2	75,89±13,47	7
5	174,66±26,8	7
20	155,49±25,97	7

Tabela 4.31 – Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

N = número de animais

LPS (mg/kg)	Nitrito (µM)	N
0	25,27±2,53	7
2	131,15±49,16	7
5	282,87±32,72	7
20	270,61±25,96	7

Tabela 4.32 – Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

N = número de animais

LPS (mg/kg)	Atividade	
	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	76,63±4,72	15
2	54,37±2,85	7
5	46,31±2,56	7
20	45,31±4,44	7

Tabela 4.33 – Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

N = número de animais

LPS (mg/kg)	Atividade	
	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	71,61±4,07	18
2	54,24±1,59	7
5	47,3±3,47	7
20	48,75±5,05	7

Tabela 4.34 – Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	216,72±23,8	20
2	168,88±21,26	7
5	183,66±21,27	7
20	182,07±24,83	7

Tabela 4.35 – Concentração de nitrito (média ±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

LPS (mg/kg)	Nitrito (µM)	N
0	29,52±3,53	7
2	22,95±2,39	7
5	99,3±48,89	7
20	188,35±55,76	7

Tabela 4.36 – Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	76,63±4,72	15
2	35,93±1,58	6
5	39,78±1,55	7
20	39,32±2,16	7

Tabela 4.37 – Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	71,61±4,07	18
2	59,08±5,2	6
5	49,67±2,68	7
20	50,29±2,65	7

Tabela 4.38 – Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 2, 5 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	216,72±23,8	20
2	68,91±12,54	5
5	156,2±58,12	7
20	250,98±41,3	7

Tabela 4.39 – Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS nas doses de 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.
N = número de animais

LPS (mg/kg)	Nitrito (µM)	N
0	27,39±2,21	12
0,05	28,95±3,92	6
0,1	30,92±3,5	6
0,2	31,09±4,23	6
0,5	33,34±4,33	6
1	33,78±3,97	6
2	22,5±2,39	7
5	100,04±49,37	7
10	153,95±43,66	6
20	297,01±41,07	4

Tabela 4.40 - Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS de *E. coli* nas doses de 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

LPS (mg/kg)	Atividade	
	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	89,8±7,22	20
0,05	114,32±6,12	6
0,1	90,67±6,50	6
0,2	107,34±2,37	6
0,5	103,81±6,85	6
1	88,34±19,29	7
2	35,93±1,58	6
5	39,78±1,55	7
10	89,46±4,38	7
20	39,32±2,17	7

Tabela 4.41 - Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	73,67±3,66	23
0,05	86,15±5,16	6
0,1	77,48±12,73	6
0,2	94,91±6,91	5
0,5	79,76±11,00	6
1	75,55±10,09	6
2	58,56±4,42	7
5	46,46±2,29	7
10	56,22±2,98	7
20	50,29±2,65	7

Tabela 4.42 - Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 mg/kg. Os animais foram mortos vinte e quatro horas após a injeção i.p.

N = número de animais

Atividade		
LPS (mg/kg)	(pmol umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	201,44±21,02	24
0,05	76,46±14,35	6
0,1	48,98±9,99	6
0,2	66,57±5,60	6
0,5	53,57±16,05	6
1,0	35,27±9,22	6
2	68,91±12,54	5
5	156,19±58,12	7
10	128,65±25,16	7
20	250,98±41,30	7

Tabela 4.43 – Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS 5 mg/kg, aminoguanidina 50 e 100 mg/kg e aminoguanidina e LPS. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

a=aminoguanidina; aL=aminoguanidina+LPS

N = número de animais

mg/kg	Nitrito (μM)	N
0	38,85±2,73	23
a50	229,84±12,72	14
a100	28,07±2,59	6
LPS	29±6,66	5
aL50	36,34±4,91	6
aL100	88,22±8,89	6

Tabela 4.44 - Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS 5 mg/kg, aminoguanidina 50 e 100 mg/kg e aminoguanidina e LPS. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

a=aminoguanidina; aL=aminoguanidina+LPS

N = número de animais

mg/kg	Atividade (pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	160,15±9,54	22
a50	92,45±15,04	5
a100	90,21±4,98	6
LPS	95,15±12,02	10
aL50	113,12±5,23	5
aL100	95,72±7,36	5

Tabela 4.45 - Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS 5 mg/kg, aminoguanidina 50 e 100 mg/kg e aminoguanidina e LPS. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

a=aminoguanidina; aL=aminoguanidina+LPS

N = número de animais

Atividade		
mg/kg	(pmol resorufina/mg ptn/min)	N
0	69,98±3,01	22
a50	68,73±6,23	6
a100	46,34±3,56	6
LPS	49,88±3,28	11
aL50	63,93±2,56	6
aL100	44,78±2,95	5

Tabela 4.46 - Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos hepáticos de camundongos DBA-2 tratados com LPS 5 mg/kg, aminoguanidina 50 e 100 mg/kg e aminoguanidina e LPS. Os animais foram mortos doze horas após a injeção i.p.

a=aminoguanidina; aL=aminoguanidina+LPS

N = número de animais

Atividade		
mg/kg	(pmol umbeliferona/mg ptn/min)	N
0	187,79±15,97	22
a50	163,2±18,17	6
a100	199,78±23,45	6
LPS	190,88±23,8	11
aL50	316,4±44,66	6
aL100	309,26±26,66	5

ANEXO 3
TRABALHOS PUBLICADOS

Plasmodium berghei (ANKA): Infection induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the mouse liver

Ana C.A.X. De-Oliveira*, Anndressa C. Da-Matta, Francisco J.R. Paumgarten

Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Biological Sciences, National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 21 November 2005; received in revised form 26 January 2006; accepted 28 January 2006
Available online 15 March 2006

Abstract

It has been reported that malaria infection impairs hepatic drug clearance and causes a down-regulation of CYP-mediated monooxygenase activities in rodents and humans. In the present study, we investigated the effects of *Plasmodium berghei* infection on the activity of liver monooxygenases in female DBA/2 and C57BL/6 mice. In both mouse strains, *P. berghei* infection decreased activities mediated by CYP1A (EROD: DBA/2 65.3%, C57BL/6 44.7%) and 2B (BROD: DBA/2 64.3%, C57BL/6 49.8%) subfamily isoforms and increased activities mediated by 2A5 (COH: DBA/2 182.4%, C57BL/6 148.5%) and 2E1 (PNPH: DBA/2 177.8%, C57BL/6 128.5%) isoforms as compared to non-infected controls. Since malaria infection also produced an increase in ALT (273.1%) and AST (354.1%) activities in the blood serum, our findings are consistent with the view that CYP2A5 activity is induced by liver injury. An almost generalized depression of CYP-mediated activities has been found with numerous infections and inflammatory stimuli but an induction of CYP2A5 had been previously noted only in some viral hepatitis and trematode (liver fluke) infections.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Index Descriptors and Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BROD, benzyloxy-resorufin-*O*-debenzylase; COH, coumarin-7-hydroxylase; CYP, cytochrome P450; EROD, ethoxyresorufin-*O*-deethylase; LPS, lipopolysaccharide; Monooxygenases; NO, nitric oxide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MAL, malaria-infected mice; CON, non-infected control mice; PNPH, *p*-nitrophenol-hydroxylase; Pharmacokinetics; *Plasmodium berghei* (ANKA); Xenobiotic metabolism; SEM, standard error of the mean

1. Introduction

Several clinical and experimental studies have demonstrated that malaria infection down-modulates the expression and activity of CYPs thereby decreasing the hepatic metabolism of drugs and other xenobiotic compounds in humans and rodents. In 1970, McCarthy and coworkers reported that infection of rats with *Plasmodium berghei* increased hexobarbital sleeping time and reduced hepatic metabolism of ethylmorphine, aniline and *p*-nitroanisole. Further studies found that infection with *P. berghei*

decreased total-CYP content and monooxygenase activities in rat liver microsomes (Kokwaro et al., 1993; Uhl et al., 1999) as well as the clearance of xenobiotics such as artheether (Leo et al., 1997), ethoxyresorufin (Glazier et al., 1994), antipyrine (Mansor et al., 1991a), paracetamol (Mansor et al., 1991b), and phenacetin (Kokwaro et al., 1993). Malaria infection was found to reduce total-CYP content and monooxygenase activities in mouse liver as well (Alvares et al., 1984; Srivastava and Pandey, 2000; Srivastava et al., 1991, 1997).

