

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

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MONOOXIGENASES HEPÁTICAS  
(CYP1A, 2B e 2E) PELA VACINA PERTUSSIS EM CAMUNDONGOS C57BL6.

**Igor Barbosa da Silva**

Dissertação apresentada à Escola Nacional de  
Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo  
Cruz para obtenção do grau de Mestre em Saúde  
Pública – Área de Concentração: Toxicologia.

Rio de Janeiro

2005

## FICHA CATALOGRÁFICA

Barbosa da Silva, Igor

Modulação da atividade de monooxigenases hepáticas (CYP1A, 2B e 2E) pela vacina pertussis em camundongos C57BL6/ Igor Barbosa da Silva – 2005

72 p

Orientador: Francisco J.R. Paumgarten

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

1. Vacina pertussis. 2. Citocromos P450. I. Francisco José Roma Paumgarten. II. Fundação Oswaldo Cruz III. Efeitos da vacina pertussis sobre monooxigenases hepáticas (CYP1A, CYP2B e CYP2E).

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

MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MONOOXIGENASES HEPÁTICAS  
(CYP1A, 2B e 2E) PELA VACINA PERTUSSIS EM CAMUNDONGOS C57BL6.

**Igor Barbosa da Silva**

Orientador:

Francisco José Roma Paumgarten

Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Ana Maria Rossini Teixeira

Dr. \_\_\_\_\_  
Geraldo Rodrigues Garcia Armôa

Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Isabella Fernandes Delgado

Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Helena Pereira da Silva Zamith

Dr. \_\_\_\_\_  
Francisco José Roma Paumgarten

Rio de Janeiro  
2005

A minha amada Carol, família e amigos pelo amor, dedicação e carinho, que foram essenciais para a realização dessa importante etapa da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A minha fantástica mãe **Iara**, que ao longo de toda sua vida lutou contra todas as intempéries do mundo para garantir a melhor formação de seus filhos e que mesmo sozinha nunca desistiu, mostrando-se ser uma grande guerreira e sem dúvidas só cheguei até aqui (e irei além) graças a garra e o enorme amor que emana desta rainha.

Ao meu irmão **Hugo**, por sempre ter me ajudado em tudo que pôde durante minha carreira científica; enriquecendo meus trabalhos com seus dons artísticos e me salvando dos “conflitos esporádicos” contra o computador.

Ao meu pai **Nabucodonozor** (*in memoriam*) que junto com minha mãe me forneceram uma estrutura familiar sólida e recursos para uma excelente formação educacional e moral.

Aos meus queridos avós **Carlos** e **Iara** pelo carinho, paciência e pelas experientes palavras de incentivo imprescindíveis na minha formação.

Ao meu orientador e professor **Francisco J.R. Paumgarten**, por compartilhar seu enorme conhecimento com seus alunos, além de ser grato pelo apoio, competência e atenção cedida em minha orientação.

A primeira orientadora de minha carreira científica **Ana Cecília A.X. de Oliveira**, que ao longo desses 5 anos de convivência e aprendizado sempre se dispôs a me ajudar sendo sempre muito atenciosa, dedicada, compreensiva e profissional, além de ser muito grato pelas suas palavras amigas que me encorajam a enfrentar os desafios da vida permitindo a realização dos meus sonhos.

A todos os integrantes da equipe do laboratório: **Dayse, Thiago, Regina, Rose, Karen, Kátia, Flávia, Pedro Paulo, Lucianna, Marcio, Renan, Bárbara, Lyssa, Márcia e Elaine** pelo companheirismo e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável e produtivo.

A **Isabella Delgado, Helena Zamith e Sheila Albertino** pela atenção e cooperações fundamentais para a realização de parte dos experimentos;

A minha amada **Ana Carolina Nesce** pelo carinho, dedicação, compreensão e por ter me mostrado o quanto devo ser grato por tudo que tenho, revelando-se uma excelente companheira. E também não posso deixar de agradecer pelo seu amor que me fortalece a cada dia para enfrentar os desafios do mundo. Te amo muito e obrigado por tudo.

Aos meus irmãos **Antônio** e **Fernando**, por toda ajuda técnica e intelectual, porém minha maior gratidão é pela amizade sólida e verdadeira formada nos últimos anos me permitindo com orgulho chama-los de irmãos. Espero que na jornada da vida possamos fortalecer nossa amizade e sempre estarmos em contato. Muito obrigado meus irmãos.

Injusto seria a ausência de agradecimentos as minhas grandes amigas **Karina, Lucimar e Giselle** que em minha graduação sempre me acudiram e estimularam meu crescimento profissional, além de serem exemplos de determinação, profissionalismo e cooperação. E por sempre clarearem minhas idéias com seus conselhos sensatos nos meus momentos de dúvidas e temores.

## Lista de tabelas e figuras

Figura 1. Bactéria <i>Bordetella pertussis</i> .....	1
Figura 2. Cobertura da vacinação com as 3 doses da vacina DTP em crianças no mundo em 2003 .....	2
Figura 3. Representação esquemática da interação da toxina pertussis com a proteína G envolvida em processos de sinalização intracelular. ....	4
Figura 4. Esquema da estrutura química do LPS de <i>Bordetella pertussis</i> .....	5
Figura 5: Estrutura do grupo prostético heme do citocromo P450 (adaptado de Gibson & Skett, 1994) ....	8
Figura 6: Ciclo catalítico do citocromo P450. (Adaptado de Parkinson, 2001). ....	9
Tabela 1: Níveis de endotoxina da vacina analisada neste trabalho determinados pelo ensaio semi-quantitativo do LAL. Estão representadas na tabela as diluições seriadas da vacina e a presença (+) ou ausência (-) do coágulo. A sensibilidade do teste foi de 0,125 UE/ml. ....	23
Figura 7. Variação de peso corporal nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com uma dose da vacina pertussis (40 Uop/mL) ou solução salina apirogênica (controles). ....	26
Figura 8. Variação de peso corporal nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com uma dose da vacina pertussis (40 Uop/mL) ou solução salina apirogênica (controles). ....	26
Figura 9. Peso do fígado nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles).....	27
Figura 10. Peso do fígado nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles).....	27
Figura 11. Peso do baço nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles).....	28
Figura 12. Peso do baço nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles).....	28
Figura 13. Atividade de etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD) na fração microsomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles).....	30

Figura 14. Atividade de etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles).....	30
Figura 15. Atividade de benziloxiresorufina- <i>O</i> -desbenzilase (BROD) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles).....	31
Figura 16. Atividade de benziloxiresorufina- <i>O</i> -desbenzilase (BROD) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). ....	31
Figura 17. Atividade de p-nitrofenol hidroxilase (PNP hidroxilase) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles).....	33
Figura 18. Atividade de p-nitrofenol hidroxilase (PNP hidroxilase) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles).....	33
Figura 19. Variação de peso corporal 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 0127:B8) ou solução salina apirogênica (controles). ....	35
Figura 20. Variação de peso corporal 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 055:B5) ou solução salina apirogênica (controles).....	35
Figura 21. Valores absolutos do peso hepático 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 0127:B8) ou solução salina apirogênica (controles). ....	36
Figura 23. Valores absolutos do peso esplênico 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 0127:B8) ou solução salina apirogênica (controles). ....	37
Figura 24. Valores absolutos do peso esplênico 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 055:B5) ou solução salina apirogênica (controles).....	37
Figura 25. Atividade da etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD) na fração microsossomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (0127:B8) nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, ou solução salina apirogênica (controles). ....	38
Figura 26. Atividade da benziloxiresorufina- <i>O</i> -desbenzilase (EROD) na fração microsossomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (0127:B8) nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles)..	39
Figura 27. Atividade da etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD) na fração microsossomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles). ....	41

Figura 28. Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) na fração microsossomal hepática 7 dias após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles).. .....41

Figura 29. Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) na fração microsossomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles).....42

Figura 30. Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) na fração microsossomal hepática 7 dias após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles).....42



## Lista de Siglas e Abreviaturas

$\Delta$ p: diferença de peso  
 $\mu$ l: microlitros  
 $\mu$ M: micromolar  
ADP: Adenosina di-fosfato  
*B.pertussis*: *Bordetella pertussis*  
BROD: Benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase  
BSA: Albumina Sérica Bovina  
CECAL: Centro de Criação de Animais de Laboratório  
CYP: Citocromos P450  
DMSO: Dimetil Sulfóxido  
DNA: Ácido Desoxirribonucléico  
DO: Densidade Óptica  
DTP: vacina antidiftérica, antitetânica antipertussis  
*E.coli*: *Escherichia coli*  
*e.g.*: Por exemplo (*exempli gratia*)  
EDTA: Edetado Dissódico de Cálcio  
EROD: Etoxiresorufina-*O*-desetilase  
*et al.*: e colaboradores (*et alii*)  
HCl: Ácido Clorídrico  
HSF: *histamine sensitizing factor*  
*i.e.*: isto é (*id est*)  
IAP: *islet activating protein*  
*ip*: Intraperitoneal  
kD: kilo Dalton  
kg: quilograma  
LAL: *Limulus Amoebocyte Lysate*  
LOS: lipo-oligossacarídeo  
LPS: Lipopolissacarídeo  
mg: miligrama  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
ml: mililitro  
mM: milimolar  
NaCl: Cloreto de Sódio  
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida  
NaOH: Hidróxido de Sódio  
NDMA: N-nitrodimetilamina  
ng: nanograma  
NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control  
NO: Oxido Nítrico  
NOS-2, iNOS ou NOS: Oxido nítrico sintase induzível  
pmol: picomoles  
PNP: p-nitrofenol  
RNA<sub>m</sub>: Ácido Ribonucléico Mensageiro  
UE: Unidade de Endotoxina  
UI: Unidade Internacional  
Uop: Unidades opacimétricas

# SUMÁRIO

<i>Lista de tabelas e figuras</i> .....	<i>vi</i>
<i>Lista de Siglas e Abreviaturas</i> .....	<i>ix</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>xii</i>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Coqueluche</i> .....	1
1.1.1 <i>Transmissão</i> .....	1
1.1.2 <i>Manifestações Clínicas</i> .....	1
1.1.3 <i>Tratamento e prevenção</i> .....	2
1.2 <i>Vacina pertussis</i> .....	3
1.2.1 <i>Toxina pertussis</i> .....	4
1.2.3 <i>Lipopolissacarídeo</i> .....	5
1.3 <i>Citocromos P450</i> .....	6
1.3.1 <i>Características Gerais</i> .....	6
1.3.2 <i>Estrutura Básica</i> .....	7
1.3.3 <i>Mecanismo de catálise das enzimas citocromo P450</i> .....	8
1.3.4 <i>Nomenclatura</i> .....	9
1.3.5 <i>Famílias gênicas citocromo P450</i> .....	10
1.3.6 <i>Localização dos citocromos P450</i> .....	12
1.4 <i>Alterações dos Citocromos P450 na Infecção e Inflamação</i> .....	12
1.5 <i>Objetivos</i> .....	14
2- <i>Materiais e Métodos</i> .....	15
2.1 <i>Animais</i> .....	15
2.2 <i>Grupos experimentais</i> .....	15
2.3 <i>Vacina pertussis e lipopolissacarídeos (LPS) de E.coli</i> .....	15
2.4 <i>Tratamento</i> .....	16
2.5 <i>Eutanásia dos animais e armazenamento dos órgãos</i> .....	16
2.6 <i>Preparação da fração microssomal hepática</i> .....	16
2.7 <i>Determinação da concentração de proteínas na fração microssomal</i> .....	17
2.8 <i>Determinação da atividade das Resorufina-O-desalquilases: Etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e Benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)</i> . .....	18
2.9 <i>Determinação da atividade P-nitrofenol hidroxilase</i> .....	19
2.10 <i>Quantificação de Endotoxina na vacina pertussis</i> .....	20

2.11 Ensaio <i>in vitro</i> da potência da vacina pertussis: Clustering em cultura de células de ovário de hamster chinês.....	21
2.12 Análise estatística .....	22
<b>3 - Resultados</b> .....	23
3.1 Quantificação dos níveis de endotoxina na vacina pertussis analisada.....	23
3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de potência da vacina pertussis (‘clustering’ em cultura de células de ovário de hamster chinês) .....	24
3.3 Sinais de toxicidade, alterações do peso corporal, e do fígado e baço após a administração de dose única da vacina pertussis.....	24
3.4 Curso temporal das modificações de atividade de monooxigenases hepáticas após a administração intraperitoneal de uma única dose da vacina pertussis .....	29
3.4.1 Determinação da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD).....	29
3.4.2 Determinação da atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)..	29
3.4.3 Determinação da atividade da p-nitrofenol hidroxilase (PNP hidroxilase) ....	32
3.6 Modificações da atividade de monooxigenases hepáticas após a administração intraperitoneal de uma única dose de lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Escherichia coli</i> (sorotipo: 0127:B8) em camundongos C57Bl6 fêmeas. ....	38
3.6.1 Determinação da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD).....	38
3.6.2 Determinação da atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)..	39
3.7 Modificações da atividade de monooxigenases hepáticas após a administração intraperitoneal de uma única dose de lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Escherischia coli</i> (sorotipo: 055:B5) em camundongos C57Bl6 fêmeas. ....	40
3.7.1 Determinação da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD).....	40
3.7.2 Determinação da atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)..	40
<b>4-Discussão</b> .....	43
4.1 CYPs e atividades de monnoxigenases no fígado de camundongos. ....	43
4.2 Sinais de toxicidade e alterações dos pesos corporal, hepático e esplênico após a administração de dose única da vacina pertussis ou de LPS de <i>E.coli</i> . ....	44
4.3 Dose da vacina pertussis utilizada para o estudo das alterações das atividades de CYPs nos camundongos .....	45
4.4 Comparação das alterações de CYPs evidenciadas nos camundongos tratados com a vacina pertussis com aquelas vistas naqueles que receberam o LPS de <i>E.coli</i> . ....	46
<b>5 - Conclusões</b> .....	50
<b>6 - Referências</b> .....	52

## Resumo

No homem e em animais de laboratório, tem sido observado que infecções e estímulos inflamatórios podem causar alterações na cinética de fármacos e, em alguns casos, levar ao aparecimento de efeitos adversos (Morgan, 2000). A teofilina, por exemplo, atinge concentrações plasmáticas muito mais elevadas quando administrada a crianças asmáticas infectadas com vírus influenza ou vacinadas contra o mesmo. (Morgan, 2000; Ansher, 1991).

Os fármacos são, em sua grande maioria, biotransformados por vias metabólicas hepáticas, entre as quais destacam-se as enzimas microsossomais, citocromos P450 (monooxigenases) (Ingelman-Sundberg et al, 2000).

Os genes das enzimas citocromo P450 parecem ser modulados de forma diferenciada pela inflamação e infecções. Alguns estudos *in vivo* mostraram, em modelos de infecção/inflamação em ratos, que diversas P450 expressos de forma constitutiva sofrem uma diminuição da expressão no fígado. (Morgan, 1997). Aparentemente os efeitos da inflamação ou da infecção na expressão e atividade de citocromos P450 são seletivos em relação às enzimas e dependentes da natureza do estímulo inflamatório.

Podem ser encontrados na literatura vários trabalhos relatando uma inibição no metabolismo hepático de fármacos após a administração de vacinas e agentes indutores de interferon em animais e humanos. Ainda não são bem conhecidos, os mecanismos envolvidos nessa inibição e a relação desse fenômeno com efeitos adversos ocorridos após a imunização (Ansher S,1991).

Neste trabalho investigamos os efeitos dos da vacina pertussis sobre a atividade de monooxigenases hepáticas em camundongos C57BL6, machos e fêmeas, ao longo de 3 semanas que se seguiram ao tratamento e comparamos também os efeitos da vacina pertussis com os da endotoxina da bactéria *E.coli* na modulação das CYPs hepáticas.

Após o tratamento por via intraperitoneal com a vacina pertussis (1, 2, 5, 7, 14 e 21 dias após a administração) ou com o LPS de *E.coli* (1 e 7 dias após a administração), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sendo o fígado imediatamente retirado e a fração microsossomal preparada por homogeneização e duas ultracentrifugações (100.000 g por 60 minutos) sucessivas. As atividades de reações marcadoras de isoenzimas CYP<sub>s</sub> - das subfamílias 1A (EROD), 2B (BROD) e 2E (PNP hidroxilase) – foram medidas nos microsossomos hepáticos de camundongos machos e fêmeas tratados com a vacina, com o LPS de *E.coli*, ou com seus respectivos controles.

Os resultados mostraram que a vacina pertussis causou acentuada depressão das atividades de monooxigenases hepáticas (EROD, BROD e PNP hidroxilase) 24 horas após o tratamento. Nos dias subsequentes houve uma recuperação parcial que foi no entanto seguida de nova queda da atividade que atingiu os níveis mais baixos por volta do 7º dia após a injeção, permanecendo deprimida em relação aos controles pelo menos até o 21º dia pós-administração. As fêmeas foram mais susceptíveis aos efeitos inibitórios da vacina sobre as atividades das monooxigenases. A diferença entre o curso temporal da inibição observada nos animais tratados com a vacina pertussis e com o LPS de *E.coli*, sugere que a modulação da atividade de CYPs pela vacina pertussis, na sua fase inicial, seria mediada pela endotoxina nela contida (resposta rápida, 24 – 48 horas), resultando porem a depressão posterior (resposta máxima aos 7 dias) de efeitos da toxina pertussis.

# 1- Introdução

## 1.1 Coqueluche

A coqueluche é uma doença infecciosa de evolução aguda causada pela bactéria gram-negativa *Bordetella pertussis* (figura 1). No mundo, ocorrem anualmente cerca de 50 milhões de casos e 300 mil óbitos devidos a coqueluche que é, entre as doenças imunopreveníveis, a terceira em termos de causa de morte. As crianças são as principais vítimas da doença atingindo na população infantil uma taxa de letalidade de aproximadamente 4% (Luz et al., 2003).

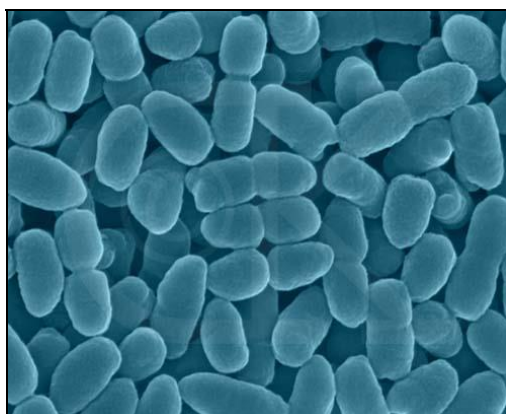


Figura 1. Bactéria *Bordetella pertussis* (Fonte: Universidade de Southern Illinois, 2005 <http://www.siu.edu/~cbwilso/250graphics00.htm>)

### 1.1.1 Transmissão

A transmissão da coqueluche ocorre, em grande parte, pela via respiratória a partir de indivíduos portadores assintomáticos ou com a doença no estágio inicial. Nessa fase da doença muitos microorganismos são liberados na forma de aerossóis nos perdigotos (Brooks et al., 2000). A *B.pertussis* possui afinidade pela mucosa do trato respiratório humano, onde se multiplica rapidamente e interfere com a movimentação ciliar.

### 1.1.2 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da doença começam via de regra após 2 semanas de incubação, com tosse leves e espirros, caracterizando o estágio catarral. Cerca de 10 dias após esta fase, a doença progride para o “estágio paroxístico” que pode durar de 1 a 4 semanas. Nesta fase a tosse tem caráter explosivo, devido a liberação de toxinas e outras substâncias que irritam as células superficiais da traquéia e dos brônquios, sendo

acompanhada de um característico “chiado” na inspiração, e pode evoluir para uma rápida exaustão do paciente, que tem vômitos, cianose e convulsões. A convalescença é lenta podendo prolongar-se por 6 meses. Em alguns casos, pode ocorrer encefalite após o quadro respiratório inicial. (Brooks et al.,2000; Scarlato et al., 1998).

### 1.1.3 Tratamento e prevenção

Vários antibióticos são eficazes contra a *B.pertussis in vitro*. A eritromicina administrada na fase catarral da doença elimina os microorganismos e acredita-se que tenha também valor profilático. No “estágio paroxístico”, entretanto, a erradicação da bactéria não altera de forma significativa o quadro clínico (Brooks et al.,2000; WHO,1993).