Data from clinical pharmacokinetic studies have also been consistent with the hypothesis that malaria infection depresses CYP-mediated drug metabolism. It was reported, for instance, that clearances of quinine, antipyrine and caffeine were reduced in patients with acute *Plasmodium falciparum* malaria (Akinyinka et al., 2000; Pukrittayakamee et al., 1997).

* Corresponding author. Present address: Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública - FIOCRUZ, Av Brasil 4036, Prédio de Expansão do Campus, Rio de Janeiro, RJ 21040-361, Brazil. Fax: +55 21 22704427.

E-mail address: ana.oliveira@ensp.fiocruz.br (A.C.A.X. De-Oliveira).

Contrasting to the foregoing findings suggesting that malaria causes a generalized depression of liver CYP activities, Uhl et al. (1999) reported that CYP2E1 activity remains unaltered in liver microsomes of *P. berghei*-infected rats. As far as the authors are aware, however, there has been no report of induction of liver monooxygenases by malaria infection so far.

In the present study, we investigated the effects of *P. berghei* infection on mouse liver monooxygenase activities mediated by CYP2A5 (COH) and 2E1 (PNPH) as well as by isoforms belonging to subfamilies CYP1A (EROD) and 2B (BROD). CYP1A1/2 and 2E1 are involved in the metabolic activation of a number of xenobiotic compounds including many chemical carcinogens (Ioannides and Lewis, 2004). Isoenzymes belonging to CYP2B subfamily also take part in the activation of toxicants as well as in the metabolic clearance of artemisinin, an important antimalarial drug (Simonsson et al., 2003). It is of note that CYP2A5, a murine isoform orthologous to human CYP2A6, plays an essential role in the activation of various hepatotoxins and carcinogens, including nitrosamines, and apparently has a unique mechanism of regulation (Gilmore et al., 2003). Contrasting to most CYP isoforms, CYP2A5 is induced in some infectious diseases such as viral hepatitis and liver fluke infection (Kirby et al., 1994a,b).

2. Material and methods

2.1. Animals

Female C57BL/6 and DBA/2 mice, 7–10 weeks old, from the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) breeding stock were used. The animals were housed in standard plastic cages with stainless steel coverlids and wood shavings as bedding. Room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), air relative humidity (approx. 70%) and light/dark cycle (lights on from 8:00 am to 8:00 pm) were controlled in the animal facilities. Filtered tap water and a commercial diet for rats and mice (Nuvital CR1, Nuvilab[®], Curitiba, PR, Brazil) were provided ad libitum. The experiments were conducted in accordance with Brazilian animal protection and welfare laws and the protocol was submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals of Oswaldo Cruz Foundation.

2.2. Parasite and infection

Experimental animals were injected by the i.p. route with 0.2 ml of PBS-diluted blood (5×10^6 parasitized red blood cells per milliliter) from a donor mouse that had been previously infected with *P. berghei* (ANKA). The donor mouse was inoculated with a stablate kept at -80°C in Alsever's solution. For each malaria-inoculated mouse, an age-paired non-infected control animal was injected with 0.2 ml of PBS solution. After infection, mice were daily examined for clinical signs of illness and, every other day, a small drop of blood was taken from the tail tip for determination of the level of parasitemia. The percentage of parasitized red

blood cells (parasitemia) was determined by microscopic examination of thin blood smears stained by the Romanowsky's method (Panóptico Rápido, Laborclin[®], Pinhais, PR, Brazil). Infected mice (MAL) and their age-paired non-infected controls (CON) were killed by cervical dislocation during the second or third week after infection when parasitemia rose to levels equal to or higher than 20%.

2.3. Preparation of liver microsomal fraction

After death, livers were removed as quickly as possible, freed from fat and extra tissue, weighed and frozen at -80°C until further use. Hepatic microsomes were prepared essentially as described by De-Oliveira et al. (1999) except by the use of Tris (100 mM)–KCl (150 mM) buffer (pH 7.4) instead of saccharose solution. Microsomal protein concentration was measured by using Bradford's reagent and bovine serum albumin as standard (Sigma Chemical Co, USA).

2.4. Enzyme assays

Activities of alkoxyresorufin-*O*-dealkylases were determined using benzyloxy-(BROD) and ethoxyresorufin (EROD) as substrates. Enzyme activities were determined in multiwell plates as described by Kennedy and Jones (1994), except for the use of a NADPH regenerating system as previously reported by De-Oliveira et al. (1999). Substrate concentration was $5 \mu\text{M}$ and 0.025 mg of microsomal protein was added to each well. After a 10-min incubation at 37°C , $100 \mu\text{L}$ of acetonitrile was added to each well and the amount of resorufin was measured by using a fluorescence plate reader (Spectramax Gemini XS[®], Molecular Devices Co, USA) with excitation and emission wavelengths set at 530 and 590 nm, respectively. Under the present assay conditions, reaction was previously found to be linear for at least 15 min.

COH activity was assayed as reported by Rhanasto et al. (2003) with a few adaptations. Coumarin ($10 \mu\text{M}$), Tris buffer, pH 7.4 (50 mM), microsomal protein (0.08 mg) were added to each well (final volume of 0.1 ml) and incubated at 37°C with shaking for 10 min. Reaction was stopped with $60 \mu\text{L}$ of trichloroacetic acid and $140 \mu\text{L}$ of a 1.6 M glycine-NaOH (pH 10.4) solution was added to each well before measuring the amount of umbelliferone (7-hydroxycoumarin) by using a fluorescence plate reader with excitation wavelength set at 355 nm and emission at 460 nm. Under these conditions, reaction was found to be linear for more than 15 min.

PNPH activity in the mouse liver microsomal fraction was determined by the real-time kinetic method described in details by Allis and Robinson (1994). Substrate (*p*-nitrophenol) concentration was 0.1 mM and 0.2 mg of microsomal protein was added to each cuvette where reaction took place.

Serum ALT and AST activities were determined by a colorimetric method using a commercially available kit

(Bioclin®, Belo Horizonte, MG, Brazil) and a microplate spectrophotometer reader (Spectramax Plus®, Molecular Devices Co, USA). Activities of AST and ALT were expressed as international units per liter (UI/L).

2.5. Statistical analysis

Comparisons between infected and control groups were made by the two-tailed Student's *t* test and a difference was considered as statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

DBA/2 and C57BL/6 mice inoculated with 10^6 *P. berghei*-parasitized red blood cells consistently achieved high rates of parasitemia between days 12–20 (DBA/2) and 9–21 (C57BL/6) after inoculation when the animals were killed for preparation of liver microsomal fraction. The marked rise in parasitemia rate after postinoculation day 9 was accompanied by clinical signs such as weight loss, hypoactivity, piloerection, and tachypnea. As shown in Table 1, on the day of sacrifice, infected mice from both strains exhibited a body weight gain deficit, a slightly enlarged and dark liver and a markedly enlarged spleen.

Figs. 1 and 2 show the activities of liver monooxygenases in DBA/2 and C57BL/6 mice with parasitemia rates higher than 20% and those activities in their non-infected controls. EROD activity, a marker for CYP1A1/2 (Kennedy and Jones, 1994), and BROD activity, a marker for CYP2B subfamily isoenzymes (Nerurkar et al., 1993), were both markedly reduced by malaria infection in C57BL/6 (picomoles of resorufin per milligram of protein per minute, MAL versus CON, mean \pm SEM, EROD 52.9 ± 4.3 versus 118.2 ± 7.8 , $P < 0.05$; BROD: 42.5 ± 5.2 versus 85.2 ± 11.0 , $P < 0.05$) and DBA/2 (EROD: 60.3 ± 4.6 versus 92.3 ± 11.8 , $P < 0.05$; BROD: 51.8 ± 4.8 versus 80.5 ± 7.3 , $P < 0.05$) female mice (Figs. 1A and B). The foregoing reductions of CYP1A and 2B mediated activities are consistent with previous reports that malaria infection causes a down-regulation of liver CYPs in rodents. Activity of PNPB in infected mice, however, was 1.3 (C57BL/6) to 1.8 (DBA/2) times higher than the activity in non-infected controls (nanomoles of 4-nitro-