A vacinação é a principal forma de prevenção e controle da coqueluche. Aproximadamente 80% das crianças do mundo são vacinadas contra a *B.pertussis* (figura 2) (WHO,1993).

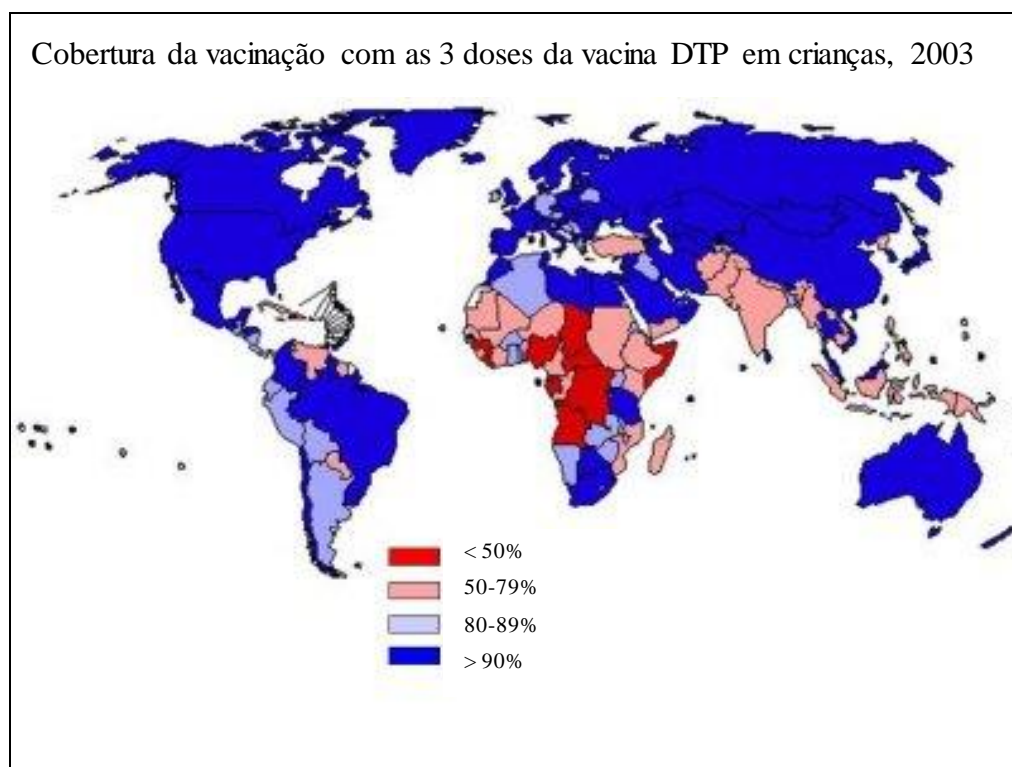


Figura 2. Cobertura da vacinação com as 3 doses da vacina DTP em crianças no ano de 2003 no mundo (Fonte: WHO-UNICEF; <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/dtp3.htm>, acessado em 19/02/05)

Durante o primeiro ano de vida os lactentes devem receber três injeções de vacina contra coqueluche. Geralmente a vacina pertussis é administrada em combinação com os toxóides diftéricos e tetânicos (vacina DTP). Alguns efeitos adversos são observados em crianças imunizadas pela DTP, tais como febre, vermelhidão local, inchaço, vômitos, e em casos mais graves convulsões, danos neurológicos e até mesmo morte (Ansher et al.,1993; Brooks et al.,2000).

## 1.2 Vacina pertussis

O desenvolvimento de vacinas contra a infecção por *Bordetella pertussis* teve início quando essa bactéria foi isolada pela primeira vez, há quase 100 anos (Corbel & Xing, 2004). Por várias décadas, vacinas de células inteiras mortas de *Bordetella pertussis* (vacinas celulares) foram utilizadas nos programas nacionais de vacinação infantil, reduzindo drasticamente o impacto da coqueluche em termos da saúde pública. Entretanto, ainda não está bem esclarecido como esse tipo de vacina confere imunidade. Essas vacinas celulares são atualmente produzidas em mais de 40 países incluindo o Brasil (WHO,1999; Xing & Corbel 2000).

Devido a vários relatos de efeitos adversos em crianças imunizadas com as vacinas celulares, tais como febre, vermelhidão e inchaço local, vômito e, mais raramente, convulsões, danos neurológicos e morte, vacinas acelulares foram desenvolvidas, contendo diferentes quantidades de toxóide pertussis (toxina pertussis modificada para diminuir a toxicidade mantendo sua capacidade imunogênica), hemaglutinina filamentosa, aglutinogênios e proteína 69Kd; com o objetivo de remover componentes mais tóxicos e que não apresentam ação protetora, entre os quais se destaca o lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular (WHO,1993; Ansher et al,1993).

A vacina pertussis celular é formada por uma suspensão homogênea de células inteiras mortas de uma ou mais cepas de *Bordetella pertussis* em solução fisiológica (Farmacopéia brasileira, 1999). Os principais antígenos da vacina são: Toxina pertussis (0,02-0,68 µg/dose), toxina adenilil-ciclase, lipopolisacarídeo (LPS) (0,9-2,8 µg/mL), hemaglutinina filamentosa(0-1,6 µg/dose) e aglutinogêneos (WHO,1993). A vacina pertussis geralmente é administrada em combinação com a anatoxina diftérica e tetânica (vacina DTP), mostrando uma eficiência de 80% na imunização das crianças (WHO,1999).

Há alguns trabalhos na literatura mostrando que adjuvantes derivados de alumínio, conservantes usados na vacina, toxóides diftéricos e tetânicos, hemaglutinina filamentosa, fímbrias e pertactina não alteram o metabolismo hepático de fármacos;

enquanto o LPS e a toxina pertussis parecem contribuir para a inibição das atividades das monooxigenases hepáticas (Ansher et al,1992; Ansher., 1993).

### 1.2.1 Toxina pertussis

A toxina pertussis, também conhecida por: *lymphocyte promoting fator* (LPF), *histamine sensitizing factor* (HSF) e *islet activating protein* (IAP), é uma ADP-ribosil transferase cujo substrato específico é uma seqüência presente nas proteínas-G que estão envolvidas em processos de sinalização intracelular. Sua estrutura é formada por 2 subunidades principais; uma com atividade enzimática (subunidade A ou S1) e outra, formada pelo oligômero B, composto das proteínas S2, S3, S5 e duas S4, que se liga ao receptor das células alvo (WHO,1993; Corbel & Xing, 2004).

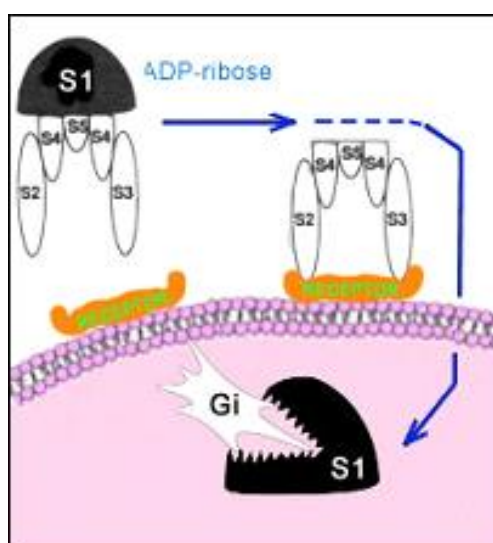


Figura 3. Representação esquemática da interação da toxina pertussis com a proteína G envolvida em processos de sinalização intracelular.

Entre as alterações fisiológicas desencadeadas pela toxina pertussis incluem-se: a indução da produção de anticorpos (responsável pela imunidade prolongada), o aumento da secreção de insulina, o bloqueio  $\beta$ -adrenérgico, a sensibilização à histamina, a linfocitose, a mitogênese, a estimulação de melanócitos e de linfócitos T e B, a inibição da quimiotaxia de neutrófilos e da migração de monócitos (Corbel & Xing, 2004).



### 1.2.3 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) das paredes celulares das bactérias gram-negativas é um lipídeo complexo, denominado lipídeo A, que está ligado a um polissacarídeo constituído de um cerne e de uma série terminal de unidades repetidas. No caso da *B.pertussis*, alguns autores preferem usar o termo lipo-oligossacarídeo (LOS), porque os glicolipídeos da membrana externa dessa bactéria são relativamente curtos em comparação com os de outras bactérias. (Brooks, 2000; Corbel & Xing, 2004).

Dois tipos de LOS são produzidos pela *B.pertussis*, o Tipo A que é composto do lipídeo A, um cerne de oligossacarídeo e um trissacarídeo formado por N-acetil glicosamina-2,3-dideoxi-2,3-di-N-ácido acetilmanosaminúrico e N-acetil-N-metilfucosamina (figura 4), e o tipo B que apresenta o lipídeo A e somente o cerne de oligossacarídeo (Corbel & Xing, 2004).

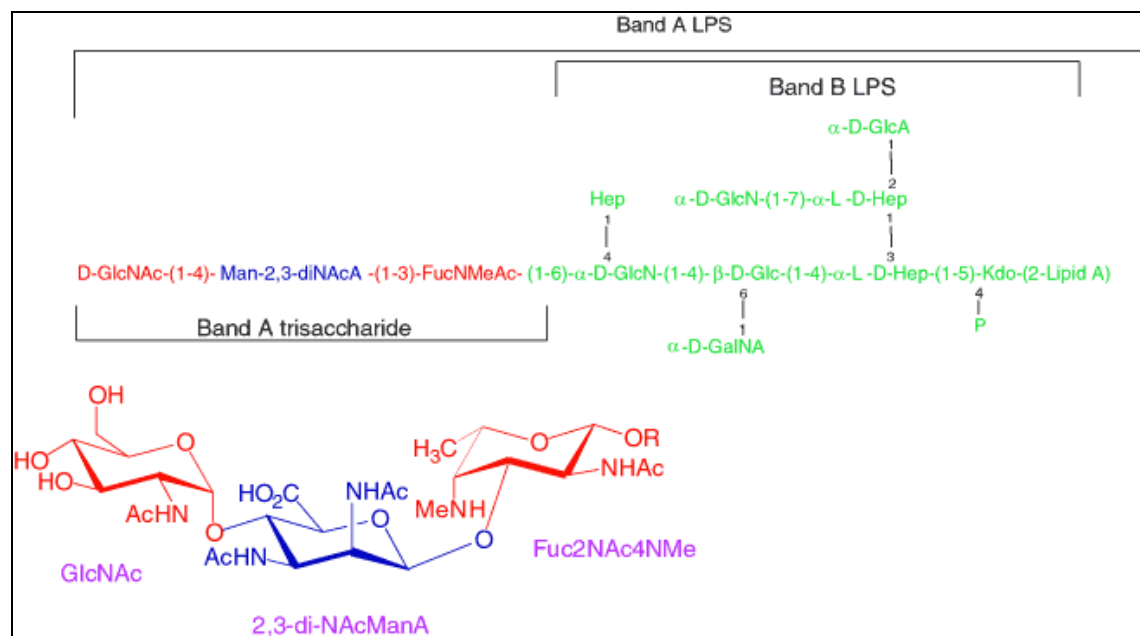


Figura 4. Esquema da estrutura química do LPS de *Bordetella pertussis* ( adaptado de esquema mostrado em documento da University of East Anglia, [http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/posters/poster02/Kannan\\_poster.htm](http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/posters/poster02/Kannan_poster.htm) )

Como mencionamos anteriormente, o LPS contido na vacina celular é responsável por alguns dos efeitos adversos observados em crianças imunizadas contra a coqueluche. Apesar de antigênico, o LPS não confere proteção e a quantidade presente na vacina celular tem mostrado uma associação positiva, estatisticamente significativa, com a frequência de febre após a vacinação (WHO,1993)

## 1.3 Citocromos P450

### 1.3.1 Características Gerais

Os citocromos P450 (CYP450) são enzimas envolvidas na metabolização de uma ampla variedade de substâncias químicas estranhas ao organismo (xenobióticos) e, também, na síntese e degradação de substâncias endógenas (endobióticos). Estas proteínas são codificadas por uma extensa e complexa superfamília de genes. As proteínas citocromo P450 já foram encontradas na maioria dos organismos vivos, animais e vegetais, desde protistas até vertebrados incluindo o homem (Lewis, 1996). Em bactérias, essas proteínas têm aproximadamente 400 aminoácidos, enquanto em células eucarióticas possuem cerca de 500 aminoácidos (Nelson, 2002).

Essas enzimas participam da biotransformação de xenobióticos, processo enzimático que converte substâncias originalmente lipofílicas em metabólitos mais hidrofílicos (Sipes & Gandolfi, 1991). A biotransformação compreende reações de fase I (reações de oxidação, hidrólise ou redução), onde grupos funcionais são adicionados à molécula do xenobiótico, ou onde os grupos funcionais já presentes na molécula original são expostos, e reações de fase II (reações de conjugação a substratos endógenos ou síntese, envolvendo os grupos funcionais). O processo de biotransformação, além de aumentar a hidrofiliabilidade de algumas substâncias, leva à perda do potencial tóxico ou farmacológico e facilita a eliminação (desintoxicação). Em determinados casos, porém, a biotransformação converte certos xenobióticos originalmente pouco reativos em produtos mais reativos (*e.g.*, eletrofílicos) com maior potencial de ligação a macromoléculas (*e.g.*, DNA, proteínas) celulares. e, portanto, mais tóxicos (processo de ativação metabólica) (Parkinson, 2001). A ativação metabólica de pró-carcinógenos pode dar origem a metabólitos eletrofílicos que se ligam ao DNA, causando mutações que, uma vez "fixadas" pela célula podem iniciar o processo de carcinogênese (Omura, 1999). Os citocromos P450 podem ser considerados como um dos mais importantes sistemas enzimáticos envolvidos na catálise das reações de fase I do metabolismo.

Entre as reações catalisadas pelos citocromos P450 destaca-se a oxidação de moléculas lipofílicas sendo, também denominadas monooxigenases e oxidases de função mista. As monooxigenases podem catalisar um amplo espectro de reações tais como *N*-oxidação, sulfoxidação, epoxidação, *N*-, *S*-, e *O*-desalquilação, peroxidação, desaminação, dessulfuração e desalogenação (Nelson, 2002).

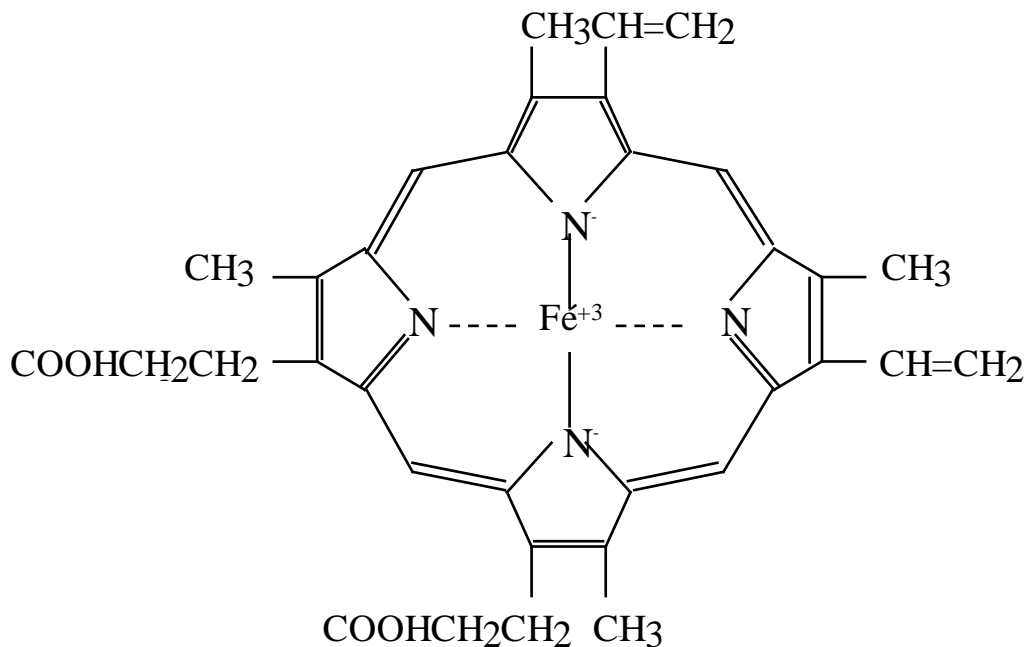
Além de participarem do metabolismo de xenobióticos, os citocromos P450 são essenciais para a homeostase sanguínea, biossíntese do colesterol e esteroidogênese (Nelson, 2002).

A atividade das monooxigenases em determinada espécie (e linhagem) depende do tecido/órgão analisado, do estado nutricional, da presença de doenças, da idade, do sexo, da exposição prévia a xenobióticos, da hora do dia e da época do ano (Radzialowski & Bousquet, 1967; Jori *et al.*, 1971; Hodgson & Levi, 1994; Kuriyama *et al.*, 2000). Diferenças entre espécies e polimorfismo genético entre indivíduos da mesma espécie também têm sido descritos como fatores determinantes de variações quanto ao metabolismo de xenobióticos (Conney, 1986; Fonne-Pfister & Meyer, 1988; Vesell, 1991; Cholerton *et al.*, 1992). Entretanto, um dos fatores que podem alterar de forma mais acentuada o metabolismo de xenobióticos é a indução ou a inibição de enzimas envolvidas nas reações de biotransformação, em decorrência da exposição prévia ou concomitante a outros agentes químicos (Gibson & Skett, 1994; Hodgson & Levi, 1994).

### *1.3.2 Estrutura Básica*

As enzimas citocromo P450 são hemoproteínas que contêm um citocromo do tipo b (Hodgson & Levi, 1994). Estas proteínas apresentam como grupo prostético, o heme ou ferro-protoporfirina IX.

No heme, o ferro é capaz de fazer 6 ligações. Quatro destas ligações são feitas com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos. A quinta ligação do átomo de ferro é com o tiolato (S-) proveniente do resíduo de cisteína, situado próximo à região C-terminal da cadeia polipeptídica única da apoproteína, composta de 400 a 500 aminoácidos. Graças a sua característica eletrofílica, o enxofre da cisteína faz com que o átomo de ferro mantenha-se, normalmente, no estado férrico ( $Fe^{+3}$ ) (Lewis, 1996). A existência do quinto ligante confere aos citocromos P450, quando reduzidos, uma grande afinidade pelo monóxido de carbono e um espectro característico de absorção máxima a 450 nm (Omura & Sato, 1962). O sexto ligante pode ser a água (CYP no estado férrico), o monóxido de carbono ou o oxigênio molecular (CYP no estado ferroso).

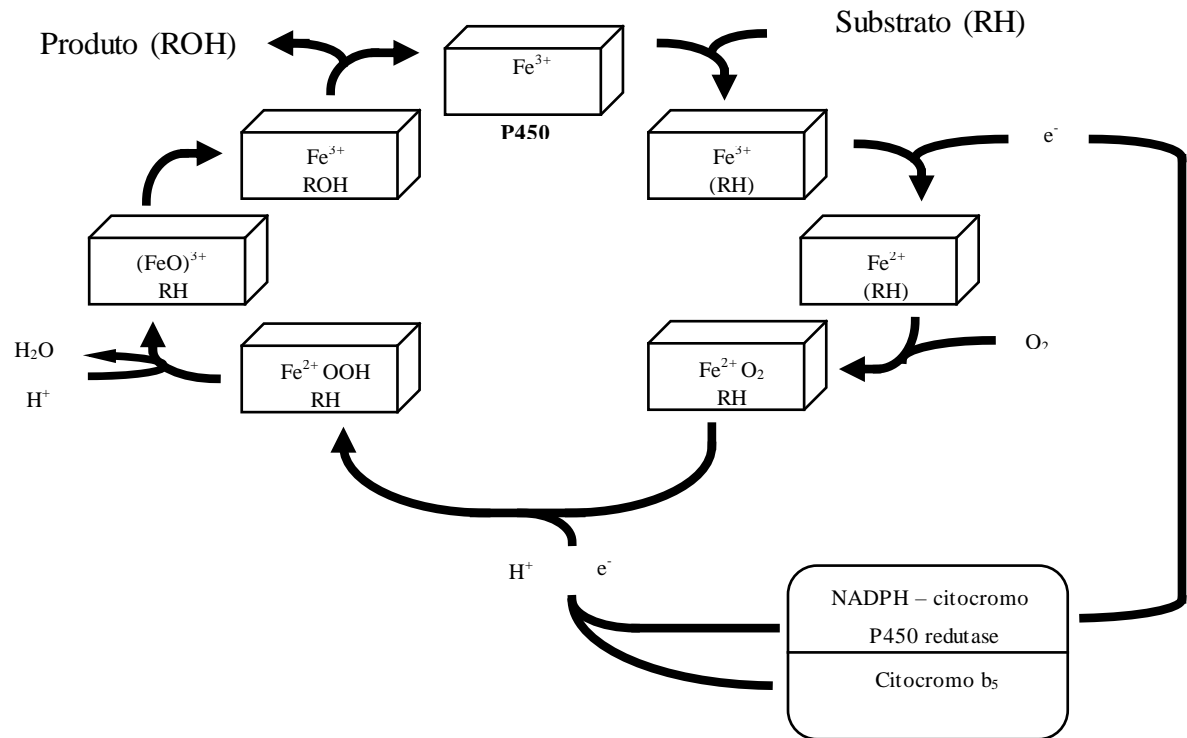


**Figura 5:** Estrutura do grupo prostético heme do citocromo P450 (adaptado de Gibson & Skett, 1994)

### 1.3.3 Mecanismo de catálise das enzimas citocromo P450

A reação básica catalisada pelo citocromo P450 é a monooxigenação, reação em que um átomo de oxigênio molecular é incorporado ao substrato (RH) e o outro é reduzido à água, sendo os elétrons necessários para redução fornecidos pelo NADPH (Parkinson, 2001).

Inicialmente, o complexo substrato-citocromo P450 é formado quando o substrato combina-se com a forma oxidada do citocromo P450 [ $\text{Fe}^{3+}$ ]. Este complexo recebe então um elétron do NADPH (através da NADPH-citocromo-P450-redutase), que reduz o ferro da sua forma férrica para a ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). A forma reduzida do complexo substrato-citocromo P450 combina-se com o  $\text{O}_2$  molecular e o novo complexo recebe um outro elétron do NADPH. Em alguns casos, esse segundo elétron é doado pelo NADH através do citocromo b5; mas em outros, apenas a NADPH-citocromo-P450-redutase desempenha esta função. Acredita-se que ambos os elétrons sejam transferidos para o oxigênio molecular, o que o transforma em uma espécie de oxigênio altamente reativo e instável. Um átomo de oxigênio reativo liga-se ao substrato e o outro forma uma molécula de água. O substrato oxidado resultante da reação dissocia-se da enzima, ocorrendo então a regeneração da forma oxidada (férrica) do citocromo P450 (Guengerich, 1990; Parkinson, 2001).



**Figura 6:** Ciclo catalítico do citocromo P450. (Adaptado de Parkinson, 2001).

#### 1.3.4 Nomenclatura

Como uma molécula (xenobiótico) pode ser substrato para diferentes citocromos P450, e uma determinada enzima aceita várias moléculas como substrato, torna-se difícil a identificação dessas enzimas pela reação que elas catalisam (Gonzalez, 1992). Assim, com o intuito de classificar adequadamente diferentes isoformas de CYP, um sistema de nomenclatura foi organizado, classificando as enzimas em famílias, subfamílias e membros (isoformas / isoenzimas) com, base nas seqüências homólogas de aminoácidos (Nelson *et al.*, 1993). Desse modo, os diferentes CYPs são classificados de acordo com a porcentagem de similaridade das seqüências de aminoácidos que compõem essas enzimas. Enzimas que apresentam pelo menos 10 % de homologia fazem parte da mesma superfamília CYP; com 40 % ou mais de homologia, são agrupadas em uma mesma família e são designadas por numerais arábicos, enquanto aquelas que possuem mais de 55 % de homologia são incluídas na mesma subfamília e são designadas por letras maiúsculas. As diferentes isoformas da enzima recebem números arábicos após a letra que identifica a subfamília (Gibson & Skett, 1994). Por exemplo, CYP1A1 é a isoenzima 1 da subfamília A da família 1. Em seres humanos já foram identificadas mais de 1200 seqüências de

citocromos P450 (Nelson, 2001). Os genes que codificam os citocromos P450 recebem a mesma denominação que a isoenzima sendo, porém, a representação feita em itálico, *e.g.*, *CYP1A1*.

### 1.3.5 Famílias gênicas citocromo P450

Em seres humanos já foram identificadas 18 famílias de genes citocromo P450 (*CYP*) e 43 subfamílias (Nelson, 2001). Os citocromos P450 das famílias 1, 2, 3 e 4 parecem ser os responsáveis pela maior parte das reações de biotransformação de xenobióticos (Halpert *et al.*, 1994; Pasanen, 1994).

#### *CYP1A*

A família CYP1 é composta por duas subfamílias, CYP1A e CYP1B. Os dois membros da subfamília CYP1A (CYP1A1 e CYP1A2) compartilham uma alta similaridade em suas estruturas primárias, bem como em suas características físico-químicas (Kawajiri & Hayashi, 1996). Em termos do metabolismo de endobióticos, CYP1A2 e CYP1B1 hidroxilam o estrogênio e CYP1A2 oxida o uroporfirinogênio à uroporfirina (metabolismo do heme). Ainda não são conhecidos outros substratos endógenos para enzimas da família CYP1 (Nelson, 2001).

As isoenzimas citocromo P450 1A1 e 1A2 (respectivamente, CYP1A1 e CYP1A2), da família 1, possuem um papel importante na ativação de xenobióticos a metabólitos tóxicos [carcinógenos químicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*e.g.*, benzo[*a*]pireno, encontrado na fumaça do cigarro e em alimentos queimados - literalmente carbonizados), aminas aromáticas e heterocíclicas, derivados do azobenzeno, aflatoxina B<sub>1</sub>, 2-acetilaminofluoreno], incluindo vários medicamentos (*e.g.*, acetaminofen). Altos níveis de CYP1A2 têm sido associados a um maior risco de câncer de cólon. Como esta isoenzima pode ser induzida pela fumaça do cigarro, e o tabagismo tem sido associado ao câncer de cólon, este pode ser um dos mecanismos pelos quais o tabaco aumenta o risco deste tipo de neoplasia. O gene *CYP1B1* também tem sido associado ao glaucoma congênito primário (Nelson, 2001).

As enzimas da família 1 podem ser encontradas em todas as classes do reino animal; no entanto, CYP1A1, à diferença de CYP1A2, não se expressa constitutivamente no fígado humano. No homem CYP1A1 está presente principalmente no pulmão e em outros tecidos extra-hepáticos.

### *CYP2B*

A família 2 é a maior família de CYPs em seres humanos. Aproximadamente um terço dos CYP humanos pertence a esta família. Muitas dessas proteínas podem hidroxilar esteróides e algumas delas são expressas de forma sexo-específica (Nelson, 2001). A subfamília 2B é geralmente reconhecida como sendo aquela à qual pertencem isoenzimas induzidas pelo fenobarbital. Entretanto, além da acentuada capacidade de indução da subfamília CYP2B, o fenobarbital, na maioria das espécies, induz também muitas outras enzimas (resposta pleiotrópica). A indução de CYP2B também é observada em ratos expostos a xenobióticos estruturalmente diferentes do fenobarbital. Estes xenobióticos incluem pesticidas halogenados (e.g. DDT), uma ampla variedade de agentes farmacêuticos, substâncias produzidas em plantas, hidrocarbonetos voláteis como cetonas, xilenos e piridina, e várias bifênicas polihalogenadas (Nims & Lubet, 1996).

A participação de CYP2B na ativação metabólica de xenobióticos e na carcinogênese química é de difícil avaliação. O bromobenzeno, o tetracloreto de carbono, a cocaína, o paration e o tricloroetileno, entretanto, são algumas das diferentes substâncias tóxicas ativadas, potencial ou preferencialmente, por enzimas da subfamília CYP2B (Nims & Lubet, 1996).

Outros substratos para CYP2B podem ser citados, tais como a fenitoína, a benzofetamina, a nicotina, o DDT, o aldrin, o endrin, o heptacloro e o clordano.

### *CYP2E1*

O citocromo P450 2E1 (CYP2E1) é uma isoforma constitutiva e induzível que pertence à família 2 da superfamília P450. Algumas condições fisiológicas (nascimento e jejum) e patológicas (obesidade e diabetes) estão associadas à indução de CYP2E1 (Chien *et al.*, 1997). Algumas substâncias de baixo peso molecular são substratos para reações de oxidação catalisadas por CYP2E1 e, muitos delas são pró-carcinógenos potentes que requerem ativação metabólica, como a *N*-nitrosodimetilamina (NDMA). Outras substâncias capazes de induzir CYP2E1 são a isoniazida, a piridina, o etanol, a acetona, o éter dietílico, o *m*-xileno e o pirazol. CYP2E1 parece exercer também um papel importante na doença hepática induzida pelo álcool.

Mutações de *CYP2E1* estão associadas a um aumento de duas vezes no risco de câncer de nasofaringe associado ao tabagismo (Nelson, 2001).

É alta a homologia entre as espécies no que tange a esta isoenzima, o que resulta em uma designação única CYP2E1 para as isoformas no rato, camundongo e seres humanos (Lewis, 1996).

### 1.3.6 Localização dos citocromos P450

Em mamíferos, as monooxigenases envolvidas na biotransformação de xenobióticos estão localizadas principalmente no fígado, mas também em sítios extra-hepáticos, tais como pulmões, rins, laringe, cérebro, glândulas supra-renais, pâncreas, baço, coração, testículos, ovários e placenta (Murray & Reidy, 1990; Degawa, 1994; Parkinson, 2001). Tecidos extra-hepáticos são limitados quanto à diversidade de substâncias químicas que podem metabolizar, contribuindo assim de forma limitada para o processo de biotransformação que ocorre no organismo como um todo. A biotransformação que ocorre em tecidos extra-hepáticos, entretanto, tem importante implicação toxicológica para o tecido em particular (Sipes & Gandolfi, 1991) e pode explicar, por exemplo, o organotropismo da ação tóxica de alguns xenobióticos.

Ao nível intracelular, as enzimas de fase I do metabolismo estão localizadas principalmente no retículo endoplasmático (Sipes & Gandolfi, 1991), mas também podem ser encontradas nas mitocôndrias e na membrana nuclear (Ioannides & Parke, 1990).

### 1.4 Alterações dos Citocromos P450 na Infecção e Inflamação

Tem sido observado, em seres humanos e em animais de laboratório, que infecções e estímulos inflamatórios causam alterações das atividades e dos níveis de expressão de várias isoformas de citocromos P450 (CYP) no fígado, rins e cérebro. Também tem sido constatada nessas condições a alteração da depuração (*clearance*) de fármacos que dependem do metabolismo hepático e da atividade dos CYP. Assim sendo, infecções e processos inflamatórios podem ser incluídos entre os fatores que modulam a atividade ou a expressão dos CYP e que podem afetar - favoravelmente ou negativamente - os efeitos terapêuticos e tóxicos dos fármacos. Digno de nota é o fato dos CYP catalisarem também a síntese e degradação de substâncias endógenas fisiologicamente ativas. Neste sentido, a modulação da formação destes metabólitos pela inflamação ou pela infecção poderia estar relacionada a mecanismos homeostáticos e fisiopatológicos envolvidos nestas condições (Morgan, 2000).

Os efeitos da inflamação e infecção sobre CYP estão relacionados à resposta imune celular. É conhecido que a ativação do sistema retículo endotelial em animais



de experimentação compromete o metabolismo de drogas *in vivo* e diminui a capacidade metabolizadora dos microssomos hepáticos. Tem sido relatado, por exemplo, que vários agentes que estimulam este sistema prolongam o tempo de sono barbitúrico em animais de laboratório (Morgan, 1997).

Em animais, infecções por vírus (Brattsten, 1987), bactérias (Batra, 1987; Azri, 1991) ou parasitas (Tekwani, 1990) tem sido associadas à diminuição da depuração (*clearance*) de drogas. Em modelos experimentais de inflamação e infecção, que estas condições patológicas aparentemente protegem os animais da toxicidade de agentes que necessitam de bioativação para exercerem os seus efeitos nocivos (Morgan, 1997).

Estas observações ressaltam a importância do estudo das alterações de expressão e das atividades das subfamílias de CYP envolvidas no metabolismo de drogas e na eliminação e ativação de substâncias tóxicas – incluindo os carcinógenos químicos - durante processos inflamatórios e infecciosos.

Algumas vacinas estão entre os estímulos do sistema imunológico que causam uma alteração no metabolismo de fármacos. Vários pesquisadores constataram uma inibição do metabolismo de fármacos após a administração de vacinas em humanos e animais, porém nem o mecanismo envolvido na inibição nem a relação desse fenômeno com os efeitos adversos observados após a imunização foram – até a presente data - devidamente esclarecidos (Morgan,1997; Ansher 1991;Williams & Szentivanyi,1977).

### *1.5 Objetivos*

O objetivo geral do estudo foi investigar as alterações das atividades de monooxigenases hepáticas causadas pela vacina pertussis. Este estudo é parte de um amplo esforço de pesquisa voltado para o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos subjacentes à modulação de enzimas de biotransformação de xenobióticos em processos infecciosos e estímulos inflamatórios.

O objetivo específico do trabalho apresentado nessa dissertação foi avaliar as atividades de reações de monooxigenação catalisadas por enzimas citocromo P450 das subfamílias 1A (EROD), 2B (BROD) e 2E (PNP hidroxilase) em microsossomos hepáticos de camundongos machos e fêmeas da linhagem C57/BL6.

## **2-Materiais e Métodos**

### *2.1 Animais*

Utilizamos camundongos da linhagem C57/BL6 (isogênicos), machos e fêmeas, oriundos da criação mantida pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

Assim que chegaram ao Laboratório de Toxicologia Ambiental, os animais foram alojados, em grupos de cinco do mesmo sexo, em gaiolas de plástico (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) com tampa de aço inoxidável e maravalha de pinho branco. Água da rede de abastecimento público e ração comercial para camundongos (*CR 1* Nuvilab - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) foram fornecidos *ad libitum* durante todo o experimento.

A higienização das gaiolas e troca das camas de maravalha foram feitas três vezes por semana (segunda, terça e sexta-feira) sempre no período da manhã. As condições ambientais em que os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Toxicologia Ambiental foram as seguintes: temperatura de  $23 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar em torno de 70 % e ciclo claro-escuro constante (período claro de 07 às 19 horas).

### *2.2 Grupos experimentais*

Após breve período de quarentena e adaptação ao Biotério de Experimentação os camundongos com idade entre 6 -10 semanas de vida e 20 - 30 gramas de peso corporal foram destinados ao acaso a um de dois grupos: Tratado e Controle. Cada um destes grupos foi subdividido em 6 sub-grupos de acordo com o dia do sacrifício após o tratamento. Cada sub-grupo foi constituído por 5 machos e 5 fêmeas.

Para os experimentos envolvendo endotoxina de *E.coli* foram utilizados somente camundongos fêmeas com a mesma idade dos animais tratados com a vacina pertussis e divididos em três grupos: tratados com solução salina apirogênica ou LPS de *E.coli* sorotipo 0127:B8 ou 055:B5. Cada grupo foi dividido em sub-grupos com 5 camundongos de acordo com a dose aplicada de endotoxina.

### *2.3 Vacina pertussis e lipopolissacarídeos (LPS) de E.coli*

A vacina pertussis é produzida no Brasil exclusivamente pelo Instituto Butantan e são avaliadas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). A vacina utilizada neste estudo foi cedida pelo INCQS e previamente ao tratamento a vacina foi diluída em solução salina apirogênica para a obtenção de 40 Uop/ml.

Foram utilizados dois sorotipos de LPS de *E.coli*: 055:B5 e 0127:B8 ambos produzidos pela Sigma Chemical Co., St Louis,MO. No momento do tratamento as endotoxinas foram diluídas em solução salina apirogênica em diversas concentrações.

#### *2.4 Tratamento*

Os animais do grupo tratado com a vacina pertussis receberam por via intraperitoneal 0,5 mL da vacina ( 40Uop/mL) (i.e. 20 Uop / camundongo) e foram sacrificados 1, 2, 5, 7, 14 e 21 dias após o tratamento. Os controles receberam apenas injeções intraperitoniais de 0,5 mL de solução salina apirogênica.

Os camundongos fêmeas tratados com LPS de *E.Coli* sorotipo 0127:B5 receberam via intraperitoneal doses de 1 ou 5 mg/kg de peso corporal e os que tratados com o LPS de sorotipo 055:B5 receberam doses de 1,10 e 100 mg/kg de peso corporal pela mesma via de administração que os demais grupos, assim como os respectivos grupos controles que receberam apenas 0,5 ml de solução salina.

#### *2.5 Eutanásia dos animais e armazenamento dos órgãos*

Nos dias 1, 2, 5, 7, 14 e 21 após a imunização, os animais foram mortos por deslocamento cervical. Imediatamente após o deslocamento cervical foi feita uma ampla incisão longitudinal e outra transversal na parede abdominal e sendo então rapidamente retirados o fígado, os rins e o baço. Em seguida, os órgãos foram resfriados em banho de gelo e pesados. Os fígados foram embalados individualmente em papel alumínio, rapidamente congelados em nitrogênio líquido, acondicionados em caixas especiais de papelão e armazenados no congelador a temperaturas ultra-baixas (- 80°C) até o momento da preparação da fração microsomal.

#### *2.6 Preparação da fração microsomal hepática*

A fração microsomal hepática foi preparada segundo descrito por Snell e Mullock (1987). Os fígados congelados, ainda embalados, foram colocados em placas de Petri e descongelados em banho de gelo. A partir deste momento, todo o procedimento ocorreu à temperaturas que não excederam 4°C. Os órgãos foram lavados em solução de sacarose 250 mM, o excesso de líquido foi removido com papel filtro, e transferidos para homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. A primeira homogeneização (1 parte do fígado: 4 partes de solução tampão tris-HCl 100 mM / KCl 150 mM, pH 7,4) foi feita através de movimentos ascendentes e descendentes do homogeneizador em relação ao pistilo de teflon, a uma velocidade angular de aproximadamente 1200 rpm. A partir

do momento em que foi constatada visualmente a completa homogeneização do tecido, foram realizados 10 ciclos adicionais de movimentos ascendentes e descendentes.

O homogeneizado obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 9000 g durante 30 minutos à 4 °C (Centrífuga refrigerada *Eppendorf*® 5804R). O sobrenadante foi novamente filtrado em gaze e submetido à ultracentrifugação a 100000 g durante 60 minutos à 4 °C (Ultracentrífuga *Hitachi*® Himac CP70MX).

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

O homogeneizado obtido foi novamente ultracentrifugado a 100000 g durante 60 minutos à 4 °C, sendo o sobrenadante desprezado. O *pellet* contendo a fração microssomal foi então resuspendido em solução tampão própria para congelamento (solução tampão fosfato de potássio 100 mM com 20% v/v de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4) e homogeneizado a 250 rpm. A fração microssomal assim obtida - volume final de 2 ml - foi dividida em alíquotas, transferida para tubos criogênicos Nunc® e armazenada em nitrogênio líquido.

### 2.7 Determinação da concentração de proteínas na fração microssomal

A concentração de proteínas na preparação microssomal foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford *et al.*, (1976), adaptado para microplacas, utilizando o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm (espectrofotômetro *Molecular Devices*® *Spectra max plus384*). Todas as leituras de DO foram realizadas em microplacas de plástico contendo 96 poços.