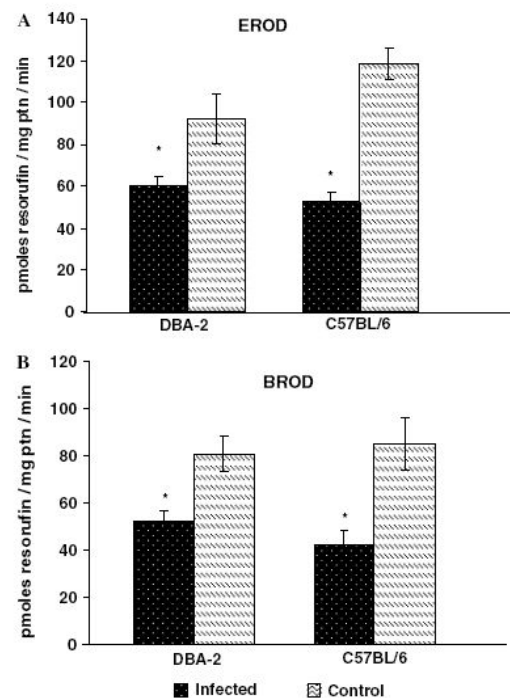


Fig. 1. Effects of *P. berghei* infection on the activities (picomoles of resorufin per milligram of protein per minute) of EROD (A) and BROD (B) in liver microsomes from female DBA/2 and C57BL/6 mice. Infected mice were killed when they achieved parasitemia rates $>20\%$. Control mice were age-paired non-infected mice of the same strain and sex. Columns show means (\pm SEM) of 18 or 19 mice. An asterisk (*) indicates that infected group differs from the respective non-infected control (Student's *t* test, $P < 0.05$).

catechol per milligram of protein per minute, MAL versus CON, mean \pm SEM, C57BL/6: 2.39 ± 0.17 versus 1.86 ± 0.11 , $P < 0.05$; DBA/2: 2.56 ± 0.15 versus 1.44 ± 0.07 , $P < 0.05$) (Fig. 2). Since it has been demonstrated that PNPB activity in the mouse liver is mediated by CYP2E1 (Allis and Robinson, 1994), our results indicated that this

Table 1

Body weight gain, liver, and spleen weights and parasitemia rates on the day of sacrifice of female DBA/2 and C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* (ANKA)

Mouse strain:	DBA/2		C57BL/6	
	Infected	Control	Infected	Control
Number of mice	19	19	18	18
Body wt gain (g) ^a	$-2.91 \pm 1.73^*$	0.80 ± 1.74	$-3.4 \pm 0.79^*$	0.97 ± 1.30
Liver wt (g)	$1.31 \pm 0.19^*$	0.97 ± 0.20	$1.12 \pm 0.42^*$	0.86 ± 0.15
Spleen wt (g)	$0.57 \pm 0.21^*$	0.09 ± 0.04	$0.27 \pm 0.19^*$	0.07 ± 0.02
Parasitemia (%)	46 (33–68)	0	28 (20–68)	0
Postinoculation day of sacrifice	18 (12–20)		12 (9–21)	

Mice were inoculated with 10^6 *P. berghei*-parasitized red blood cells on postinoculation day 0. Data are shown as means \pm SD for body wt gain and organ weights, or median (range) for parasitemia rate and postinoculation day of sacrifice.

^a Body wt on the day of sacrifice minus body wt on the day of inoculation.

* Different (Student's *t* test, $P < 0.05$) from non-infected controls.

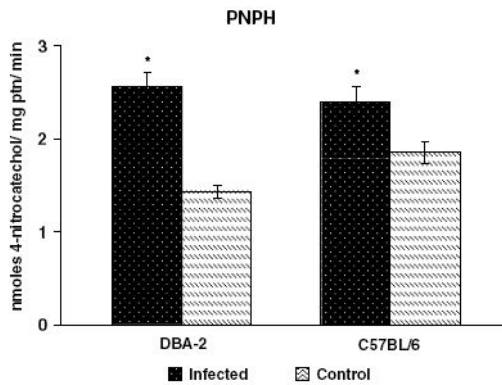


Fig. 2. Effects of *P. berghei* infection on the activity of PNPH (nanomoles of 4-nitrocatechol per milligram of protein per minute) in liver microsomes from female DBA/2 and C57BL/6 mice. Infected mice were killed when they achieved parasitemia rates >20%. Control mice were age-paired non-infected mice of the same strain and sex. Columns show means (\pm SEM) of 18 or 19 mice. An asterisk (*) indicates that infected group differs from the respective non-infected control (Student's *t* test, $P < 0.05$).

isoform was induced by *P. berghei* infection. It is noteworthy that Uhl et al. (1999) also noted that response of CYP2E1 to malaria infection was different from that of other CYP isoforms. These authors reported that, in rat liver microsomes, while total-CYP content and testosterone 6- β -hydroxylase activity (a CYP3A2-mediated reaction) were both reduced, activity of chlorzoxazone 4-hydroxylase, a CYP2E1-mediated reaction, remained unaffected after *P. berghei* infection. Fig. 3 shows that malaria infection also induced COH activity, a reaction catalysed by CYP2A5 (Kirby et al., 1994b). The expression and activity of CYP2A5 exhibit a marked variability among mouse strains. Although being expressed by DBA/2 and C57BL/6

mice, expression of CYP2A5 in the former strain is higher than in the latter strain (Wood and Conney, 1974). Activity of COH in the hepatic microsomal fraction, therefore, was much higher in non-infected DBA/2 mice (93.2 pmol of umbelliferone per milligram of protein per minute) than that in non-infected C57BL/6 mice (7.94 pmol of umbelliferone per milligram of protein per minute). Despite this difference in constitutive levels of CYP2A5, infection with *P. berghei* elevated by 1.5 (C57BL/6) to 1.8 (DBA/2) times the activity of COH in both strains (picomoles umbelliferone per milligram of protein per minute, MAL versus CON, mean \pm SEM, C57BL/6: 11.8 ± 1.6 versus 7.9 ± 0.7 , $P < 0.05$; DBA/2: 170.0 ± 19.8 versus 93.2 ± 10.4 , $P < 0.05$) (Fig. 3).

Results from the present study, therefore, indicated that malaria infection induces CYP2A5 and 2E1 in the mouse liver while down-regulates other CYP isoforms, including those belonging to CYP1A and 2B subfamilies. A possible isoenzyme-selective effect of malaria infection had been suggested by two previous studies in rats infected with *P. berghei*. Glazier et al. (1994) described that metoprolol clearance (CYP2D1-mediated) was unchanged while ethoxyresorufin clearance (CYP1A2 mediated) was clearly reduced during infection. Along the same line, Uhl et al. (1999) found that CYP2E1 activity was relatively unaltered while total-CYP content and CYP3A2 activity were depressed in *P. berghei*-infected rats. It is of note that immunostimulation by treatment either with LPS or with a particulate irritant induced CYP2E1 activity in the rat kidney (Sewer et al., 1997). As far as we are aware, however, induction of hepatic CYP isoforms during rodent malaria had not been observed before.

The mechanism(s) by which malaria induces CYP2A5 and 2E1 and depresses other isoforms is (are) far from being entirely understood. Alterations in xenobiotic metabolism and CYP activities have been reported in a variety of infections as well as after treatment with some vaccines and

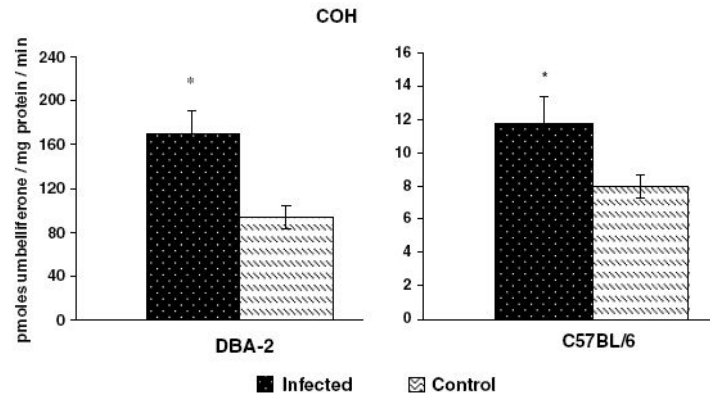


Fig. 3. Effects of *P. berghei* infection on the activities (picomoles of umbelliferone per milligram of protein per minute) of COH in liver microsomes from female DBA/2 and C57BL/6 mice. Infected mice were killed when they achieved parasitemia rates >20%. Control mice were age-paired non-infected mice of the same strain and sex. Columns show means (\pm SEM) of 18 or 19 mice. An asterisk (*) indicates that infected group differs from the respective non-infected control (Student's *t* test, $P < 0.05$).