As curvas de calibração foram feitas com albumina sérica bovina – BSA Sigma Chemical Co - diluída em solução tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) com as seguintes concentrações de proteína (BSA): 280; 560; 840 e 1400 µg/ml. A curva foi feita como se segue: 250µL do corante Azul de Coomassie G-250 Sigma, foram adicionados aos poços da microplaca contendo 5 µL das diferentes concentrações de BSA. A formação do complexo proteína-corante é rápida e estável no período de 5 a 60 minutos. Assim, adotamos um intervalo constante de

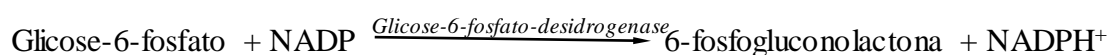
aproximadamente 30 minutos entre a adição do corante e a leitura da absorbância. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

Para a determinação da concentração de proteínas na fração microsomal, foram adicionados 250 µl do corante aos poços da microplaca contendo 5µl da preparação microsomal diluída (1:10 em solução tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) sendo todas as amostras quantificadas em triplicata. Cada valor de DO obtido foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão. Feitas as correções para cada fator de diluição, as concentrações de proteína na fração microsomal foram calculadas como a média obtida (média final) a partir das médias de cada triplicata e expressas como mg de proteína / ml de preparação microsomal.

### 2.8 Determinação da atividade das Resorufina-O-desalquilases: Etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e Benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD).

Uma série de éteres da fenoxazona (*e.g.*, etoxiresorufina) funcionam como substratos para reações de *O*-desalquilação mediadas por enzimas citocromo P450. Estes éteres da fenoxazona são substratos preferenciais para determinadas isoformas de citocromo P450 (*e.g.*, etoxiresorufina para o citocromo P450 da subfamília 1A e benziloxiresorufina para o citocromo P450 da subfamília 2B), mas o produto da reação de hidroxilação do anel de fenoxazona, comum a todas as reações, é a hidroxifenoxazona ou resorufina.

A determinação da atividade das resorufina-*O*-desalquilases na fração microsomal foi realizada essencialmente como descrito por Burke *et al.* (1985), exceto pela substituição do NADPH por um sistema regenerador de NADPH e pela adaptação do método para ser realizado em microplaca de plástico com 96 poços (Donato *et al.*,1993; Kennedy *et al.*,1993, Kennedy *et al.*,1994). O NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) é um co-fator fundamental para várias reações de biotransformação. O sistema regenerador de NADPH empregado envolve o uso da glicose-6-fosfato-desidrogenase e a seguinte reação:



A determinação das atividades de BROD e EROD na fração microsomal hepática foi realizada como descrita a seguir:

As reações de *O*-desalquilação ocorreram em microplacas de plástico de 96 poços e a leitura da fluorescência foi feita em espectrofluorímetro para leitura em

microplacas (Molecular Devices ® Spectra Max Gemini XS). O acúmulo de resorufina (excitação 530 nm , emissão 590 nm e precisão normal 6) foi registrado após o término da reação. A reação ocorreu a 37 °C em banho-maria Heto™ com agitação (80 movimentos / minuto) durante 10 minutos. O período de pré-incubação foi de 3 minutos e a reação era iniciada com o acréscimo do sistema regenerador de NADPH (Glicose-6-fosfato 5 mM; β-NADP 0,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; Glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U / ml).

Inicialmente foram adicionados a cada poço da microplaca mantida no gelo:

- solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, pH 7,8, em quantidade necessária para completar o volume final de 300 µL;
- 50 µL do substrato específico (benziloxiresorufina ou etoxiresorufina 30 µM em solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, pH 7,8 ), que atingiam a concentração final de 5 µM no poço;
- preparação microsomal para fornecer 25 µg de proteína diluídos em solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM, pH 7,8 ;

Após três minutos de pré-incubação a 37 °C, a reação enzimática era iniciada pela introdução do sistema regenerador de NADPH com o auxílio uma pipeta multicanal e, transcorridos 10 minutos, acetonitrila foi adicionada para interromper a reação. Posteriormente, a microplaca foi retirada do banho e mantida a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 minutos.

Os valores de fluorescência obtidos foram convertidos para quantidade de resorufina produzida através da curva padrão. A unidade escolhida para os cálculos de reação foi picomoles de resorufina produzida / minuto da reação / mg de proteína.

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

As curvas padrão foram construídas com diferentes quantidades de resorufina obtidas a partir da diluição de uma solução-mãe de resorufina 1 µM em tampão fosfato K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM pH 7,8 de modo a completar o volume final de 400 µl no poço.

### 2.9 Determinação da atividade *P*-nitrofenol hidroxilase

Para medir a atividade da *p*-nitrofenol hidroxilase empregamos o método espectrofotométrico descrito por Allis *et al.* (1994). O método é baseado no fato do produto formado, o 4-nitrocatecol, absorver a luz com 480nm de comprimento de onda, enquanto que o substrato da reação, o *p*-nitrofenol, praticamente não absorver a

luz em 480 nm ou em comprimentos de onda superiores a este. O ensaio cinético ocorre em tempo real em cubetas de plástico descartáveis a 37°C. Adicionamos inicialmente à cubeta 10µl de p-nitrofenol 10mM, 100µl de microsomo na concentração de 2mg/mL, e a solução tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM (pH 6,8) em volume suficiente para completar 1 mL (volume total) na cubeta. Em seguida, pré-incubamos a cubeta com seu conteúdo à 37°C, em banho Maria com agitação (80 movimentos/minuto), por 5 minutos. Transcorrido os 5 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada com adição do sistema regenerador de NADPH. Após 5 minutos adicionais de incubação, foi registrada a leitura da absorbância no espectrofotômetro, a 480nm, durante 10 minutos. Utilizamos o coeficiente de extinção do 4-nitrocatecol (3,57mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (Reinke & Moyer.,1985) para o cálculo da concentração do produto formado. Antes dos ensaios foi determinado o espectro de absorção do p-nitrofenol, em cubetas de quartzo usando uma solução de p-nitrofenol 0,1mM.

### 2.10 Quantificação de Endotoxina na vacina pertussis

O método do *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL), pela técnica do coágulo (teste semi-quantitativo), foi utilizado para a quantificação de endotoxinas na vacina pertussis. Este método, hoje amplamente utilizado, baseia-se numa reação em cascata de ativação de enzimas, em que a endotoxina ativa uma proenzima (coagulase), localizada nos grânulos dos amebócitos do caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*), responsável pela clivagem do coagulogênio. Os produtos insolúveis da clivagem se ligam por interação iônica para formar o coágulo (Levin, 1968).

Para a determinação dos níveis de endotoxinas, as amostras foram diluídas em água apirogênica nas seguintes proporções: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:20000, 1:40000, 1:80000, 1:160000, 1:320000, 1:640000 e 1:1280000 em tubos de borossilicato despirogenizados. Em seguida, 100µL de cada diluição foi adicionado a tubos contendo 100µL de LAL (previamente diluído), solubilizado por 60 segundos e incubado a 37°C em banho-maria sem agitação por uma hora. Para a leitura do teste, os tubos foram removidos do banho e submetidos a uma inversão de 180°. O teste foi considerado positivo quando um coágulo branco era formado e permanecia no fundo do tubo após a inversão, e o resultado negativo era caracterizado pela ausência do coágulo constatada após a inversão de 180° do tubo.

A validade do teste foi avaliada pela utilização de um grupo controle positivo e outro negativo. O controle positivo foi formado por tubos contendo LPS de *E. coli* e água apirogênica e o controle negativo continha apenas água apirogênica (ambos em



duplicata). Após a adição de LAL, os controles foram solubilizados por 60 segundos e mantidos em banho-maria a 37°C por uma hora.

A concentração de endotoxina foi calculada multiplicando o valor de sensibilidade do LAL ( $\lambda = 0,125$ ) pelo fator de diluição da maior diluição em que foi observada a formação do coágulo.

### *2.11 Ensaio in vitro de toxicidade específica da vacina pertussis: Clustering em cultura de células de ovário de hamster chinês.*

Para avaliarmos o conteúdo de toxina pertussis na vacina usada nesse estudo foi realizado o teste *in vitro* de *clustering* em células de hamster chinês (CHO- K1-ATCC) cultivadas em microplacas com 96 poços. O ensaio se baseia na aglomeração de células de ovário de hamster chinês em forma de cacho de uva (*clustering*) induzido pela presença da toxina pertussis ativa na cultura (Hewlett et al.,1983). Este teste foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) da Inglaterra.

Inicialmente a amostra da vacina pertussis, e a vacina DTP celular usada como controle positivo, foram diluídas nas proporções 1:50 e 1:10, respectivamente, em PBS. Como preparação de referência foi utilizada toxina pertussis NIBSC 90/518 (128 ng/mL).

Em seguida 20  $\mu$ L de meio de cultura MEM completo (MEM suplementado com soro fetal bovino 10% p/v, sulfato de estreptomicina 100  $\mu$ g/mL, penicilina G potássica 100 UI/mL e L-glutamina 2mM), foram adicionados a cada um dos poços. Na primeira coluna da microplaca, amostras diluídas da vacina pertussis foram adicionadas em quadruplicata, enquanto a vacina DTP celular e a preparação de referência, foram adicionadas em duplicata. A partir da segunda coluna, as amostras foram diluídas na proporção 1:2, de forma seriada, na microplaca totalizando 11 diluições. A última coluna de cada microplaca foi utilizada como controle negativo, contendo somente MEM completo. Posteriormente,  $5 \times 10^3$  células de ovário de hamster chinês, em 180  $\mu$ L de meio MEM, foram adicionados a cada um dos poços. As microplacas foram em seguida incubadas durante 48 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação por 48 horas, o meio de cultura foi removido e as células fixadas pela adição de formaldeído a 10% por 15 minutos. O formaldeído foi removido e a placa foi lavada durante 5 minutos em água corrente e, em seguida, adicionou-se

solução etanólica de cristal violeta 3% p/v em formaldeído. Após nova incubação por 15 minutos, as microplacas foram enxaguadas várias vezes em água corrente e secas à temperatura ambiente por 18 horas. Após a secagem, as microplacas foram examinadas ao microscópio invertido quanto à ocorrência do efeito de formação de cachos.

O conteúdo de toxina pertussis encontrado na amostra da vacina usada nesse estudo foi calculada multiplicando-se o recíproco do fator da maior diluição das amostras, no qual se observa total aglomeração das células, pelo título de referência (ng/mL) e pelo fator de diluição inicial das vacinas e expresso como ng/mL.

O título de referência em ng/mL foi calculado multiplicando-se a concentração de partida da toxina pertussis (128ng/mL) pelo fator da maior diluição na qual se observou a total aglomeração de células.

### *2.12 Análise estatística*

A comparação estatística entre médias de dois grupos foi realizada pelo teste *t* de *Student* para amostras independentes. Em todos os casos, o teste foi bidirecional e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa estatístico SPSS®.

### 3 - Resultados

#### 3.1 Quantificação dos níveis de endotoxina na vacina pertussis analisada

Para determinação dos níveis de endotoxina na vacina pertussis que analisamos neste trabalho empregamos o ensaio semi-quantitativo conhecido como *Limulus amoebocyte lysate* (LAL). Os resultados obtidos com as diluições seriadas da vacina pertussis são apresentados na Tabela 1, na qual os sinais positivos (+) indicam a formação do coágulo deflagrada pela presença de endotoxina, e os sinais negativos (-) a ausência deste coágulo.

Como representado na Tabela 1, a vacina pertussis utilizada desencadeou a formação do coágulo até em diluições da ordem de 1: 640000 o que indica que continha alta concentração de endotoxina originária da bactéria *Bordetella pertussis* . Estes resultados, em termos quantitativos, correspondem a níveis de endotoxina situados entre 80.000 e 160.000 unidades de endotoxina por mL (UE/ml) na vacina pertussis (200 Uop/ml). Para fins de comparação com outras vacinas, vale a pena mencionar que alguns estudos tem detectado concentrações da ordem de 10.000 UE/mL (i.e. 1,6 a 3,2 vezes menores) na vacina DTP (Ansher,1993).

Tabela 1: Níveis de endotoxina da vacina analisada neste trabalho determinados pelo ensaio semi-quantitativo do LAL . Estão representadas na tabela as diluições seriadas da vacina e a presença (+) ou ausência (-) do coágulo. A sensibilidade do teste foi de 0,125 UE/ml.

	Diluições seriadas da vacina					
Tubos	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:20000	1:40000
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
	Diluições seriadas da vacina					
Tubos	1:80000	1:160000	1:320000	1:640000	1:1280000	
1	+	+	+	+	-	
2	+	+	+	+	-	

Concentração de endotoxina na vacina testada de acordo com o resultado do ensaio LAL: >80000 e <160000 UE/mL

### 3.2 Ensaio *in vitro* de potência da vacina pertussis (‘clustering’ em cultura de células de ovário de hamster chinês)

O resultado do ensaio *in vitro* de *clustering* em cultura de células de ovário de hamster chinês revelou que, numa ordem decrescente de concentrações, houve aglomeração total de células até a diluição de 1:800. O título de referência calculado foi de 1,5ng/mL, correspondendo portanto à concentração de 1200ng de toxina pertussis por mL da vacina utilizada neste estudo. O ensaio foi válido, pois não foi observado efeito de *clustering* nas células expostas aos controles negativos e, por outro lado, a vacina DTP usada como controle positivo apresentou concentração de toxina pertussis acima de 1000ng/0,5mL (4800ng/mL).

### 3.3 Sinais de toxicidade, alterações do peso corporal, e do fígado e baço após a administração de dose única da vacina pertussis.

O peso corporal de cada camundongo foi registrado imediatamente antes do tratamento e, a partir de então, diariamente até o dia em que foram mortos. Nas Figuras 7 e 8 apresentamos as variações de peso corporal ( $\Delta p$ ) após o tratamento, ou seja as diferenças entre o peso no dia em que os camundongos foram sacrificados para retirada do fígado e o peso inicial (pré-tratamento), respectivamente para machos e fêmeas.

Como pode ser visto na figura 7, os camundongos machos do grupo controle (tratados com salina apirogênica) ou não tiveram alterações de peso corporal ou apresentaram pequeno aumento de peso nos diferentes intervalos pós-tratamento, enquanto os animais tratados com a vacina pertussis exibiram perda expressiva de peso detectada 24 horas após a injeção ( $\Delta p = - 2,16$  gramas). A partir de então parece haver uma gradual recuperação do peso corporal, que iguala o peso pré-tratamento por volta de uma semana após a injeção. A variação de peso corporal dos machos – em relação ao peso pré-tratamento - tornou-se positiva nos dias 14 e 21, mas o ganho (variação positiva) foi menor do que a observada nos respectivos controles, sendo o ganho de peso dos animais mortos no dia 21 21,36% do registrado entre os respectivos controles (Figura 7).

As fêmeas do grupo controle também exibiram discreto ganho de peso corporal no período pós-tratamento, sendo, porém esta variação ponderal menor do que a observada entre os machos controles. Este comportamento diferente entre sexos, notado entre camundongos controles, indica que enquanto as fêmeas C57Bl6 dessa faixa etária tendem a estabilidade, os machos ainda estão em fase de crescimento e ganho ponderal. Após o tratamento com a mesma dose da vacina pertussis

administrada aos machos, as fêmeas mostraram uma progressiva redução do peso corporal até o quinto dia após o tratamento (maior perda em relação ao peso pré-tratamento:  $\Delta p = - 2,934$  gramas). A partir de então houve uma clara recuperação ponderal das fêmeas tratadas que, no dia 21 pós-tratamento igualaram o ganho de peso (positivo) das fêmeas do respectivo grupo controle. (Figura 8)

Nas Figuras 9 e 10 são mostrados, em diferentes intervalos pós-tratamento, os pesos absolutos dos fígados de camundongos machos e fêmeas, respectivamente. Como pode ser visto na Figura 9, entre os camundongos machos houve uma pequena redução de peso do fígado 24 horas após a administração da vacina pertussis (36,7% de redução em relação ao controle). Em seguida, nos dias 2, 5 e 7 após o tratamento, não constatamos diferenças de peso hepático entre camundongos machos controles e tratados, mas nos animais mortos 14 e 21 dias após receberem a vacina pertussis, os pesos dos fígados dos tratados foram, respectivamente, 1,42 e 1,34 vezes maiores do que aqueles registrados nos controles. Esses dados indicam que, nos camundongos machos, a vacina pertussis causou a curto prazo (24 horas) uma transitória diminuição de peso do fígado a que se seguiu, com uma latência de 2 a 3 semanas, uma discreta hepatomegalia (Figura 9).

As alterações de peso do fígado em consequência do tratamento de camundongos fêmeas com dose única da vacina pertussis seguiram em linhas gerais o padrão observado em machos, mas, aparentemente, a redução de peso do órgão 24 horas após a injeção foi menor (15,5% de redução em relação ao controle), e a hepatomegalia tardia (2 a 3 semanas depois) mais acentuada (i.e., 2,09 e 1,69 vezes o peso do fígado dos controles, respectivamente) (Figura 10).

As modificações de peso do baço após tratamento de camundongos machos e fêmeas com a vacina pertussis são apresentadas nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Nos camundongos machos, a partir de 48 horas após o tratamento, é possível constatar uma esplenomegalia que acentuou-se progressivamente com o tempo decorrido após injeção sendo o maior peso do baço registrado na última determinação, realizada 3 semanas após o tratamento.. Nos dias 2, 5, 7, 14 e 21 após o tratamento o peso do baço dos tratados foi 1,82; 1,91; 1,96; 4,17 e 5,05 vezes maior do que o dos controles, respectivamente (Figura 11).

Nas fêmeas a esplenomegalia foi detectada somente a partir do dia 5 após o tratamento quando o peso do órgão entre as tratadas foi 2,05 vezes maior do que o registrado nas controles. Nos dias 14 e 21 pós-administração da vacina pertussis, a

esplenomegalia foi muito acentuada atingindo o peso do baço das tratadas valores 4,93 e 5,91 vezes maiores do que o registrado nas respectivas controles (Figura 12).