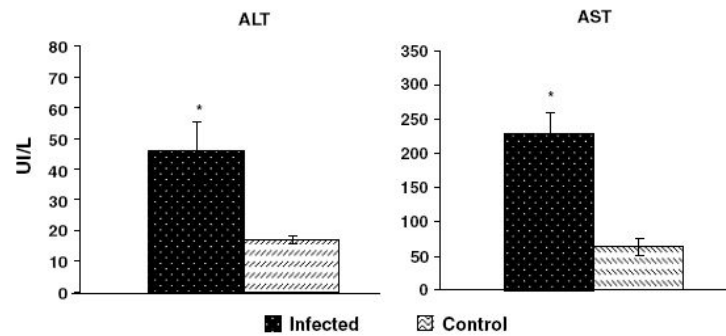


Fig. 4. Effects of *P. berghei* infection on the activities of ALT and AST (UI/L) in the blood serum from female DBA/2 mice. Blood was taken from infected mice (parasitemia rates >20%) and non-infected controls before they were killed for preparation of liver microsomes. Control mice were age-paired non-infected mice of the same sex. Columns show means (\pm SEM) of activities and an asterisk (*) indicates that infected group differs from the respective non-infected control (Student's *t* test, $P < 0.05$).

inflammatory stimuli (Khatsenko et al., 1993). As a rule, a depression of CYP activities has been found and a hypothesis was advanced—based mainly on studies with LPS and bacterial infections—that the elevation of NO levels caused by infections and inflammatory stimuli mediates the down-modulation of CYPs (Khatsenko and Kikkawa, 1997). Since malaria infection induces iNOS in rodents (Dascombe and Nahrevanian, 2003), the down-modulation of some CYP isoforms (e.g., those belonging to CYP1A and 2B subfamilies) by *P. berghei* infection could have been due to a rise in liver NO levels. Whether or not NO plays a role in malaria-caused down-modulation of CYP isoforms, however, still remains to be demonstrated.

The modulation of CYP2A5 activity by infections and inflammation seems to be completely different from that reported for other CYPs (Camus-Randon et al., 1996; Gilmore et al., 2003). Similarly to most CYP isoforms, CYP2A5 was depressed by treatment with LPS (Gilmore et al., 2003). In some infections such as viral hepatitis and trematode infections, nevertheless, an up-regulation of CYP2A5 has been described. An induction of CYP2A5 activity was noted in murine models of B hepatitis (Kirby et al., 1994a). Moreover, evidence has been provided that CYP2A5 is up regulated during infection of mice with the liver fluke *Fasciola hepatica* (Montero et al., 1999) and also in male hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* (Kirby et al., 1994b). It is of note that human CYP2A6 seems to be induced in the liver of patients infected with *O. viverrini* (Satarug et al., 1996). It still remains obscure why murine CYP2A5 and human CYP2A6 are induced by some infections and depressed by others. Recently, Gilmore et al. (2003) suggested that the up-regulation of CYP2A5 observed in mouse models of hepatitis and hepatotoxicity is associated with hepatocellular injury, and could be related to the oxidative damage to the endoplasmic reticulum of hepatocytes. Elevated ALT (UI/L, MAL 45.9 ± 9.4 , CON 16.8 ± 1.1 , $P < 0.05$) and AST (UI/L, MAL 227.8 ± 32.2 , CON 64.3 ± 12.9 , $P < 0.05$) serum levels in infected as compared to non-infected DBA/2 mice (Fig. 4) indicated that

P. berghei-infection caused hepatocellular injury. Results from the present study with malaria infection are thus consistent with the view that induction of CYP2A5 is associated with liver injury.

The mechanism by which *P. berghei* infection induced CYP2E1 activity in DBA/2 and C57Bl/6 mice also remains unclear. It has been reported that rodent liver CYP2E1 can be induced by starvation (Khatsenko et al., 1997). Since hypophagia and weight loss is often present in severe infections and *P. berghei*-infected mice showed a weight gain deficit, starvation is a possible explanation for the induction of CYP2E1 in the present study.

In summary, data provided by the present study showed that *P. berghei* infection induces CYP2A5 and 2E1 activities while depresses enzyme activities mediated by other CYP isoforms in the mouse liver. The modulation of monooxygenase activities by malaria infection can alter the kinetics of anti-malarial drugs and other xenobiotic compounds thereby modifying their pharmacological and toxicological effects. Since CYP2A5 and 2E1 are involved in the activation of diethyl and dimethyl-nitrosamine, respectively, this finding suggests that malaria infection may enhance susceptibility to the hepatocarcinogenic effects of some nitrosamines.

Acknowledgments

FJRP is the recipient of a fellowship from the Brazilian National Research Council (CNPq) and the research project is supported by grants from CNPq, FAPERJ and PAPES-FIOCRUZ. We are thankful to Dr. Leonardo Carvalho and to Prof. Claudio Tadeu Daniel Ribeiro from the Laboratory of Research on Malaria of the Oswaldo Cruz Institute—FIOCRUZ for providing the *P. berghei* (ANKA) parasites used in the study.

References

- Akinyinka, O.O., Sowunmi, A., Honeywell, R., Renwick, A.G., 2000. The effects of acute falciparum malaria on the disposition of caffeine and