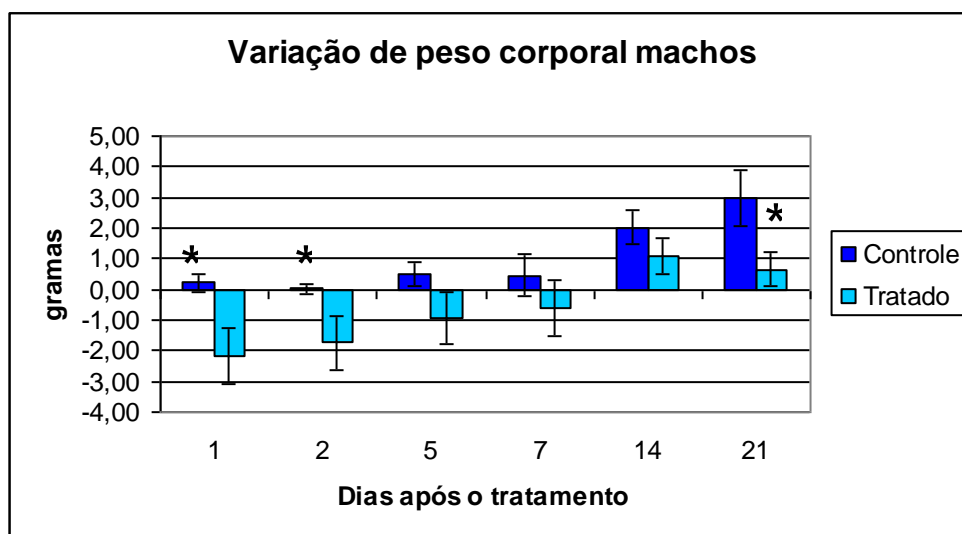


Figura 7. Variação de peso corporal nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com uma dose da vacina pertussis (40 Uop/mL) ou solução salina apirogênica (controles). As variações de peso ( $\Delta p$  = peso no dia da eutanásia – peso imediatamente antes do tratamento) foram expressas em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos. As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

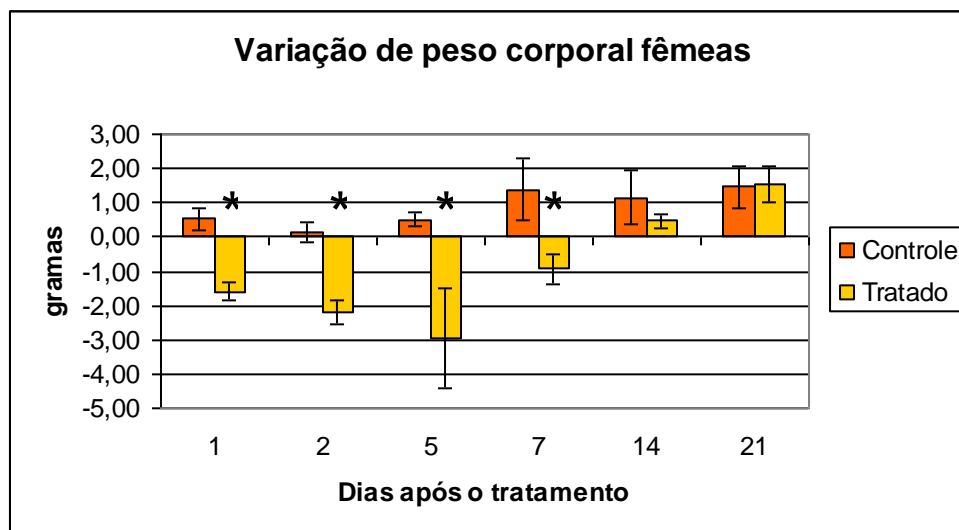


Figura 8. Variação de peso corporal nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com uma dose da vacina pertussis (40 Uop/mL) ou solução salina apirogênica (controles). As variações de peso ( $\Delta p$  = peso no dia da eutanásia – peso imediatamente antes do tratamento) foram expressas em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos. As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

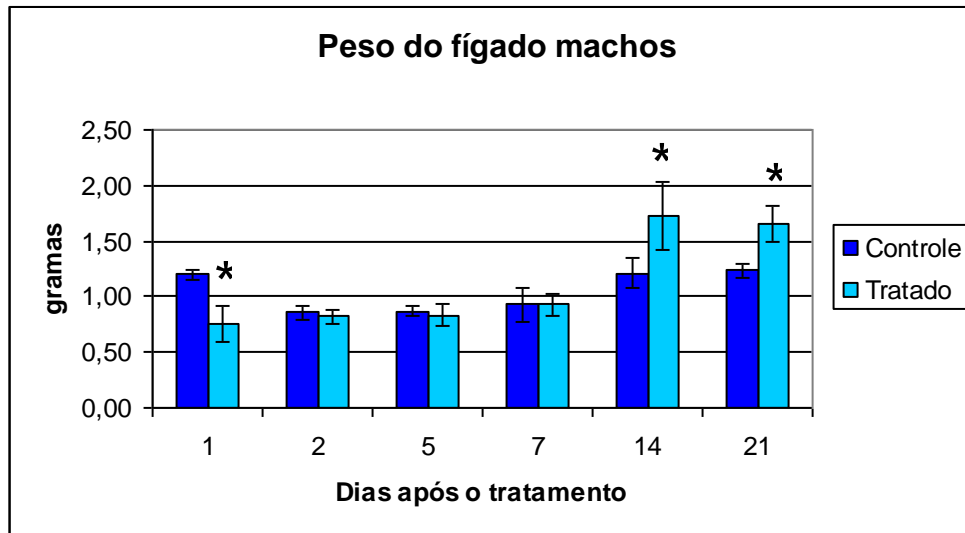


Figura 9. Peso do fígado nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles). Os pesos do órgão foram expressos em gramas. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos pesos dos fígados de 5 machos. As diferenças estatisticamente significativas ( teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com asterisco (\*).

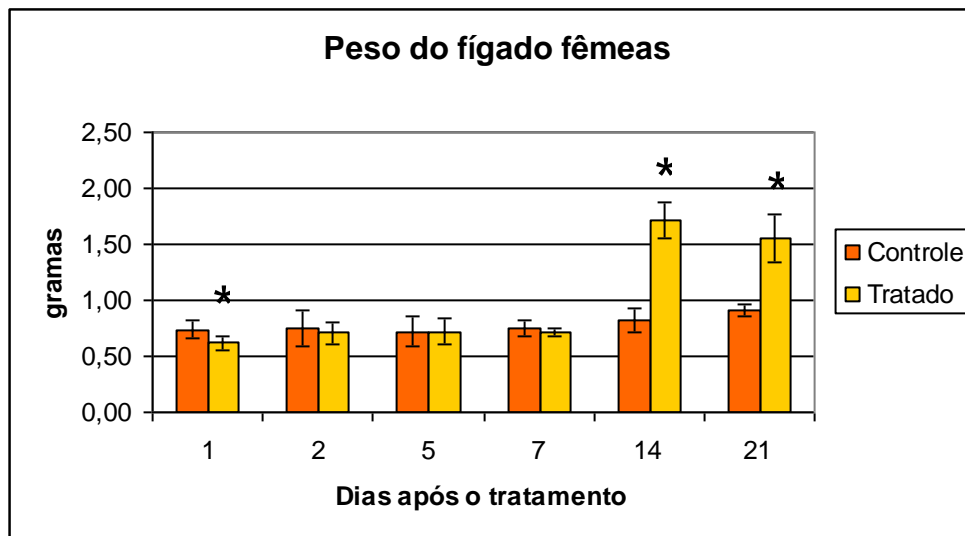


Figura 10. Peso do fígado nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles). Os pesos do órgão foram expressos em gramas. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos pesos dos fígados de 5 fêmeas. As diferenças estatisticamente significativas ( teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com asterisco (\*).

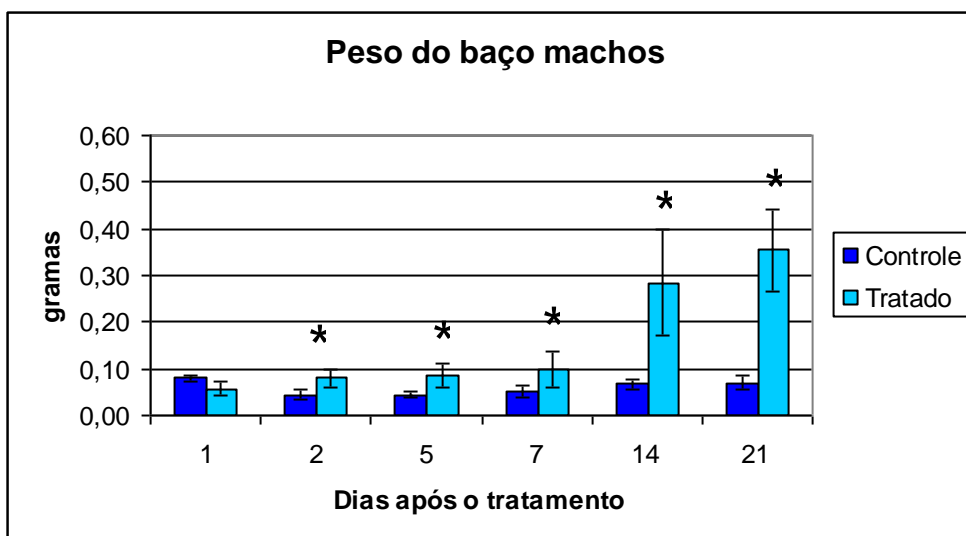


Figura 11. Peso do baço nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles). Os pesos do órgão foram expressos em gramas. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos pesos dos fígados de 5 machos. As diferenças estatisticamente significativas ( teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com asterisco (\*).

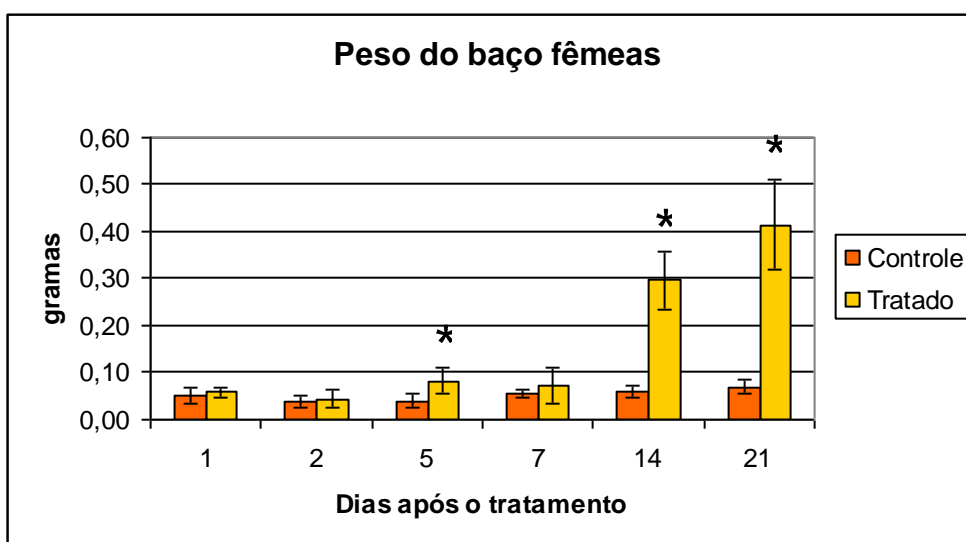


Figura 12. Peso do baço nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com uma única dose da vacina pertussis (40Uop/mL) ou volume equivalente de solução salina apirogênica (controles). Os pesos do órgão foram expressos em gramas. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão dos pesos dos fígados de 5 fêmeas. As diferenças estatisticamente significativas ( teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com asterisco (\*).



### *3.4 Curso temporal das modificações de atividade de monooxigenases hepáticas após a administração intraperitoneal de uma única dose da vacina pertussis*

#### *3.4.1 Determinação da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD)*

Os efeitos da vacina pertussis sobre a atividade de etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) foram avaliados em microsossomos hepáticos de camundongos C57Bl6, machos e fêmeas, 1, 2, 5, 7, 14 e 21 dias após o tratamento (figuras 13 e 14). Como podemos observar na figura 13, nas fêmeas que receberam a vacina pertussis por via intraperitoneal, a atividade de EROD estava deprimida em relação aos controles nos dias 1, 2, 7, 14 e 21 que se seguiram ao tratamento, mas no quinto dia pós-injeção a atividade de EROD nos animais tratados correspondeu a 76% da registrada no grupo controle não sendo esta diferença estatisticamente significativa. Nos machos a administração da vacina pertussis causou uma diminuição das atividades de EROD em relação aos níveis dos controles nos dias 1, 2, 7 e 14 após o tratamento (figura 14). No quinto dia após o tratamento foi constatada também, entre os machos, uma aparente recuperação da atividade de EROD que não diferiu entre controles e tratados com a vacina. No vigésimo primeiro dia pós-tratamento, a atividade de EROD entre os camundongos que haviam recebido a vacina foi em média 83 % da atividade registrada no grupo controle (figura 14). Não observamos diferenças entre sexos quanto a atividade de EROD em animais que não foram tratados (controles) com a vacina

#### *3.4.2 Determinação da atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)*

O curso temporal dos efeitos de uma única dose da vacina pertussis, sobre a atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD) em microsossomos hepáticos de camundongos C57Bl6, machos e fêmeas, até o dia 21 pós-tratamento, pode ser visto nas Figuras 15 e 16. Nas fêmeas que receberam a vacina pertussis, a atividade de BROD foi menor do que a registrada nas controles, ao longo dos 21 dias após o tratamento. A inibição foi mais acentuada no sétimo dia, quando a atividade de BROD das fêmeas tratadas correspondeu a 42% da atividade registrada nas não tratadas (controles) (Figura 15). Nos machos tratados com a vacina pertussis a atividade de BROD só se mostrou diminuída em relação aos controles no segundo dia após o tratamento, quando correspondeu a 61% da atividade média registrada no grupo controle (Figura 16). É interessante ressaltar que a atividade de BROD nos machos não tratados foi quase a metade daquela determinada entre as fêmeas controles, o que

confirma a conhecida diferença entre sexos quanto a esta atividade (marcadora de isoenzimas da subfamília CYP2B) em camundongos.

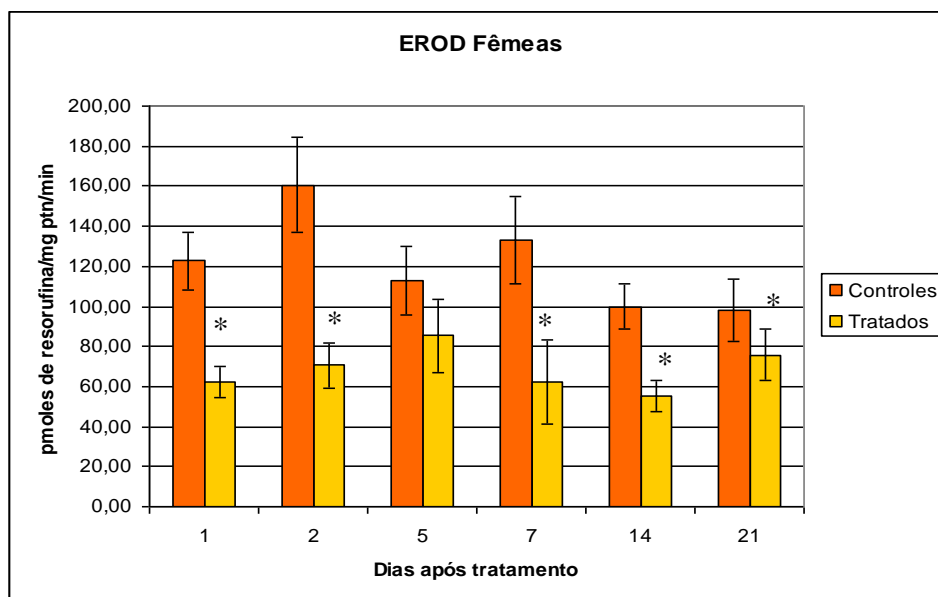


Figura 13. Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de EROD de 5 fêmeas, sendo cada amostrada analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

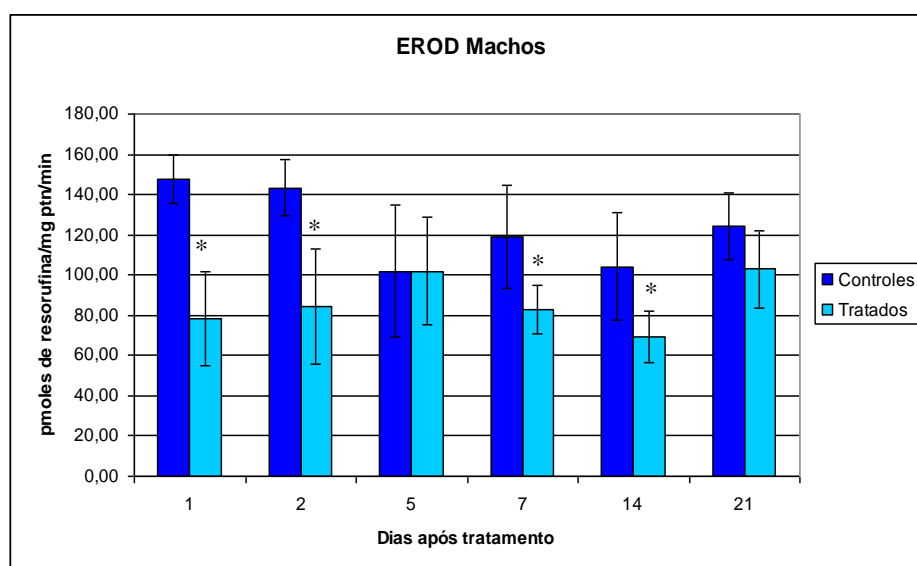


Figura 14. Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) na fração microsossomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de EROD de 5 machos, sendo cada amostrada analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

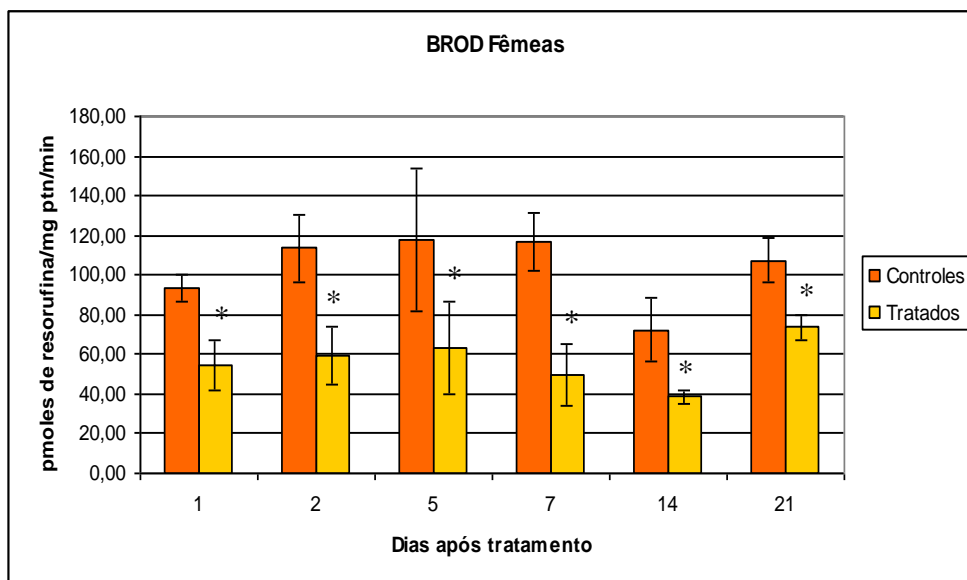


Figura 15. Atividade de benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) na fração microsomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de BROD de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com\*.

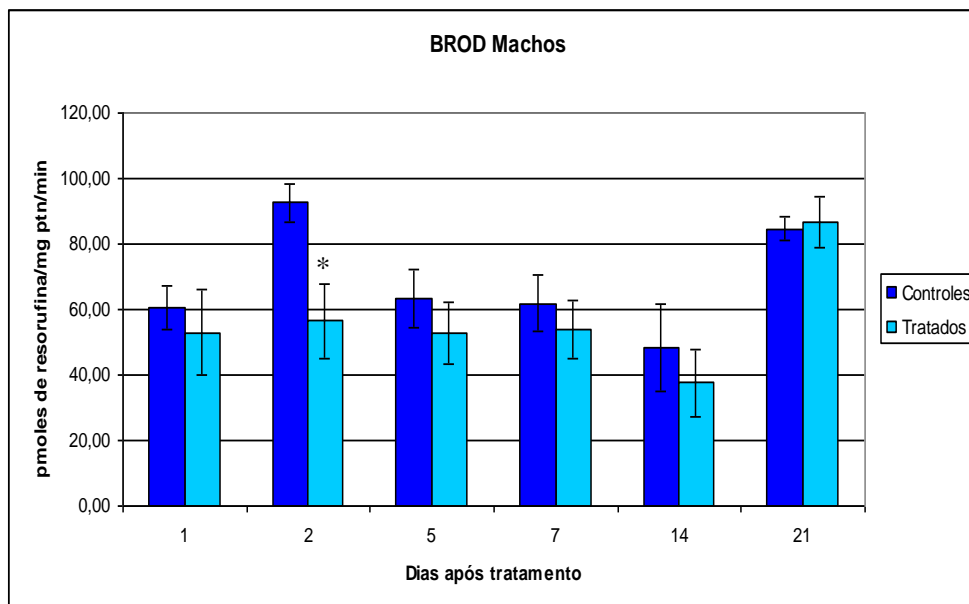


Figura 16. Atividade de benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) na fração microsomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de BROD de 5 machos, sendo cada amostra analisada em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com\*.

### *3.4.3 Determinação da atividade da p-nitrofenol hidroxilase (PNP hidroxilase)*

O curso temporal dos efeitos da vacina pertussis, sobre a atividade de p-nitrofenol hidroxilase em microsossomos hepáticos de camundongos C57Bl6, machos e fêmeas, nos 21 dias que se seguiram ao tratamento e mostrado nas figuras 17 e 18. Entre as fêmeas, a vacina pertussis causou uma diminuição da atividade da PNP hidroxilase detectada nos dias 1 e 7 após o tratamento, correspondendo a atividade nas tratadas a 69 e 75 %, respectivamente, das atividades registradas nos controles (figura 17). Nos machos, apenas no segundo e sétimo dia após o tratamento foi detectada uma redução da PNP hidroxilase dos tratados, sendo esta atividade 72 e 62%, respectivamente, da atividade registrada no grupo controle. Nos dias 14 e 21 após o tratamento, notou-se entre os tratados uma tendência de diminuição das atividades de PNP hidroxilase que não foi porém estatisticamente significativa (figura 18). Não observamos diferenças entre sexos quanto a atividade de PNP hidroxilase em camundongos dos grupos controles.