- the comparison of saliva and plasma-derived pharmacokinetic parameters in adult Nigerians. *European Journal of Clinical Pharmacokinetics* 56, 159–165.
- Allis, J.W., Robinson, B.L., 1994. A kinetic assay for *p*-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes. *Analytical Biochemistry* 219, 49–52.
- Alvares, A.P., Ueng, T.H., Scheibel, L.W., Hollingdale, M.R., 1984. Impairment of hepatic cytochrome *P*-450-dependent monooxygenases by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Molecular Biochemical Parasitology* 13, 277–282.
- Camus-Randon, A.-M., Raffalli, F., Berezziat, J.-C., McGregor, D., Konstandi, M., Lang, M.A., 1996. Liver injury and expression of cytochromes P450: evidence that regulation of CYP2A5 is different from that of other major xenobiotic metabolizing CYP enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 138, 140–148.
- De-Oliveira, A.C., Fidalgo-Neto, A.A., Paumgarten, F.J.R., 1999. In vitro inhibition of liver monooxygenases by beta-ionone, 1,8-cineole, (–)-menthol and terpineol. *Toxicology* 135, 33–41.
- Dascombe, M.J., Nahrevanian, H., 2003. Pharmacological assessment of the role of nitric oxide in mice infected with lethal and nonlethal species of malaria. *Parasite Immunology* 25, 149–159.
- Gilmore, W.J., Hartmann, G., Piquette-Miller, M., Marriott, J., Kirby, G.M., 2003. Effects of lipopolysaccharide-stimulated inflammation and pyrazole-mediated hepatocellular injury on mouse hepatic CYP2A5 expression. *Toxicology* 184, 211–226.
- Glazier, A.P., Kokwaro, G.O., Edwards, G., 1994. Possible isozyme-specific effects of experimental malaria infection with *Plasmodium berghei* on cytochrome P450 activity in rat liver microsomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46, 352–355.
- Ioannides, C., Lewis, D.F., 2004. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4, 1767–1788.
- Kennedy, S.W., Jones, S.P., 1994. Simultaneous measurement of cytochrome P450A1 catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader. *Analytical Biochemistry* 222, 217–223.
- Khatsenko, O.G., Gross, S.S., Rifkind, A.B., Vane, J.R., 1993. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 11147–11151.
- Khatsenko, O.G., Shindu, R.K., Kikkawa, Y., 1997. Undernutrition during hyperoxic exposure induces CYP2E1 in rat liver. *Archives of Toxicology* 71, 684–689.
- Khatsenko, O., Kikkawa, Y., 1997. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* 280, 1463–1470.
- Kirby, G.M., Chemin, I., Montesano, R., Chisari, F.V., Lang, M.A., Wild, C.P., 1994a. Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus transgenic mice. *Molecular Carcinogenesis* 11, 74–80.
- Kirby, G.M., Pelkonen, P., Vatanasapt, V., Camus, A.M., Wild, C.P., Lang, M.A., 1994b. Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Molecular Carcinogenesis* 11, 81–89.
- Kokwaro, G.O., Glazier, A.P., Ward, S.A., Breckenridge, A.M., Edwards, G., 1993. Effect of malaria infection and endotoxin-induced fever on phenacetin *O*-deethylation by rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* 45, 1235–1241.
- Leo, K.U., Grace, J.M., Li, Q., Peggins, J., Mitchell, A.L., Aguilar, T., Brewer, T.G., 1997. Effects of *Plasmodium berghei* infection on artemether metabolism and disposition. *Pharmacology* 54, 276–284.
- Mansor, S.M., Edwards, G., Roberts, P.J., Ward, S.A., 1991b. The effect of malaria infection on paracetamol disposition in the rat. *Biochemical Pharmacology* 41, 1707–1711.
- Mansor, S.M., Ward, S.A., Edwards, G., 1991a. The effect of malaria infection on antipyrine metabolite formation in the rat. *Biochemical Pharmacology* 41, 1264–1266.
- McCarthy, J.S., Furner, R.L., van Dyke, K., Stitzel, R.E., 1970. Effects of malarial infection on host microsomal drug-metabolizing enzymes. *Biochemical Pharmacology* 19, 1341–1349.
- Montero, R., Gentile, G.J., Frederick, L., McMannis, J., Murphy, T., Silva, G., Blankespoor, H., Gentile, J.M., 1999. Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis* 14, 217–220.
- Nerurkar, P.V., Park, S.S., Thomas, P.E., Nims, R.W., Lubet, R.A., 1993. Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P450A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochemical Pharmacology* 46, 933–943.
- Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., Keeratithakul, D., Davis, T.M., Teja-Isavadharm, P., Nagachinta, B., Weber, A., Smith, A.L., Kyle, D., White, N.J., 1997. A study of the factors affecting the metabolic clearance of quinine in malaria. *European Journal of Clinical Pharmacokinetics* 52, 487–493.
- Rhanasto, M., Raunio, H., Poso, A., Juvonen, R.O., 2003. More potent inhibition of human CYP2A6 than mouse CYP2A5 enzyme activities by derivatives of phenylethylamine and benzaldehyde. *Xenobiotica* 33, 529–539.
- Satarug, S., Lang, M.A., Yongvanit, P., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Mairiang, P., Pelkonen, P., Bartsch, H., Haswell-Elkins, M.R., 1996. Induction of cytochrome P450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasite infection, *Opisthorchis viverrini*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 5, 795–800.
- Sewer, M.B., Koop, D.R., Morgan, E.T., 1997. Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P450 expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280, 1445–1454.
- Simonsson, U.S.H., Jansson, B., Hai, T.N., Huong, D.X., Tybring, G., Ashton, M., 2003. Artemisinin autoinduction is caused by involvement of cytochrome P450 2B6 but not 2C9. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 74, 32–43.
- Srivastava, P., Pandey, V.C., 2000. Studies on hepatic mitochondrial cytochrome P450 during *Plasmodium yoelii* infection and pyrimethamine treatment in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 19–22.
- Srivastava, P., Sharma, S.N., Shukla, O.P., Pandey, V.C., 1997. Studies on the hepatic mitochondrial and microsomal mixed-function oxidase system during *Plasmodium yoelii* infection and inducer treatment in Swiss albino mice. *Tropical Medicine and International Health* 2, 989–992.
- Srivastava, P., Tripathi, L.M., Puri, S.K., Dutta, G.P., Pandey, V.C., 1991. Effect of *Plasmodium berghei* infection and chloroquine on the hepatic drug metabolizing system of mice. *International Journal for Parasitology* 21, 463–466.
- Uhl, K., Grace, J.M., Kocisko, D.A., Jennings, B.T., Mitchell, A.L., Brewer, T.G., 1999. Effects of *Plasmodium berghei* infection on cytochromes P450 2E1 and 3A2. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 24, 169–176.
- Wood, A.W., Conney, A.H., 1974. Genetic variation in coumarin hydroxylase activity in the mouse (*Mus musculus*). *Science* 185, 612–614.

Malaria infection modulates effects of genotoxic chemicals in the mouse bone-marrow micronucleus test

Kátia S. Poça, Ana C.A.X. De-Oliveira, Manoel J.S. Santos,
Francisco J.R. Paumgarten*

Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Biological Sciences, National School of Public Health,
Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 31 December 2006; received in revised form 4 July 2007; accepted 23 July 2007

Available online 27 July 2007

Abstract

Malaria has been reported to modulate the activity of cytochrome-P450 enzymes (CYP). Since CYPs are involved both in the activation and detoxication of xenobiotics, we investigated whether malaria would modify the effects of chemical carcinogens in the bone-marrow micronucleus assay. Female C57BL/6 mice were infected with *Plasmodium berghei* (ANKA) and treated (ip route) with cyclophosphamide (CPA, 25 mg/kg body weight), 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA, 50 mg/kg body weight) or ethyl methanesulfonate (EMS, 150 mg/kg body weight), on post-infection days 9–12 when parasitemia was $\geq 9\%$ of RBC. Controls were age-paired non-infected mice. Bone marrows were sampled at 24 and 48 h (CPA), 24 h (EMS) or 48 h (DMBA) after treatment. The background incidence of polychromatic erythrocytes with micronuclei (MN-PCE) in malaria-infected mice was approximately twofold the background incidence in non-infected controls. Effects of indirect clastogens (CPA and DMBA) in the micronucleus assay were attenuated while the effect of EMS, a direct clastogen, was enhanced by infection. In a separate experiment, malaria was shown to decrease activities of ethoxy-(EROD, a marker for CYP1A) and benzyloxy-(BROD, CYP2B) resorufin-*O*-dealkylases in liver microsomes. The foregoing findings are consistent with the hypothesis that malaria-caused attenuation of genotoxicity arose from a down modulation of CYP isoforms that convert CPA (CYP2B) and DMBA (CYP1A) into their active metabolites.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Plasmodium berghei*; Xenobiotic biotransformation; Infections; Mutagenicity; Carcinogenicity; Cytochrome-P450

1. Introduction

Following smoking habit, chronic infections are perhaps the most important preventable causes of human cancer [1]. A number of malignancies have been associated with viral (e.g. human papilloma virus, hepatitis B

and C viruses, Epstein-Barr virus and others) and bacterial infections (e.g. *Helicobacter pylori*). Helminthic infections have also been linked to cholangiosarcoma (e.g. *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis*) and urinary bladder carcinoma (*Schistosoma haematobium*) in Asian and African countries, respectively [1]. Herrera et al. [2,3] have found increased incidences of genetic damage in peripheral lymphocytes of patients with neurocysticercosis as well as in lymphocytes of pigs infected with cysts of the tapeworm *Taenia solium*. It has also been reported that experimental infection of rats with cysts of *Taenia taeniformis* enhanced the clasto-

* Corresponding author at: Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública-FIOCRUZ, Av Brasil 4036, Prédio de Expansão do Campus, Rio de Janeiro, RJ 21041-361, Brazil.
Tel.: +55 21 38829044; fax: +55 21 22601069.

E-mail address: poum@ensp.fiocruz.br (F.J.R. Paumgarten).

genic effects of procarcinogens such as benzo[*a*]pyrene, cyclophosphamide and aflatoxin B1 [4]. A possible influence of protozoan infections on cancer development, however, still remains to be elucidated. So far only a few experimental studies have addressed this question. Hibbs et al. [5], for instance, reported that chronic infection with *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia jellisoni* enhanced resistance against certain murine tumor cell types. Along the same line, Oliveira et al. [6] found that chronic infection by *Trypanosoma cruzi* diminished the incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. It was also described that carcinogenic effects of aflatoxin-B1 (AFB1) were either depressed or enhanced by malaria depending on whether animals were infected before initiation or at a later phase (promotion/progression) of tumor development. Angsubhakom et al. [7] reported that rats exposed to aflatoxin-B1 (AFB1) and infected with *Plasmodium berghei* developed more liver preneoplastic lesions than the non-infected controls. A further study by the same group, nevertheless, showed that hepatocarcinogenic effects of AFB1 were substantially attenuated in rats infected with *P. berghei* 12 days prior to the beginning of dietary exposure to the mycotoxin [8]. No other study on the interaction of protozoa infections with genetic damage and/or carcinogenicity induced by chemicals was found in the literature.

Malaria and other infections may modify cancer development through several mechanisms including a modulation of chemical carcinogenesis. Along this line, it should be pointed out that a number of infections were reported to up or down regulate activities of cytochrome-P450 enzymes that take part in the activation and/or detoxication of genotoxic carcinogens.

This study was undertaken to investigate whether malaria modulates effects of direct and indirect genotoxic carcinogens in the mouse bone-marrow micronucleus assay. Additionally, we also evaluated the effects of *Plasmodium berghei* infection on the activities of hepatic cytochrome-P450 enzymes involved in the metabolic activation of chemical carcinogens.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Six-week-old female C57BL/6 mice supplied by the Centre for Laboratory Animal Breeding (CECAL) of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) were used. The animals were housed in standard plastic cages with stainless steel coverlids and wood shavings as bedding. Room temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), air relative humidity (approximately 70%) and light/dark cycle (lights on from 8:00 a.m. to 8:00 p.m.) were controlled in the animal facilities. Filtered tap water and a commercial

diet for rats and mice (Nuvital CR1, Nuvilab®, Curitiba, PR, Brazil) were provided *ad libitum*. Experiments were conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) and the Brazilian law for animal protection and welfare. The study protocol was licensed by the Ethics committee for the use of animals of FIOCRUZ (CEUA).

2.2. Parasite and infection

Infected animals were treated – by the intraperitoneal route (ip) – with 0.2 ml of PBS-diluted blood (5×10^6 parasitized red blood cells per ml) from a donor mouse that had been previously infected with *Plasmodium berghei* (ANKA). The donor mouse was inoculated with a stabilate kept at -80°C in Alsever's solution. For each malaria-inoculated mouse, an age-paired non-infected control animal was injected with 0.2 ml of PBS solution. After infection, mice were daily examined for clinical signs of illness and, every other day, the percentage of parasitized red blood cells (parasitemia) was determined by microscopic examination of blood smears stained by the Romanowsky's method (Panóptico Rápido, Laborclin®, Pinhais, PR, Brazil).

2.3. Mouse bone-marrow micronucleus assay

The mouse bone-marrow micronucleus test was carried out according to recommendations of MacGregor et al. [9] and OECD guidelines [10]. Cyclophosphamide (CPA, CAS no. 50-18-0) was a product (Fosfaseron®) from Laboratório Filaxis SA, Buenos Aires, Argentina, while ethyl methanesulfonate (EMS, CAS no. 62-50-0) and 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA, CAS no. 57-97-6) were purchased from Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA. Bone-marrow cells were harvested 24 and 48 h (CPA), 24 h (EMS) or 48 h (DMBA) after ip injection of a single dose of the genotoxic agent. Mice were killed by cervical dislocation, femurs were quickly removed and freed from muscle tissue, and bone marrows were flushed into centrifuge tubes containing fetal calf serum (FCS). Cell suspensions were centrifuged at 1000 rpm for 10 min and supernatants were discarded. The pellets were suspended in a drop of FCS and used for preparing bone-marrow smears. Air-dried smears were stained with May-Griinwald Giemsa and all slides were coded for further blind evaluation. Two hundred erythrocytes were examined per slide to determine the ratio of polychromatic (PCE) to normochromatic erythrocytes (NCE), which is an indication of toxicity to bone-marrow cells, while 2000 PCE per slide were analyzed for the presence of micronuclei (MN-PCE), which is an indication of DNA damage. A trained evaluator who was unaware of animals' previous treatment scored all slides.

2.4. Preparation of liver microsomes

Infected female mice ($N=15$) and non-infected female controls ($N=15$), which had not been treated with any genotoxic

substance, were used for assaying enzyme activities. Mice were killed by cervical dislocation and their livers were rapidly removed, weighed and frozen at -80°C until further use. Hepatic microsomes were prepared essentially as described by De-Oliveira et al. [11] except for the use of Tris (100 mM)–KCl (150 mM) buffer (pH 7.4) instead of sucrose solution. Microsomal protein concentration was measured by using Bradford's reagent and bovine serum albumin as standard (Sigma Chemical Co., USA).

2.5. Enzyme assays

Activities of alkoxy-resorufin-*O*-dealkylases were assayed using ethoxy-resorufin (EROD) and benzyloxy-resorufin (BROD) as substrates. EROD and BROD activities were determined in multi-well plates as described by Kennedy and Jones [12], except for the use of a NADPH regenerating system as previously reported [11]. After a 10-min incubation at 37°C , 100 μl of acetonitrile was added to each well and the amount of resorufin was measured by using a fluorescence plate reader (Spectramax Gemini XS[®], Molecular Devices Co., USA) with excitation and emission wavelengths set at 530 and 590 nm, respectively. Under the present assay conditions, reaction was previously found to be linear for at least 15 min.

2.6. Statistical analysis

Statistical comparisons among several groups were made by a non-parametric analysis of variance (Kruskal–Wallis test), and between two groups by the Mann–Whitney *U*-test. In any case a difference was considered as statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of malaria on the incidence of chromosome damage in bone-marrow cells

Female C57BL/6 mice inoculated with *P. berghei* (10^6 parasitized red blood cells) achieved high rates of parasitemia ($\geq 9\%$) on post-infection days 9–16 when they were killed either for bone-marrow sampling or for preparation of liver microsomal fraction. Marked rises of parasitemia rates were generally accompanied by clinical signs such as body weight gain deficit, piloerection, hypoactivity and rapid breathing. On the day of sacrifice, most *P. berghei*-infected mice had a darker and slightly heavier liver and a markedly enlarged spleen. As shown in Table 1, *P. berghei* infection increased the incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) in the mouse bone marrow thereby suggesting that malaria itself has a mild clastogenic effect.

Table 1

Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MN-PCE) in the bone marrow of female C57BL/6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA and their non-infected controls

Treatment	Non-infected	<i>P. berghei</i> infected	Mann–Whitney <i>U</i> -test
<i>N</i>	11	11	–
Post-infection day	–	12.45 \pm 0.28	–
Parasitemia (%)	–	15.03 \pm 1.16	–
MN-PCEs (%)	1.64 \pm 0.27	2.91 \pm 0.20	$P < 0.001$
PCE/NCE ratio	1.00 \pm 0.04	1.19 \pm 0.11	NS

Data are shown as means \pm S.E.M. Mice were inoculated with 10^6 parasitized erythrocytes from a donor animal. Two thousand PCEs were scored per mouse, MN-PCEs (%): MN-PCEs per thousand PCEs; PCE/NCE ratio: PCE/NCE. NS, non-significant ($P > 0.05$).

3.2. Modulation of genotoxic effects by malaria infection

To evaluate whether genotoxic effects are altered by *P. berghei* infection, we tested two indirect (CPA and DMBA) and one direct (EMS) clastogen in the bone-marrow micronucleus assay. In non-infected mice, CPA, in doses up to 50 mg/kg body weight, induced a dose-dependent increase in the frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes (MN-PCE) in the absence of any statistically detectable reduction of PCE/NCE ratio (Fig. 1A). In *P. berghei*-infected mice, CPA (25 mg/kg body weight)-induced increase in the incidence of MN-PCE was attenuated, while PCE/NCE ratio was enhanced 24 h after treatment (Fig. 1B). When bone-marrow cells were harvested 48 h after treatment with a single dose of CPA (25 mg/kg body w), the incidence of MN-PCE was markedly reduced in infected and in non-infected treated mice and differences between the two groups were no longer detected (Fig. 1B). In infected mice, the PCE/NCE ratio was also increased 48 h after treatment with CPA (Fig. 1B). The foregoing results suggested that malaria infection reduced the clastogenic effect of CPA, a promutagen activated by cytochrome-P450 isoforms belonging to 2B and 3A subfamilies. Fig. 2 shows that infection also decreased the effects of DMBA (50 mg/kg body weight ip), a clastogen activated by CYP1A1/2 isoforms. Nonetheless, the effect of EMS (150 mg/kg body weight ip), a direct clastogenic agent, was enhanced in malaria-infected mice (Fig. 3). Results therefore demonstrated that malaria infection attenuated effects of indirect clastogens activated by CYP1A1 and 2B9/10 isoforms and enhanced the effect of a direct-acting compound.