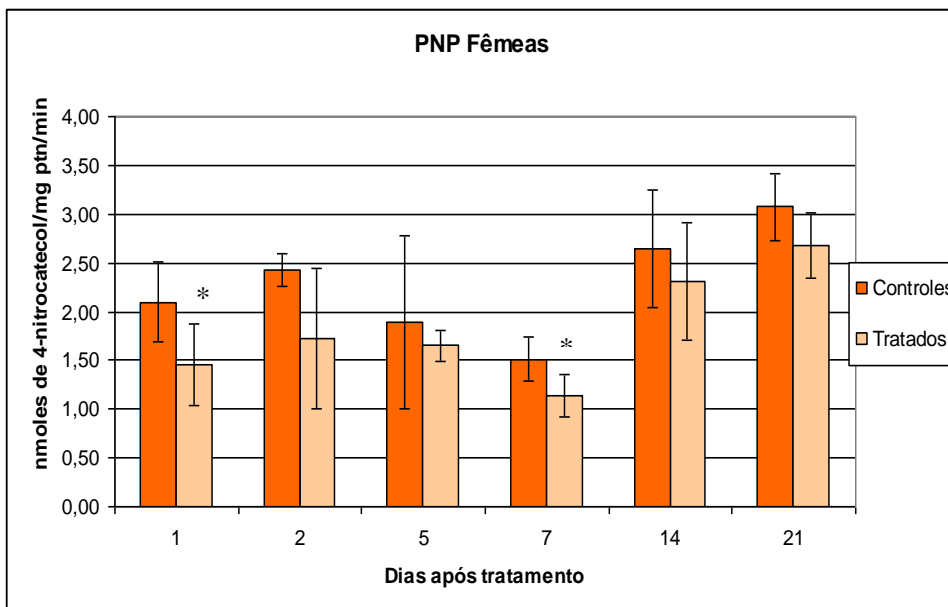


Figura 17. Atividade de p-nitrofenol hidroxilase (PNP hidroxilase) na fração microsomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em nmoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de PNP de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

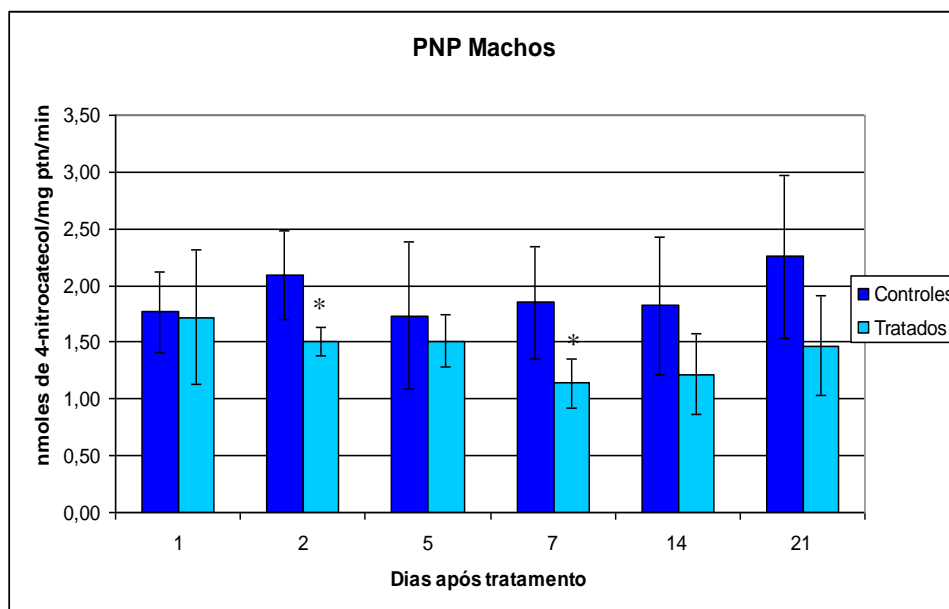


Figura 18. Atividade de p-nitrofenol hidroxilase (PNP hidroxilase) na fração microsomal hepática nos 21 dias que se seguiram ao tratamento de camundongos machos C57Bl6 por via intraperitoneal com vacina pertussis (tratados) ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em nmoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de PNP de 5 machos, sendo cada amostra analisada em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

### 3.5 Sinais de toxicidade, alterações do peso corporal, e do fígado e baço após a administração de dose única de LPS de *E.coli* sorotipos 0127:B8 e 055:B5 em camundongos C57BL6 fêmeas.

O peso corporal de cada camundongo foi registrado imediatamente antes do tratamento com a endotoxina e no dia do sacrifício (1 ou 7 dias após a administração do LPS). Nas figuras 19 e 20 apresentamos as variações de peso corporal ( $\Delta p$ ) após o tratamento com os LPS de *E.coli* dos sorotipos 0127:B8 e 055:B5 respectivamente em camundongos fêmeas.

Como pode ser visto na figura 19 e 20, os camundongos fêmeas do grupo controle (tratados com salina apirogênica) apresentaram um pequeno aumento de peso uma semana após o tratamento, enquanto que nos animais tratados com LPS (sorotipo 0127:B8) foi observada uma acentuada perda de peso 24 horas após a administração das doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal ( $\Delta p = - 1,55$  e  $-2,34$  gramas respectivamente) (figura 19), e nos animais tratados com o LPS de *E.coli* sorotipo 055:B5 nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal ( $\Delta p = - 1,23$  e  $-2,138$  e  $-2,58$  gramas respectivamente) (figura 20). Uma semana após o tratamento não foram observadas diferenças entre os pesos dos animais tratados com LPS e respectivos controles, apresentando todos os grupos variação de peso positiva.

Nas figuras 21 e 22 são mostrados os pesos absolutos dos fígados de camundongos fêmeas, 1 e 7 dias após a administração de ambos os sorotipos de LPS de *E.coli* utilizados neste estudo. Na figura 21 e 22, podemos constatar uma discreta redução de peso do fígado 24 horas após a administração de LPS em todas as doses aplicadas e para os dois sorotipos. No sétimo dia após o tratamento, não foram constatadas diferenças de peso hepático entre os animais controles e tratados com todas as doses de LPS de ambos os sorotipos de *E.coli*.

As modificações de peso do baço após tratamento de camundongos fêmeas com os LPS de *E.coli* sorotipos 0127:B8 e 055:B5 são apresentadas nas figuras 23 e 24, respectivamente. Como podemos observar nas figuras 23 e 24, não foram evidenciadas alterações estatisticamente significativas de ganho ponderal, no período de 24 horas e uma semana após a administração de endotoxina de *E.coli* de ambos os sorotipos.

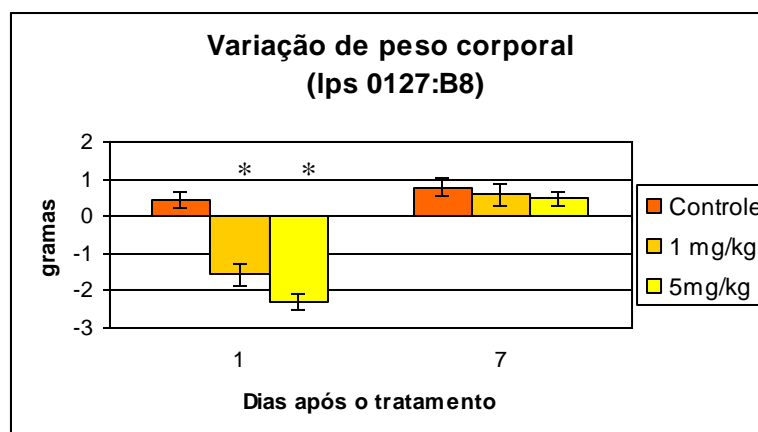


Figura 19. Variação de peso corporal 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 0127:B8) ou solução salina apirrogênica (controles). As variações de peso ( $\Delta p$  = peso no dia da eutanásia – peso imediatamente antes do tratamento) foram expressas em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos . As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

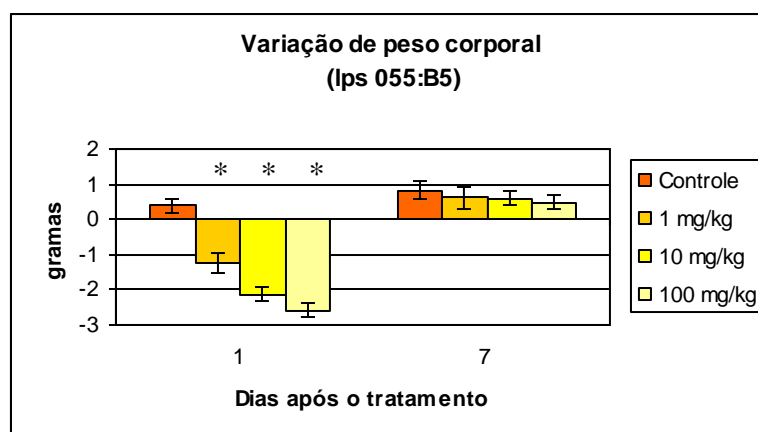


Figura 20. Variação de peso corporal 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 055:B5) ou solução salina apirrogênica (controles). As variações de peso ( $\Delta p$  = peso no dia da eutanásia – peso imediatamente antes do tratamento) foram expressas em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos . As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

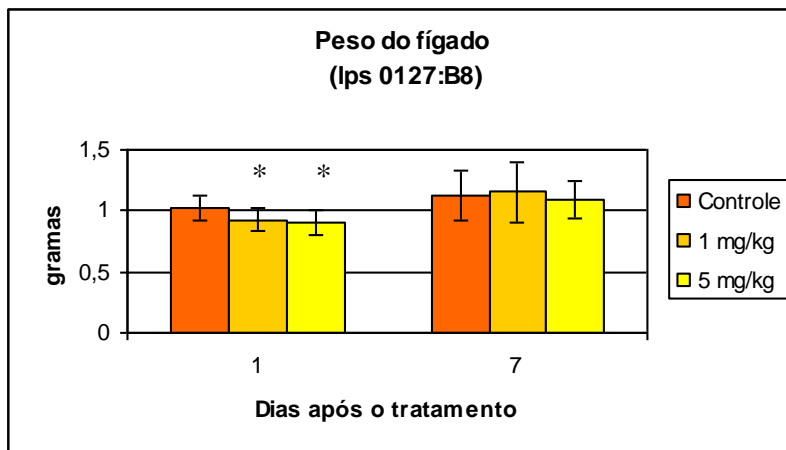


Figura 21. Valores absolutos do peso hepático 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 0127:B8) ou solução salina apirogênica (controles). Os pesos foram expressos em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos . As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

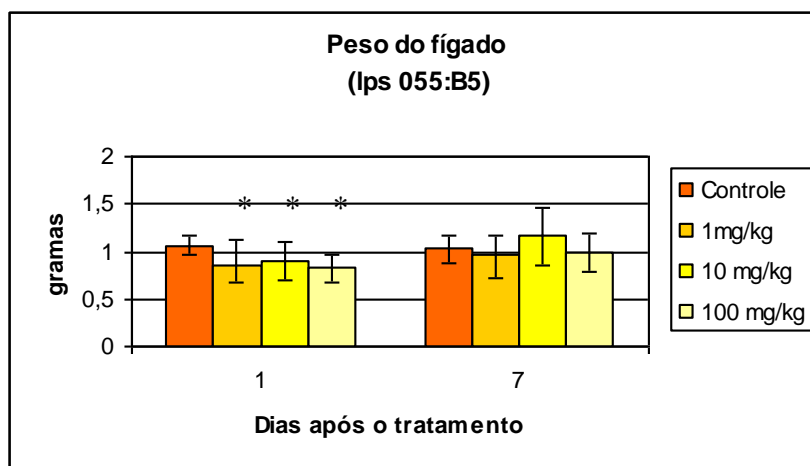


Figura 22. Valores absolutos do peso hepático 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 055:B5) ou solução salina apirogênica (controles). Os pesos foram expressos em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos . As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).



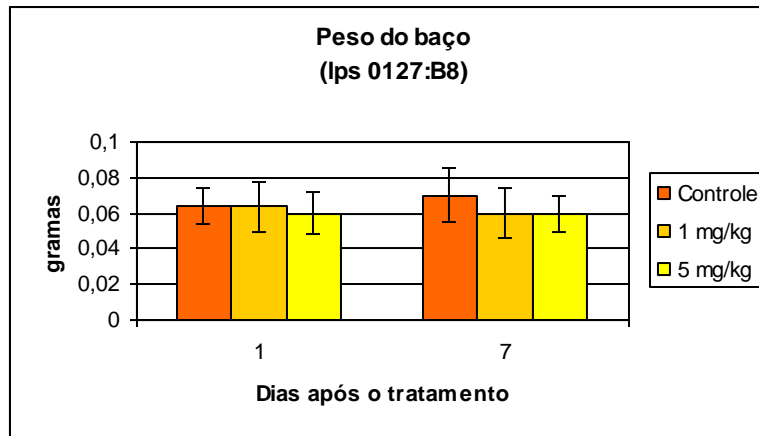


Figura 23. Valores absolutos do peso esplênico 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 0127:B8) ou solução salina apirogênica (controles). Os pesos foram expressos em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos . As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

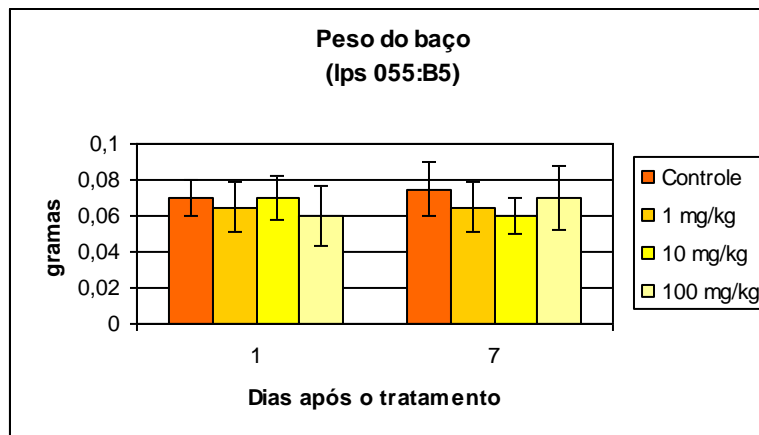


Figura 24. Valores absolutos do peso esplênico 24 horas e uma semana após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6 por via intraperitoneal com as doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal de LPS de E.Coli (sorotipo 055:B5) ou solução salina apirogênica (controles). Os pesos foram expressos em gramas e as alturas das colunas correspondem à média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos para 5 camundongos . As diferenças estatisticamente significativas (teste t de Student,  $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com um asterisco (\*).

3.6 Modificações da atividade de monooxigenases hepáticas após a administração intraperitoneal de uma única dose de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotipo: 0127:B8) em camundongos C57Bl6 fêmeas.

3.6.1 Determinação da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD)

Os efeitos do LPS de *E.coli* (0127:B8), administrado por via intraperitoneal nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) foram avaliados em microsomas hepáticos de camundongos C57Bl6 fêmeas 24 horas após o tratamento. Como podemos observar na figura 25, a atividade de EROD estava discretamente deprimida após as doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, com atividades correspondentes a 73,59 e 73,24% da atividade no grupo controle respectivamente. Neste caso em que houve apenas uma discreta inibição não foi possível evidenciar uma relação dose-efeito.

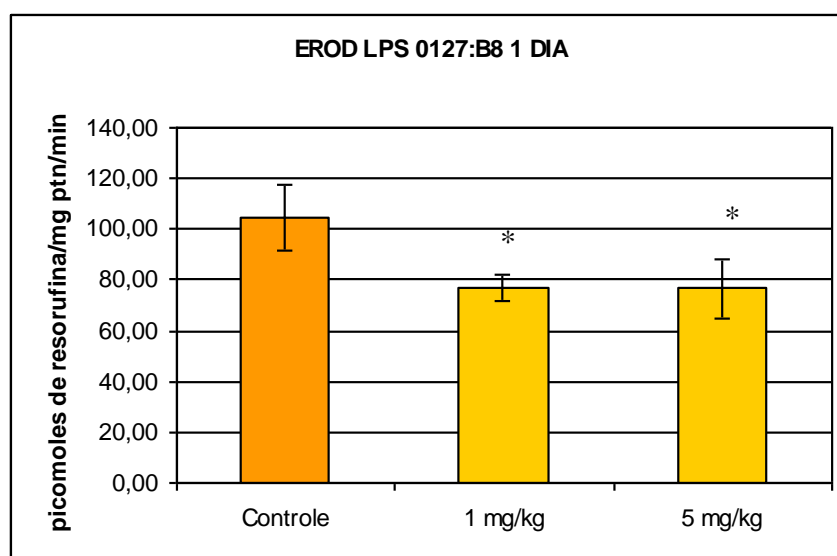


Figura 25. Atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) na fração microsomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de *E.coli* (0127:B8) nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, ou solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de EROD em microsomas de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata. As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com\*.

### 3.6.2 Determinação da atividade da benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (BROD)

Os efeitos do LPS de *E.coli* (0127:B8), administrado via intraperitoneal nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) foram avaliados em microsossomos hepáticos de camundongos C57Bl6 fêmeas, 24 horas após o tratamento. Como pode ser visto nas figuras 26 houve uma pequena inibição da atividade de BROD após administração das doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, com atividades correspondentes a 71,83 e 65,85% da atividade do grupo controle respectivamente. Neste caso, em que a inibição foi discreta, não foi possível evidenciar uma relação dose-efeito.

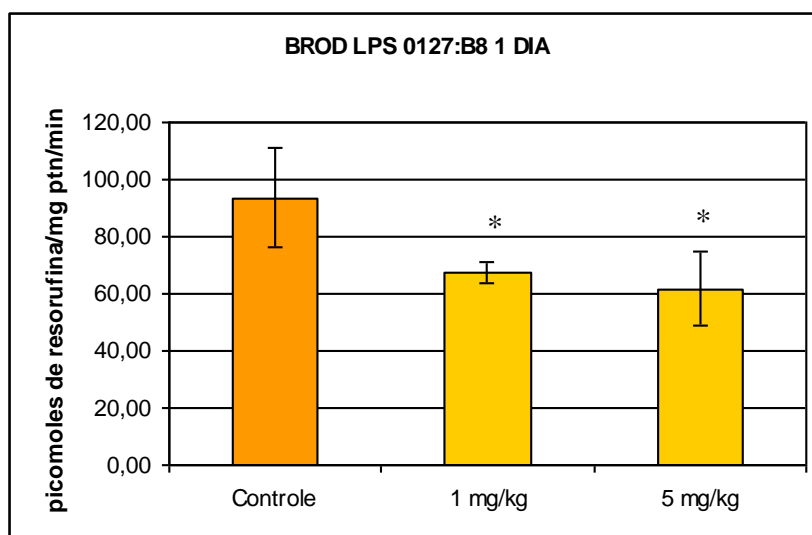


Figura 26. Atividade da benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (EROD) na fração microsossomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de *E.coli* (0127:B8) nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de BROD de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

### 3.7 Modificações da atividade de monooxigenases hepáticas após a administração intraperitoneal de uma única dose de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (sorotipo: 055:B5) em camundongos C57Bl6 fêmeas.

#### 3.7.1 Determinação da atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD)

Os efeitos do LPS de *E.coli* (055:B5), administrado por via intraperitoneal nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), foram avaliados em microsomas hepáticos de camundongos C57Bl6 fêmeas, 1 e 7 dias após o tratamento (figuras 27 e 28). Como podemos observar na figura 27, 24 horas após o tratamento com LPS nas doses de 1 e 10 mg/kg de peso corporal, a atividade de EROD não sofreu alterações. Na dose de 100 mg/kg de peso corporal, todavia, o LPS causou uma acentuada redução da atividade de EROD que caiu a níveis equivalentes a 23,13 % da média da atividade do grupo controle. Não foram observadas alterações da atividade de EROD, em relação aos controles, 7 dias após o tratamento, independente da dose administrada (figura 28).

#### 3.7.2 Determinação da atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD)

Os efeitos do LPS de *E.coli* (055:B5), administrado via intraperitoneal nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, sobre a atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD) foram avaliados em microsomas hepáticos de camundongos C57Bl6 fêmeas, 1 e 7 dias após o tratamento (figuras 29 e 30). A atividade de BROD, avaliada 24 horas após o tratamento, não diferiu da dos controles, nas fêmeas tratadas com as doses de 1 e 10 mg/kg de peso corporal. O tratamento com 100 mg/kg de peso corporal de LPS, porém, causou uma inibição de BROD cuja atividade nas tratadas caiu a níveis correspondentes a 68,34% da atividade média registrada no grupo controle (figura 29). As atividades, determinadas 7 dias após o tratamento com o LPS, não diferiram entre controles e tratadas, independentemente das doses administradas. Esses resultados sugerem que há uma recuperação da depressão da atividade observada nos animais tratados com a dose de 100 mg/kg de peso corporal (figura 30).

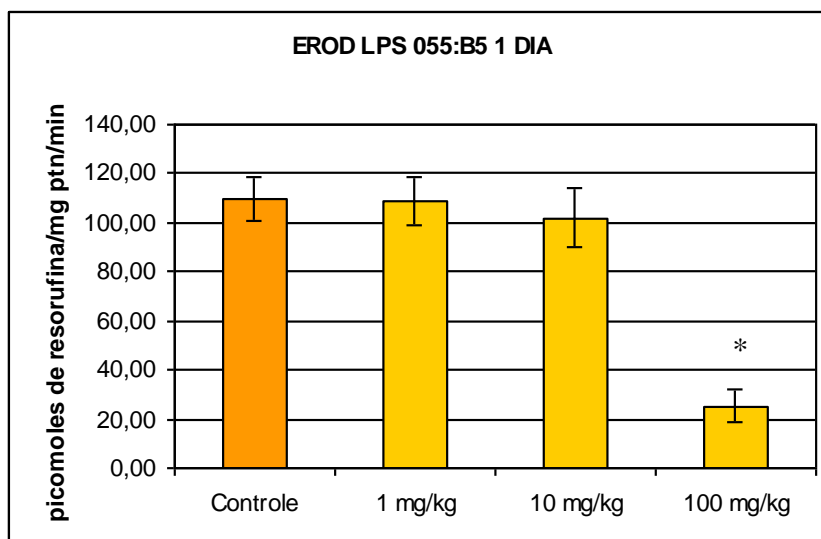


Figura 27. Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) na fração microssomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de EROD de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

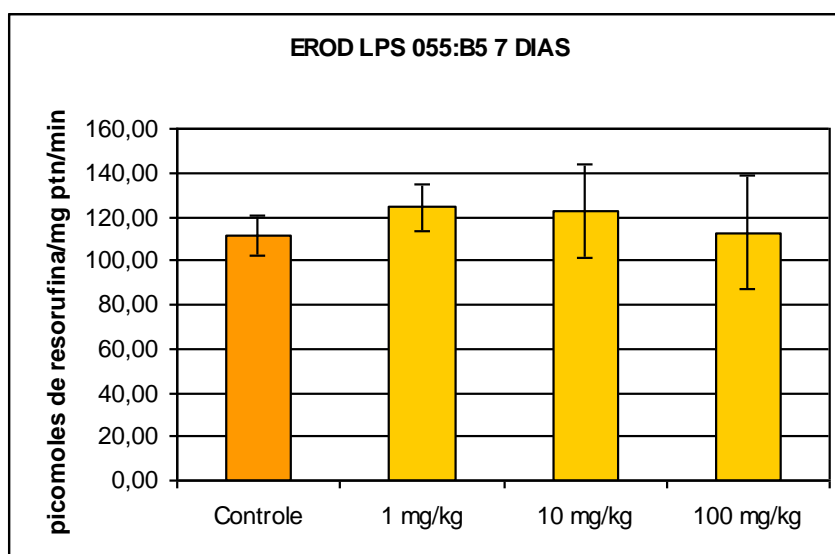


Figura 28. Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) na fração microssomal hepática 7 dias após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de E.coli (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de EROD de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

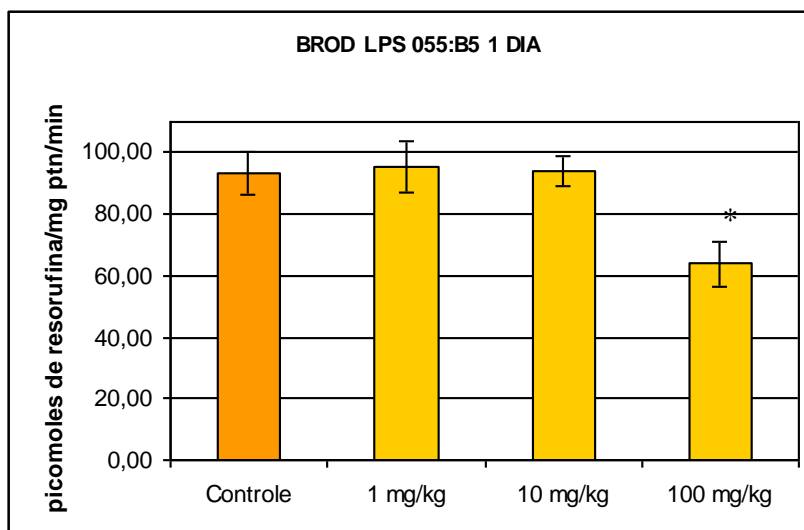


Figura 29. Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) na fração microsomal hepática 24 horas após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de *E.coli* (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirrogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de BROD de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

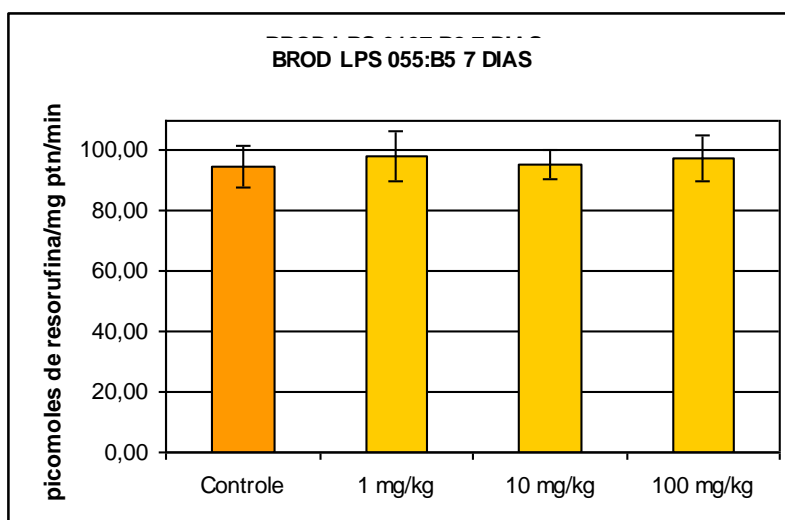


Figura 30. Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) na fração microsomal hepática 7 dias após o tratamento de camundongos fêmeas C57Bl6, por via intraperitoneal, com LPS de *E.coli* (055:B5) nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, ou com solução salina apirrogênica (controles). As atividades foram expressas em pmoles de resorufina/mg de proteína/ minuto. A altura das colunas corresponde à média  $\pm$  desvio padrão da atividade de BROD de 5 fêmeas, sendo cada amostra analisada em triplicata . As diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre controles e tratados são indicadas com \*.

## 4-Discussão

### 4.1 CYPs e atividades de monooxigenases no fígado de camundongos.

As isoenzimas citocromo P450 (CYP) caracterizam-se por exibir grande versatilidade em termos de especificidade por substrato: *i.e.* não só cada isoforma tem afinidade por ampla gama de substratos, como cada molécula de xenobiótico pode ser substrato para diferentes isoenzimas. Neste contexto, um determinado substrato será metabolizado preferencialmente por esta ou aquela isoenzima dependendo das afinidades das isoformas pelo substrato, e das concentrações relativas das isoformas presentes na fração microsomal alvo do estudo (Burke *et al.*,1994). Além disso, a importância relativa de cada isoenzima na catálise de determinada reação dependerá do tecido, da espécie e da linhagem e da exposição prévia a agentes indutores. De acordo com Burke *et al.* (1994), em ratos, as reações de PROD (pentoxiresorufina-*O*-despentilase) e BROD (benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase) são catalisadas preferencialmente por isoformas CYP2B1/2 em microsomos hepáticos induzidos por fenobarbital.

Em camundongos, entretanto, ainda não é totalmente claro que isoenzimas metabolizariam preferencialmente a pentoxiresorufina (PROD) e a benziloxiresorufina (BROD). Segundo Nerurkar *et al.*, (1993) BROD seria um marcador melhor do que PROD para a atividade de isoformas da subfamília 2B em camundongos que, segundo Honkakoski e colaboradores (1992), incluiria as isoenzimas CYP2B9 e CYP2B10. Mesmo com 83% de homologia entre si, tais isoformas apresentam grandes diferenças em sua regulação. A CYP2B9 é constitutiva e apenas fracamente induzível, sendo controlada estritamente por hormônios. Por outro lado, a CYP2B10 é altamente induzível pelo fenobarbital, é controlada pelos hormônios sexuais, e é a primeira isoenzima que é induzida por exposição a substâncias químicas como o clordano e bifenilas polihalogenadas (Leighton & Kemper, 1984; Yoshioka *et al.*, 1990).

Em relação à desalquilação da etoxiresorufina e da metoxiresorufina, ésteres da fenoxazona que são substratos para as reações de EROD e MROD, há concordância entre os autores de que, no fígado de ratos e camundongos, estas reações são catalisadas preferencialmente pelas isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2, respectivamente (Nerurkar *et al.*,1993; Weaver *et al.*,1994).

Várias reações tem sido utilizadas como marcadoras da isoenzima CYP2E1, entre as quais a *N*-nitrosodimetilamina *N*-desmetilação (Yang *et al.*,1991), a anilina 4-hidroxilação (Funae & Imaoka, 1993) e a hidroxilação do *p*-nitrofenol (Reinke, 1985). Esta última, além de ser de fácil execução, tem a vantagem de não envolver a

manipulação de substância altamente genotóxica / carcinogênica (e.g. N-nitrosodimetilamina) e não exigir grande quantidade de fração microsomal. Talvez por estas razões a hidroxilação do p-nitrofenol seja amplamente utilizada como marcadora da enzima CYP2E1 (Allis & Robinson, 1994).

#### 4.2 Sinais de toxicidade e alterações dos pesos corporal, hepático e esplênico após a administração de dose única da vacina pertussis ou de LPS de *E.coli*.

Como mencionado anteriormente, o peso corporal de cada camundongo foi registrado imediatamente antes do tratamento e, a partir de então, diariamente até o dia em que os animais foram mortos. Em camundongos machos e fêmeas, houve redução de peso corporal a partir do primeiro dia após o tratamento com a vacina pertussis, porém o curso temporal da variação do peso corporal ao longo dos 21 dias diferiu entre os sexos. Os camundongos machos apresentaram a maior redução de peso 24 horas pós a injeção da vacina pertussis, recuperaram peso gradativamente ao longo dos 21 dias, mas não chegaram porém a igualar o peso dos controles no vigésimo primeiro dia pós-tratamento. As fêmeas, por outro lado, apresentaram o maior *deficit* de peso no quinto dia após o tratamento, e a partir deste momento exibiram uma recuperação ponderal atingindo o peso das controles ainda durante os 21 dias de observação. Os mecanismos subjacentes a essa diferença entre sexos quanto a susceptibilidade aos efeitos tóxicos da vacina pertussis não são claros, mas possivelmente envolvem fatores endócrinos relacionados ao gênero tais como diferenças entre machos e fêmeas quanto à produção de hormônios de crescimento.

Os animais tratados com a vacina pertussis que foram sacrificados 24 horas após a injeção apresentavam o fígado levemente mais claro do que o dos controles. O peso do fígado dos animais tratados com a vacina também foi discretamente inferior ao peso do fígado dos animais que receberam apenas solução salina apirogênica (controles). As mesmas alterações hepáticas foram observadas nos animais que foram tratados apenas com LPS de *E.coli*, em todas as doses de ambos os sorotipos de *E.coli* utilizados nesse estudo. As semelhanças sugerem que, pelo menos em parte, esses efeitos observados nos animais tratados com a vacina pertussis sejam causados pela endotoxina da *Bordetella pertussis* presente na vacina. Nossos dados com camundongos C57Bl6 contrastam com os achados de Ansher e colaboradores (1992) que não observaram alterações nos fígados de camundongos C3H/HEJ fêmeas ao longo de 14 dias após administração de LPS *E.coli* (sorotipo 055:B5). Essa diferença



deve estar relacionada à susceptibilidade da linhagem de camundongo utilizada por aqueles autores, pois a dose aplicada no estudo de Ansher e colaboradores foi de 50µg por animal enquanto que a menor dose utilizada no nosso estudo correspondeu em média a 20µg por animal.

Os pesos do baço de todos os animais tratados, tanto com a vacina pertussis como com LPS de *E.coli*, 24 horas após o tratamento, eram indistinguíveis dos pesos registrados no grupo controle, o que está de acordo com o que foi relatado por Ansher e colaboradores (1992), que não evidenciaram alterações esplênicas.

O aumento dos pesos, tanto do fígado quanto do baço, ao longo de 21 dias pós-tratamento, indicou que a dose da vacina pertussis utilizada (40 Uop/mL) produziu um comprometimento hepatoesplênico claramente evidenciado nos animais sacrificados 14 e 21 dias após o tratamento. Esta observação foi confirmada pelo exame macroscópico realizado no momento em que os fígados foram retirados para preparação da fração microsomal. Os fígados dos animais de ambos os sexos que receberam a vacina pertussis, e foram sacrificados 14 e 21 dias após o tratamento, apresentavam volume claramente aumentado e coloração normal. Estes achados são semelhantes aos que foram relatados por Ansher e colaboradores (1993) em estudo sobre as alterações hepáticas que ocorrem ao longo de 14 dias após a administração de uma dose única da vacina DTP em camundongos C57BL6 fêmeas. Os camundongos machos tratados com a vacina pertussis apresentaram um pequeno aumento do baço, a partir do segundo dia após o tratamento, fenômeno esse que não foi observado nas fêmeas. Não foi possível porém comparar esse dado com outros da literatura, pois não encontramos nas bases de dados consultadas (*MEDLINE* e *TOXLINE*) trabalhos envolvendo o tratamento de camundongos machos com a vacina pertussis.

#### *4.3 Dose da vacina pertussis utilizada para o estudo das alterações das atividades de CYPs nos camundongos*

Alterações do metabolismo hepático de fármacos podem ser responsáveis por reações adversas à vacina pertussis em crianças que, na época em que são vacinadas, fazem uso concomitante de outros medicamentos. Em estudos toxicológicos é comum o uso de doses altas, pois os experimentos envolvem via de regra um pequeno número de indivíduos. Como o efeito adverso, na maioria das situações, aumenta com a dose, doses mais altas permitem evidenciar efeitos que de outra forma exigiriam experimentos com um grande número de animais por grupo para serem detectados. Neste estudo a dose de vacina utilizada foi 0,5 ml da vacina pertussis, com a

concentração de 40 Uop/ml, por camundongo (i.e. 20 Uop por animal). Essa concentração é a maior concentração permitida para uso em seres humanos. Fazendo as correções para as diferenças de peso, a dose aplicada neste estudo foi cerca de 400 vezes maior que a utilizada para uma criança de 8 kg (NIBSC., 1998).

#### *4.4 Comparação das alterações de CYPs evidenciadas nos camundongos tratados com a vacina pertussis com aquelas vistas naqueles que receberam o LPS de E.coli.*

Tem sido descrito que, tanto em seres humanos como em animais de laboratório, infecções virais, bacterianas e parasitárias, e processos inflamatórios de vários tipos, alteram o metabolismo de fármacos e as atividades e níveis de expressão de várias isoformas de CYP no fígado, no rim e no cérebro (Morgan, 1997, Renton, 2000). De um modo geral, tem sido observado que esses processos infecciosos e inflamatórios deprimem o metabolismo, aumentando a meia vida biológica e, eventualmente, a toxicidade de drogas (Renton, 2000). Os mecanismos subjacentes a esta depressão, entretanto, ainda não são bem conhecidos. A literatura sobre o assunto é vasta, mas esparsa, dispersando-se por inúmeros agentes infecciosos ou inflamatórios e diferentes momentos de evolução da doença / inflamação.

No presente estudo demonstramos que a vacina pertussis causou alteração das enzimas citocromo P450 das subfamílias 1A (EROD), 2B (BROD) e 2E (PNP hidroxilase) em camundongos fêmeas e, apenas nas enzimas das subfamílias 1A e 2E, em machos da linhagem C57BL6. Nossos resultados estão de acordo com os constatados por Williams e Sventivanyi (1977) que, em camundongos fêmeas, encontraram uma depressão da atividade da anilina hidroxilase (marcadora de CYP2E) e aminopirona N-desmetilase (marcadora de várias isoformas, incluindo CYP1A) e com os dados de Ansher e colaboradores (1991), também em fêmeas, para as atividades de benzofetamina desmetilase (marcadora de CYP2B) e da benzopireno monooxigenase (marcadora da CYP1A).

De modo geral as fêmeas mostraram-se mais susceptíveis ao tratamento com a vacina pertussis do que os machos, em relação à toxicidade (redução de peso corporal e alterações hepáticas e esplênicas) e às modificações de atividade de monooxigenases avaliadas neste estudo. O curso temporal das alterações das atividades enzimáticas foram similares: grande diminuição da atividade no primeiro ou segundo dia após o tratamento com a vacina seguida de uma discreta recuperação da atividade, seguida novamente por um decréscimo da atividade uma semana após a administração da vacina pertussis. Na segunda e terceira semanas pós-tratamento, a atividade

permaneceu mais baixa entre as fêmeas tratadas, havendo uma certa tendência à recuperação sem chegar, entretanto, a igualar a atividade das controles até o último dia do experimento (dia 21 após a injeção da vacina). A única exceção a esse padrão foi observada para a atividade de BROD entre os camundongos machos, nos quais a diminuição da atividade foi detectada apenas no segundo dia após o tratamento com a vacina.

É importante destacar que, entre os animais que receberam solução salina apirogênica (controles), a atividade de CYP2B (BROD) diferiu entre sexos sendo claramente superior nas fêmeas. Nossos resultados com a linhagem C57BL6 quanto a este último aspecto estão, portanto, de acordo com o que é descrito na literatura para outras cepas de camundongos, i.e. a atividade de isoformas da subfamília CYP2B é maior nas fêmeas do que nos machos (Sharma *et al.*, 1998; Jarukamjorn 2001). Em ratos, este dimorfismo tem o sentido oposto, ou seja, a atividade da subfamília CYP2B (no caso CYP2B1/2) e o *clearance* de barbitúricos é maior em machos do que em fêmeas. A existência deste dimorfismo sexual, entretanto, não foi evidenciada em seres humanos.

Para investigar a hipótese de que a diminuição das atividades enzimáticas nos primeiros dias após a imunização seria principalmente devido a endotoxina bacteriana contida na vacina, avaliamos, em camundongos fêmeas da mesma linhagem e idade, o curso temporal das alterações das atividades de EROD e BROD após a injeção de uma única dose de LPS de *E.coli* de dois sorotipos diferentes. O LPS da *E.coli* 0127:B8 foi injetado por via i.p. nas doses de 1 e 5 mg/kg de peso corporal, sendo os animais mortos 24 horas após o tratamento, enquanto o LPS da *E.coli* 055:B5 foi administrado nas doses de 1, 10 e 100 mg/kg de peso corporal, e as atividades determinadas 1 e 7 dias após o tratamento com a endotoxina. A inibição das atividades de EROD e BROD nos animais tratados com LPS de *E.coli* do sorotipo 0127:B8 foram discretas e praticamente não diferiram entre as duas doses. Como os camundongos mostraram-se mais resistentes do que o esperado ao LPS deste sorotipo e não havia material disponível para testar doses mais elevadas, demos continuidade ao experimento com LPS de *E.coli* de outro sorotipo (055:B5). Em fêmeas de camundongos C57BL6, reduções das atividades de monooxigenases hepáticas tem sido descritas com doses equivalentes a 5mg/kg de peso corporal de LPS (Ansher.,1991). A intensidade do efeito parece depender, entre outros fatores, do sorotipo da *E.coli*. No nosso estudo, somente a dose de 100mg/kg de peso corporal do LPS de *E.coli* 055:B5 foi capaz de causar uma expressiva redução da atividade de EROD (76,87% de inibição em relação a atividade registrada no grupo controle) e uma diminuição, mais branda, de

BROD (31,66% de inibição em relação ao grupo controle) 24 horas após o tratamento. Esses resultados são coerentes com a hipótese de que o LPS de *B.pertussis* presente na vacina, embora originário da parede celular de outra espécie de bactéria, deve ser um importante elemento para a alteração das atividades das monooxigenases hepáticas nesse período.