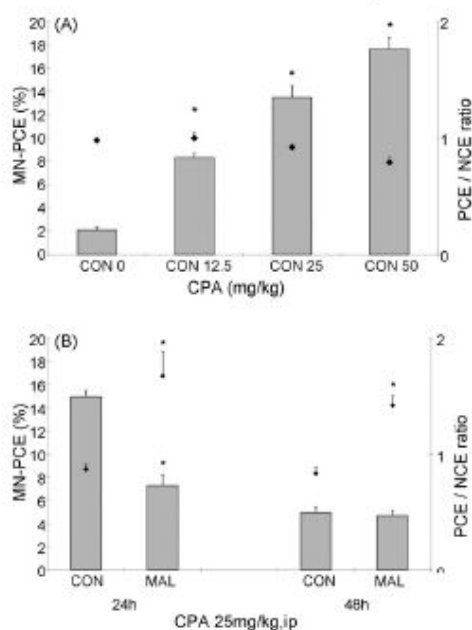


Fig. 1. (A) Effect of cyclophosphamide (CPA, 0, 12.5, 25, and 50 mg/kg ip) on the frequency (%) of MN-PCE (histogram bar) and PCE/NCE ratio (black diamond-shaped symbol) in the bone marrow of non-infected female mice ($N=5$ per group). Data are presented as means \pm S.E.M. and comparisons were made by the Kruskal–Wallis and the Mann–Whitney U -tests. Differences ($P < 0.05$) are indicated by single asterisk (* \neq CON 0). (B) Effects of CPA (25 mg/kg ip) on the frequency (%) of MN-PCE (histogram bar) and PCE/NCE ratio (black diamond-shaped symbol) in the bone marrow of *P. berghei*-infected (MAL) and non-infected (CON) female C57BL/6 mice. Bone marrows were harvested 24 h (MAL, $N=9$; CON, $N=12$) and 48 h (MAL, $N=14$; CON, $N=14$). Parasitemia rates (% of RBC) of mice on the post-infection days (13, 13–16) of sacrifice were: 15.4 (9.2–30.3). Data are presented as means \pm S.E.M. and comparisons were made by the Kruskal–Wallis and the Mann–Whitney U -tests. Differences ($P < 0.05$) are indicated by single asterisk (* \neq CON 25).

3.3. Effects of malaria on the activity of liver cytochrome-P450 enzymes

EROD and BROD activities in rodent liver microsomes are mediated by CYP1A1/2 and CYP2B isoenzymes (CYP2B9/10 in mice), respectively. Activities of EROD and BROD in *P. berghei*-infected mice were all lower than the activities in controls (Figs. 4 and 5) thereby indicating that malaria depressed activities of CYP1A and 2B isoforms. Since CYP1A and 2B subfamilies are involved in the activation of CPA and DMBA, respectively, attenuation of their clastogenic

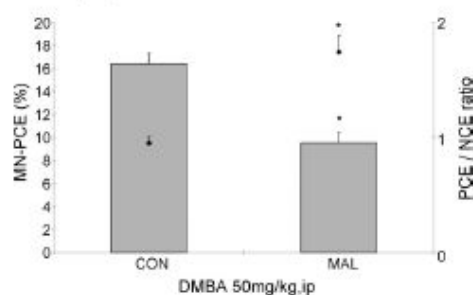


Fig. 2. Frequency (%) of MN-PCE (histogram bar) and PCE/NCE ratio (black diamond-shaped symbol) in the bone marrow of non-infected (CON, $N=25$) and *P. berghei*-infected (MAL, $N=23$) female C57BL/6 mice treated with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA, 50 mg/kg ip). Parasitemia rates (% of RBC) of mice on the post-infection days (12, 10–14) of sacrifice were: 30.0 (9.7–68.0). Data are presented as means \pm S.E.M. Differences ($P < 0.05$, Mann–Whitney U -test) from non-infected controls (CON) are indicated by single asterisk (*).

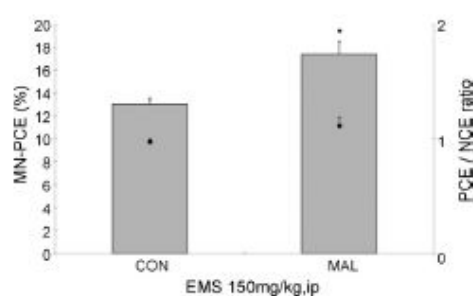


Fig. 3. Frequency (%) of MN-PCE (histogram bar) and PCE/NCE ratio (black diamond-shaped symbol) in the bone marrow of non-infected (CON, $N=20$) and *P. berghei*-infected (MAL, $N=13$) female C57BL/6 mice treated with ethyl methanesulfonate (EMS 150 mg/kg ip). Parasitemia rates (% of RBC) of mice on the post-infection days (14, 9–14) of sacrifice were: 15.2 (11.0–23.6). Data are presented as means \pm S.E.M. Differences ($P < 0.05$, Mann–Whitney U -test) from non-infected controls (CON) are indicated by single asterisk (*).

effects by malaria may have resulted from a slower rate of metabolic activation of promutagens in infected mice. Malaria-caused depression of cytochrome-P450 activities, on the other hand, may have delayed elimination of EMS thereby augmenting the effect of this direct clastogen in the bone-marrow micronucleus assay.

4. Discussion

Results from this study suggested that malaria infection enhances the background frequency of chromosome damage in mouse bone-marrow cells. The occurrence of

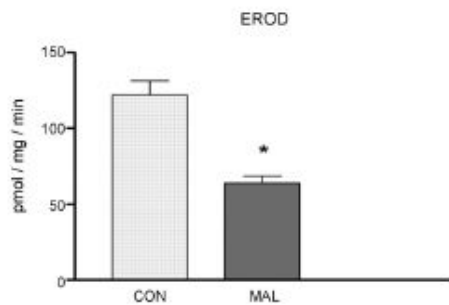


Fig. 4. EROD activity (pmol of resorufin/mg of protein/min) in liver microsomes from female C57BL/6 mice infected with *P. berghei* (MAL) and their age-paired non-infected controls (CON). Parasitemia rates (%) of mice on the day of sacrifice were: 25.0 (12.0–67.0). Bars show means (\pm S.D.) of 15 mice. An asterisk (*) indicates that infected group differs from the non-infected control group (Mann–Whitney *U*-test, $P < 0.05$).

micronuclei in polychromatic erythrocytes (MN-PCE) was augmented (two-fold) in *P. berghei*-infected mice. Other studies have provided evidence that some parasitic infections may cause genetic damage in humans and animals. Montero et al. [4], for instance, found an augmented incidence of micronucleated reticulocytes in the blood of rats infected with *Taenia taeniformis*. It has also been reported that patients with *Taenia solium* cystercercosis exhibited a higher incidence of chromosomal aberrations and micronuclei in peripheral lymphocytes [3]. An augmented frequency of sister chromatid exchanges (SCE) was also noted in pigs infected

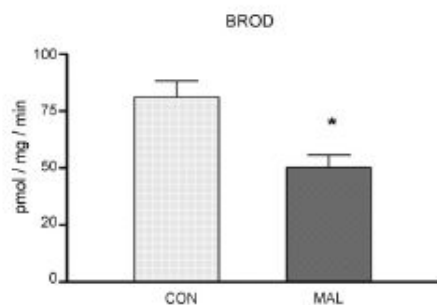


Fig. 5. BROD activity (pmol of resorufin/mg of protein/min) in liver microsomes from female C57BL/6 mice infected with *P. berghei* (MAL) and their age-paired non-infected controls (CON). Parasitemia rates (%) of mice on the day of sacrifice were: 25.0 (12.0–67.0). Bars show means (\pm S.D.) of 15 mice. An asterisk (*) indicates that infected group differs from the non-infected control group (Mann–Whitney *U*-test, $P < 0.05$).

with *Taenia solium* cysticerci [2]. Along the same line, Gentile et al. [13] found a twofold increase in lacI mutations (Big Blue transgenic mouse assay) in mice infected with the trematode worm *Fasciola hepatica* as compared to non-infected controls. Although the foregoing studies suggest that helminthic infections may cause genetic damage, as far as we are aware, there is no previous study on the induction of chromosome damage by malaria and other protozoan infections.