Uma semana após a administração da dose de 100mg/kg de peso corporal do LPS de *E.coli* 055:B5, as atividades das monooxigenases hepáticas nas tratadas não diferiram das atividades registradas nos seus respectivos controles indicando que, no caso da endotoxina, há recuperação dos CYPs em menos de uma semana. Este curso temporal da depressão das monooxigenases em resposta ao LPS é claramente diferente do que é observado após tratamento com a vacina pertussis. No caso da vacina, como vimos, as atividades ainda estão deprimidas após uma semana sendo de fato por volta do dia 7 após o tratamento que a inibição é mais intensa. Estas diferenças sugerem que a depressão das atividades de CYPs, 7 dias após o tratamento com a vacina pertussis, não se devem à endotoxina encontrada na vacina e sim, provavelmente, a outros componentes, tal como sugerido por Ansher (1992).

Os mecanismos envolvidos na inibição das atividades das enzimas citocromo P450, após administração da vacina pertussis, ainda são obscuros e necessitam novos estudos para esclarecê-los. Vários trabalhos encontrados na literatura associam o tratamento com vacinas a um aumento dos níveis séricos de interferon em roedores e coelhos (Renton., 1976, Ansher 1991). Aumento de citocinas, como a interleucina-6, a interleucina-1 e o fator de necrose tumoral, e a elevação dos níveis de expressão de RNAm da enzima óxido nítrico sintase induzível foram descritos em crianças 4 horas após a vacinação com a vacina DTP (Ansher.,1994; Prandota 2004). Tem sido relatado em vários trabalhos que citocinas, interferons e o óxido nítrico estão relacionados às diminuições das atividades catalíticas das enzimas citocromo P450 hepáticas observadas em resposta a estímulos inflamatórios e infecções de diferentes tipos (Morgan 2002). Resultados obtidos por Delaporte e Renton (1997), por exemplo, indicam que indutores de interferons causam diminuição da transcrição do gene e aumentam a velocidade de degradação do RNAm da CYP1A1 *in vivo*.

A administração de LPS produz, em animais de laboratório e seres humanos, aumento das quantidades de algumas citocinas. Os níveis de interleucina-6 e do fator de necrose tumoral, por exemplo, aumentam 24 horas após administração de endotoxina bacteriana a camundongos (Ansher.,1993; Renton.,2001). Alguns experimentos *in vitro* sugerem também que a endotoxina poderia agir diretamente nos hepatócitos afetando a expressão das CYP (Milosevic *et al* 1999; Morgan 2000).

Durante a endotoxemia os níveis plasmáticos de óxido nítrico aumentam devido a indução da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS ou NOS-2) no fígado e em macrófagos circulantes. Alguns autores propõem que o óxido nítrico produzido a partir da enzima NOS-2 poderia ser um dos responsáveis por inibições enzimáticas de enzimas citocromo P450 e diminuição dos níveis de apoproteínas e RNAm dessas monooxigenases hepáticas (Morgan., 1997). De acordo com Takemura e colaboradores (1999), a modulação de citocromos P450 por LPS ocorreria por dois mecanismos distintos e, especialmente nos estágios iniciais da inflamação, o óxido nítrico estaria envolvido. Em desacordo com esta hipótese, Morgan e Li-Master (2002) observaram, em camundongos, selvagens e *knockouts* para a enzima NOS-2, tratados com LPS de *E.coli*, uma diminuição dos RNAm para CYP2B, 24 horas após o tratamento. A partir destas observações, os autores concluíram que a *down-regulation* das isoenzimas da subfamília CYP2B em fígado de camundongos, expostos a doses de LPS moderadas ou altas, ocorreria independentemente dos níveis de óxido nítrico.

Além do LPS, outro componente da vacina pertussis envolvido na produção de mediadores inflamatórios é a toxina pertussis. Segundo Ansher (1993), esta toxina induz a produção de interferon gama cujos níveis séricos mais elevados coincidem com o máximo de inibição das enzimas citocromo P450. Em relação a produção de óxido nítrico, Xing e colaboradores (2000) não observaram aumento significativo de NO em culturas de macrófagos do peritônio de camundongos expostos a toxina pertussis

Como vimos, o papel do NO como mediador da depressão das atividades de CYPs em resposta a infecções e estímulos inflamatórios ainda é controverso na literatura. Controvérsias à parte, entretanto, o conjunto de estudos disponíveis na literatura científica sobre o tema sugere que a modulação das enzimas metabolizadoras de fármacos durante os processos inflamatórios e infecciosos se faz por uma multiplicidade de mecanismos regulatórios. Estudos adicionais são necessários para esclarecer que mediadores inflamatórios estão envolvidos, e também como esses mediadores participam da modulação das diferentes isoformas do citocromo P 450.

## 5 - Conclusões

- Os resultados deste estudo mostraram que a vacina pertussis, administrada em dose única a camundongos da linhagem C57Bl6, causou acentuada depressão da atividade de monooxigenases hepáticas (EROD, BROD e PNP). As alterações observadas sugerem que a vacina leva a *down regulation* das isoformas CYP1A1, CYP2E1 e da subfamília CYP2B.
- Evidenciamos ainda que as fêmeas foram claramente mais susceptíveis do que os machos tanto à *down regulation* de CYPs quanto às demais manifestações de toxicidade (perda de peso e hepatoesplenomegalia).
- A análise do curso temporal das alterações de atividades de monooxigenases hepáticas mostra que nas fêmeas, na maioria dos casos, as atividades ainda estão deprimidas 21 dias após uma única dose da vacina pertussis.
- Este curso temporal é bem diferente do curso temporal da depressão de monooxigenases hepáticas causados por uma única dose de LPS de *E.coli* em camundongos fêmeas da mesma linhagem. No caso do LPS de *E.coli*, esta inibição é intensa 24 horas após o tratamento, mas 7 dias depois evidencia-se uma recuperação completa. No caso da vacina pertussis, também já é possível constatar uma depressão 24 horas após o tratamento, havendo uma aparente recuperação (parcial), que no entanto é seguida de nova queda da atividade que atinge os níveis mais baixos por volta do dia 7 após a injeção, permanecendo deprimida em relação aos controles pelo menos até o dia 21 pós-administração.
- Estas diferenças sugerem que a modulação da atividade de CYPs pela vacina pertussis – que como verificamos contém níveis elevados de endotoxina de *B.pertussis* – é na sua fase inicial mediada pelo LPS (resposta rápida, 24 – 48 horas) e na fase posterior (resposta máxima aos 7 dias) pela toxina pertussis.

- Experimentos adicionais são necessários, entretanto, empregando a endotoxina da *B. pertussis*, sem a toxina pertussis, para verificar se a resposta dos camundongos a ela é diferente da resposta ao LPS da *E.coli*.
  
- A partir deste estudo inicial sobre o curso temporal da depressão da atividade de monooxigenases hepáticas pela vacina pertussis, recomendamos a realização de investigações adicionais sobre os mediadores envolvidos nesta resposta (NO, citocinas *etc*) assim como sobre os mecanismos celulares e moleculares subjacentes (pré- ou pós-translacionais) a estas alterações.

## 6 - Referências

ALLIS, J.W.; ROBINSON, B.L. (1994) A Kinetic Assay for p-Nitrophenol Hydroxylase in Rat Liver Microsomes. *Analytical Biochemistry* 219, 49-52.

ANSHER S, THOMPSON W, BRIDGEWATER J, SNOY P. (1993). Pertussis toxin-induced alterations of murine hepatic drug metabolism following administration of diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect Immun.* 61(10):4240-7.

ANSHER S, THOMPSON W, HABIG W. (1991) Vaccine-induced alterations in hepatic drug metabolism. *Vaccine.* 9 (4):277-83.

ANSHER S, THOMPSON W, SNOY P, HABIG W (1992) .Role of endotoxin in alterations of hepatic drug metabolism by diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed. *Infect Immun.* 60(9):3790-8.

ANSHER SS, THOMPSON W. (1994) Modulation of hepatic mRNA levels after administration of lipopolysaccharide and diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccine adsorbed (DTP vaccine) to mice. *Hepatology.* 20(4 Pt 1):984-91.

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

BATRA J.K., VENKITASUBRAMANIAN, T.A. & RAJ, H.G. (1987) Drug metabolism in experimental tuberculosis: I. Changes in hepatic and pulmonary monooxygenase activities due to infection. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 12: 109-114.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.

BRATTSTEN L.B. (1987) Sublethal virus infection depresses cytochrome P450 in an insect. *Experientia* 43:451-454.



BROOKS G.F, BUTEL J.S, MOSER S.A (2000) *Microbiologia Médica*. Guanabara koogan 21<sup>a</sup> Edição. P.198-199.

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

BURKE, M.D., THOMPSON, S.; WEAVER, R.J.; WOLF, C.R & MAYER, R.T. (1994) Cytochrome P450 Specificities of Alkoxyresorufin-O-dealkylation in Human and Rat Liver. *Biochemical Pharmacology*, 48(5): 923-936.

CHIEN , J.Y., THUMMEL, K.E. & SLATTERY, J.T. (1997). Pharmacokinetic consequences of induction of CYP2E1 by ligand stabilization. *Drug Metabolism and Disposition*, 25(10):1165-1175.

CHOLERTON S, DALY AK, IDLE JR. (1992) The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol Sci*. Dec;13(12):434-9. CONNEY, A.H. (1986). Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes: the first Bernard B. Brodie lecture at Pennsylvania State University. *Life Sciences*, 39:2493-2518.

CORBEL MJ, XING DK. (2004) Toxicity and potency evaluation of pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 3 (1):89-101.

DEGAWA, M., STER, S.J., MARTIN, M.V., GUENGERICH, F.P., FU, P.P. ILETT, K.F., KADERLIK, R.K., & KADLUBAR, F.F. (1994). Metabolic activation and carcinogen – DNA adduct detection in human larynx. *Cancer Research*, 54:4915-4919.

DELAPORTE E, RENTON KW. (1997) Cytochrome P4501A1 and cytochrome P4501A2 are downregulated at both transcriptional and post-transcriptional levels by conditions resulting in interferon-alpha/beta induction. *Life Sci*. ;60(10):787-96.

DONATO MT, GOMEZ-LECHON MJ, CASTELL JV. (1993). A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem.* 15;213(1):29-33.

FANTUZZI G, SIRONI M, DELGADO R, CANTONI L, RIZZARDINI M, CARELLI M, MARSILI I, GHIARA P, GHEZZI P. (1994) Depression of liver metabolism and induction of cytokine release by diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccines: role of Bordetella pertussis cells in toxicity. *Infect Immun.* 62(1):29-32.

FONNE-PFISTER R, MEYER UA. (1988) Xenobiotic and endobiotic inhibitors of cytochrome P-450db1 function, the target of the debrisoquine/sparteine type polymorphism. *Biochem Pharmacol.* 15;37(20):3829-35.

FUNAE, Y. & IMAOKA, S. (1993). Cytochrome P450 in rodents. In: Schenkman JB & Greim H (Editors), *Handbook of Experimental Pharmacology*, 105, Cytochrome P450, Springer-Verlag, Heidelberg.

GIBSON, G.G. & SKETT, P. (1994). Induction and inhibition of drug metabolism e Techniques and experiments illustrating drug metabolism. In: Chapman & Hall (Editors), *Introduction to Drug Metabolism*. 2<sup>nd</sup> edition. Blackie Academic & Professional, London Glasgow New York.

GONZALEZ, F. Human P450 cytochromes: problems and prospects. (1992). *Trends in Pharmaceuticals Sciences*, 13: 346-352.

HALPERT, J.R., GUENGERICH, F.P., BEND, J.R. & CORREIA, M.A. (1994). Contemporary Issues in Toxicology – Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 125:163-175.

HEWLETT EL, SAUER KT, MYERS GA, COWELL JL, GUERRANT RL. (1983) Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect Immun.* 40(3):1198-203.

HODGSON, E. & LEVI, P.E. (1994). Metabolism of toxicants Phase I Reactions. In: Introduction to Biochemical Toxicology. Second edition. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut.

HODGSON, E. & LEVI, P.E. (1994). Metabolism of toxicants Phase I Reactions. In: Introduction to Biochemical Toxicology. Second edition. Appleton & Lange. Norwalk, Connecticut.

HONKAKOSKI P, KOJO A, LANG MA. (1992). Regulation of the mouse liver cytochrome P450 2B subfamily by sex hormones and phenobarbital. *Biochem J.* 1;285 (3):979-83.

INGELMAN-SUNDBERG M, DALY AK, OSCARSON M, NEBERT DW. (2000) Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics.* 10 (1):91-3.

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

JARUKAMJORN K, SAKUMA T, YAMAMOTO M, OHARA A, NEMOTO N. (2001) Sex-associated expression of mouse hepatic and renal CYP2B enzymes by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol.* 15;62 (2):161-9.

JORI, A., DI SALLE, E. & SANTINI, V. (1971). Daily rhythmic variation and liver drug metabolism in rats. *Biochemical Pharmacology*, 20:2965-2969.

KAWAJIRI, K. & HAYASHI, S.I. (1996) CYP1 Family. *In:* Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects, Ioannides, C., 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 78-79,.

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

KENNEDY SW, LORENZEN A, JAMES CA, COLLINS BT. (1993) Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader. *Anal Biochem.* 15;211(1):102-12.

KURIYAMA S.N., DE-OLIVEIRA, A.C.A.X., FIDALGO-NETO, A.A. & PAUMGARTTEN, F.J.R. (2000). Effects of pregnancy and protein-energy malnutrition on monooxygenase O-dealkylation activity in rat liver microsomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33 (1): 103-109.

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

LEVIN J, BANG FB. (1968) Clottable protein in Limulus; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh.* 31;19(1):186-97.

LEWIS, D.F.V. (1996). Cytochromes P450: Structures, function and mechanism. 1<sup>th</sup> edition. Taylor & Francis Ltd. T.J. Press. London, Bristol.

LUZ, PAULA MENDES, CODEÇO, CLÁUDIA TORRES AND WERNECK, GUILHERME LOUREIRO. (2003) A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil?. *Cad. Saúde Pública*, 19 (4):1209-1213.

MILOSEVIC N, SCHAWALDER H, MAIER P. (1999) Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 26;368(1):75-87.

MONOGRAFIA DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4<sup>a</sup> edição, número 116, 2003.

MORGAN ET, LI-MASTERS T, CHENG PY. (2002). Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology.* Dec 27;181-182:207-10.

MORGAN, E.T. (1997) Regulation of Cytochromes P450 During Inflammation and Infection. *Drug Metabolism* **29**, 1129-1188..

MURRAY, M. & REIDY, G.F. (1990). Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacological Reviews*, 42(2):85-101.

NATIONAL INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STANDARDS AND CONTROL (1998) Requirements for pertussis vaccine.p.127-151

NELSON, D.R. (2001). Cytochromes P450 in humans. <http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html> (25/11/01).

NELSON, D.R. (2002). Superfamily name: Cytochrome P450. <http://drnelson.utmem.edu/PIR.P450.description.html> (07/03/02).

NELSON, D.R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D.J., GUENGERICH, F.P., ESTABROOK, R.W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F.J., COON, M.J., GUNSALUS, I.C., GOTOH, O., OKUDA, K., & NEBERT, D.W. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12: 1-51.

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

NIMS, R.W. & LUBET, R.A. (1996). CYP2B Subfamily. In: *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. Ioannides, C., 1<sup>st</sup> edition, CRC Press, Boca Raton, New York, 136-151.

OMURA, T. (1999). Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, 266, 690-698.

OMURA, T. AND SATO, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 237, PC1375,

PARKINSON, A. (2001). Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons, 6<sup>th</sup> edition, International Edition, McGraw-Hill,133-224.

PASANEN M, PELKONEN O. (1994) The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta. *Crit Rev Toxicol.*;24(3):211-29.

PRANDOTA J. (2004) Urinary tract diseases revealed after DTP vaccination in infants and young children: cytokine irregularities and down-regulation of cytochrome P-450 enzymes induced by the vaccine may uncover latent diseases in genetically predisposed subjects. *Am J Ther.* 11(5):344-53.

RADZIALOWSKI, F.M. & BOUSQUET, W.F. (1967). Circadian rhythm in hepatic drug metabolizing activity in the rat. *Life Sciences*, 6:2545-2548.

REINKE LA, MOYER MJ. (1985) p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos.* 13(5):548-52.

RENTON KW, MANNERING GJ. (1976) Depression of hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase systems with administered interferon inducing agents. *Biochem Biophys Res Commun.* 22;73(2):343-8.

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

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

SCARLATO V, BEIER D., RAPPUOLI R. (1998). Molecular genetics of *Bordetella pertussis* virulence. *Methods in microbiology.* 27, 395-406.

SEWER MB, KOOP DR, MORGAN ET. (1996) Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos.* 24(4):401-7.

SHARMA, M.C.; AGRAWAL, A.K.; SHARMA, M.R. AND SHAPIRO, B.H. (1998) Interactions of Gender, Growth Hormone, and Phenobarbital Induction on Murine Cyp2B Expression. *Biochemical Pharmacology*, 56:1251-1258.

SIPES, I.G. & GANDOLFI, A.J. (1991). Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. Fourth edition. McGraw-Hill, INC.

SNELL, K; MULLOCK, B. (1987) Biochemical toxicology – a practical approach. Oxford: IRL Press. p.90-120

TAKEMURA S, MINAMIYAMA Y, IMAOKA S, FUNAE Y, HIROHASHI K, INOUE M, KINOSHITA H. (1999) Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol*. 30(6):1035-44.

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

UNIVERSIDADE DE EAST ANGLIA, (2005) [http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/posters/poster02/Kannan\\_poster.htm](http://www.uea.ac.uk/cap/carbohydrate/posters/poster02/Kannan_poster.htm)(21/02/05)

UNIVERSIDADE DE SOUTHERN ILLINOIS, (2005) <http://www.siu.edu/~cbwilso/250graphics00.htm> (19/02/05)

VESELL ES. (1991) Genetic and environmental factors causing variation in drug response. *Mutat Res*. 247(2):241-57.

WEAVER, R.J.; DUNBAR, B.; DICKINS, M.; MELVIN, W.T.; FOTHERGILL, J. AND BURKE, M.D. (1994) Evidence for a new cytochrome P450 form induced by 3-methylcholanthrene in rats. *Biochemical Pharmacology*, 47:1457-1460.

WILLIAMS J.F. & SZENTIVANYI A. (1977) Depression of hepatic drug-metabolism enzyme activity B.pertussis vaccination. *European journal of pharmacology*. 43:281-284.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global programme for vaccines and immunization - expanded programme on immunization, Geneva, The immunological Basis for immunization Series. Module 4: pertussis, 1993.

World Health Organization. Weekly epidemiological record, Geneva, 7 may,1999, N°18, 137-144.

XING DK, CANTHABOO C, CORBEL MJ. (2000) Effect of pertussis toxin on the induction of nitric oxide synthesis in murine macrophages and on protection in vivo. *Vaccine*. 14;18(20):2110-9.

YANG, C.S., PATTEN, C.J., ISHIZAKI, H. & JEONG-SOOK, H.YOO. (1991) Induction, purification and characterization of Cytochrome P450 IIE. *Methods in enzymology*, 206:595-601.

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