P. berghei infection seemed to have increased PCE/NCE ratio, at least in those cases in which elevated rates of parasitemia were achieved. During blood stage malaria, schizont rupture and erythrophagocytosis is one of the causes of anemia, which in turn – via an increased erythropoietin production in the kidneys – promotes erythropoiesis in the bone marrow and an influx of immature erythrocytes into the blood to alleviate anemia [14]. It has been reported, however, that parasite toxins may also play a role in the pathogenesis of malarial anemia. In C57BL/6 mice, for instance, *P. berghei* ANKA exoantigens were shown to affect proliferation of spleen and bone-marrow hematopoietic cells [15,16]. It deserves to be further investigated whether *P. berghei* toxins in addition to affecting proliferation also induce chromosome damage in bone-marrow cells.

Our data also showed that *P. berghei* infection modulates effects of direct (EMS) and indirect (CPA and DMBA) mutagens in the mouse bone-marrow micronucleus assay. The effects of indirect clastogens activated by CYP2B and 3A (CPA) and CYP1A (DMBA) were down modulated while the effect of a direct acting agent (EMS) was enhanced in infected mice. Since activities of CYP2B and 1A were depressed by malaria, the foregoing results are consistent with the hypothesis that down modulation of CPA and DMBA clastogenicity was due to a slower rate of metabolic activation of these compounds in infected mice. Results from a previous study by Angsubhakom et al. [8] also seem to support this interpretation. These authors demonstrated that hepatocarcinogenic effects of AFB1, a pro-carcinogen activated by CYP isoforms, were markedly reduced in rats infected with *P. berghei* [8].

Malaria has been shown to cause an almost generalized depression of CYP-mediated biotransformation of xenobiotics thereby slowing elimination of a variety of xenobiotics in humans and rodents [17,18]. Furthermore, since CPA is a pro-drug used in the treatment of cancer, findings from this study also suggest that its therapeutic effect is attenuated during malaria infection. The mechanism by which malaria infection enhanced clastogenic effects of EMS, on the other hand, remains to be further elucidated.

It is of note that Montero et al. [4] demonstrated that genotoxic effects of CPA, benzo[*a*]pyrene and aflatoxin B1 were all increased in rats infected with *T. aestiviformis* and that this increased susceptibility possibly arose from the induction of hepatic CYP isoforms involved in the metabolic activation of these pro-mutagens. Moreover, Kirby et al. [19] found that infection with the trematode *Opisthorchis viverrini* induced CYP2A5 activity and increased the formation of AFB1 adducts in the liver of hamsters. Evidence provided by the foregoing studies showing that helminthic infections increase the susceptibility to procarcinogens has been viewed as an indication that infectious diseases may increase the risk of cancer in individuals exposed to chemical carcinogens. Results presented in this paper, however, suggest that infections may either increase or reduce chemical carcinogenesis depending on the type of infectious agent, the phase of infection and whether the chemical is a direct or an indirect carcinogen.

Acknowledgements

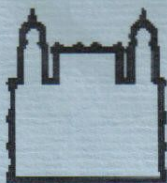
The authors are indebted to Prof. Dr. Claudio T.D. Ribeiro and Dr. Leonardo Carvalho from the Laboratory of Research on Malaria of the Oswaldo Cruz Institute for having provided the *P. berghei* strain used in the study. The research project was supported by grants from CNPq and FAPERJ. ACAX De-Oliveira is a PhD student of the Oswaldo Cruz Institute (IOC-FIOCRUZ) and FJRP is the recipient of a research fellowship from the Brazilian National Research Council (CNPq).

References

- [1] H. Kuper, H.O. Adami, D. Trichopoulos, Infections as a major preventable cause of human cancer, *J. Intern. Med.* 248 (2000) 171–183.
- [2] L.A. Herrera, P. Santiago, G. Rojas, P.M. Salazar, P. Tero, J.L. Molinari, D. Schiffman, P. Ostrowsky-Wegman, Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Toxina solium metacercariae*, *Mutat. Res.* 305 (1994) 223–228.
- [3] L.A. Herrera, T. Ramirez, U. Rodriguez, T. Corona, J. Setelo, M. Lorenno, F. Ramos, I. Verdofar, E. Gebbar, P. Ostrowsky-Wegman, Possible association between *Toxina solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (2000) 61–65.
- [4] R. Montero, L. Sorzano, V.M. Diez, A. Ito, A. Plancarte, Infection of rats with *Toxina aestiviformis* metacercariae increases hepatic CYP450, induces the activity of CYP1A1, CYP2B1 and CYP2A5 isoforms and increases the genotoxicity of the procarcinogens benzo[*a*]pyrene, cyclophosphamide and aflatoxin B1, *Mutagenesis* 18 (2003) 211–216.
- [5] J.B. Hibbs, L.H. Lambert, J.S. Remington, Resistance to murine tumours conferred by chronic infection with intracellular protozoa, *Toxoplasma gondii* and *Bezzia viverrini*, *J. Infect. Dis.* 124 (1971) 587–592.
- [6] E.C. Oliveira, M.S. Leite, J.A. Miranda, A.L. Andrade, S.B. Garcia, A.O. Luquetti, H. Moreira, Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats, *Carcinogenesis* 22 (2001) 737–740.
- [7] S. Angsathakorn, P. Sathitopas, N. Bhamarapravati, Enhancing effects of rodent malaria on aflatoxin B1-induced hepatic neoplasia, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 112 (1986) 77–79.
- [8] S. Angsathakorn, N. Bhamarapravati, S. Sahaphong, P. Sathitopas, Reducing effects of rodent malaria on hepatic carcinogenesis induced by dietary aflatoxin B1, *Int. J. Cancer* 41 (1988) 69–73.
- [9] J.T. MacGee, J.A. Heddle, M. Hise, B.H. Margolis, C. Ramel, M.F. Salazar, B.B. Tice, D. Wild, Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutat. Res.* 189 (1987) 103–112.
- [10] OECD, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD guidelines for the testing of chemicals 474, July 21, 1997.
- [11] A.C. De-Oliveira, A.A. Fidalgo-Neto, F.J.R. Paumgartner, In vitro inhibition of liver monooxygenases by beta-ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpinolol, *Toxicology* 135 (1999) 33–41.
- [12] S.W. Kennedy, S.P. Jones, Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescence plate reader, *Anal. Biochem.* 222 (1994) 217–223.
- [13] J.M. Gentile, G.J. Gentile, B. Nannings, M. Johnston, H. Blankespoor, E. Montero, Enhanced liver cell mutations in nematode-infected Big Blue transgenic mice, *Mutat. Res.* 400 (1998) 355–360.
- [14] K.H. Chang, M.M. Stewart, Malaria anemia: mechanism and implications of insufficient erythropoiesis during blood stage malaria, *Int. J. Parasitol.* 34 (2004) 1501–1516.
- [15] G. Bordmann, N. Favre, W. Rudin, Malaria toxins: effects on murine spleen and bone marrow cell proliferation and cytokine production in vivo, *Parasitology* 115 (1997) 475–483.
- [16] W. Rudin, V. Quessada, N. Favre, G. Bordmann, Malaria toxins from *P. chabaudi chabaudi* AS and *P. berghei* ANKA cause dyserythropoiesis in C57BL/6 mice, *Parasitology* 115 (1997) 467–474.
- [17] A.J. Glazier, G.O. Kekawo, G.J. Edwards, Possible isoenzyme-specific effects of experimental malaria infection with *Plasmodium berghei* on cytochrome P450 activity in rat liver microsomes, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 352–355.
- [18] R. Srivastava, L.M. Tripathi, S.K. Puri, G.R. Dutta, V.C. Pandey, Effect of *Plasmodium berghei* infection and chloroquine on the hepatic drug metabolism system of mice, *Int. J. Parasitol.* 21 (1991) 463–466.
- [19] G.M. Kirby, P. Delkonen, V. Vannasapt, A.M. Camus, C.J. Wild, M. Lang, Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver, *Mol. Carcinog.* 11 (1994) 81–89.

ANEXO 4

CERTIFICADO CEUA



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº P-0114-02, intitulado “Estudo das alterações da atividade e expressão de CYP450s e da cinética de xenobióticos na esquistossomose e malária” sob a responsabilidade do **Dr. Francisco José Roma Paumgarten**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 07/12/2006. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 07 de dezembro de 2010.

Rio de Janeiro, 07 de dezembro de 2006.

Dr. Octávio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

Avenida Brasil nº 4365 - Mourisco - sala 07 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - Brasil
Tel: (+55) 21.3885-1698 - FAX: (+55) 21. 2590-9490 E. mail: ceua@fiocruz.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)