



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO CITOCROMO P4501A1  
HEPÁTICO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM  
RATOS TRATADOS COM BENZONIDAZOL**

Andreza Fabro de Bem

Florianópolis - Santa Catarina – Brasil

Fevereiro de 2001

**Avaliação da Expressão do Citocromo P4501A1 e das Defesas  
Antioxidantes em Ratos Tratados com Benzonidazol**

por

**ANDREZA FABRO DE BEM**

---

Dissertação Apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina Como Requisito  
Parcial à Obtenção do Título de Mestre em Farmácia – Fármaco Medicamento e  
Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Dra Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis, SC, Brasil

Fevereiro, 2001

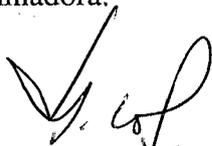
"Avaliação da Expressão do Citocromo P4501A1 e das Defesas  
Antioxidantes em Ratos Tratados com Benzonidazol"

por

Andreza Fabro de Bem

Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo orientador e  
membros da banca examinadora,  
composta pelos doutores:

Banca Examinadora:



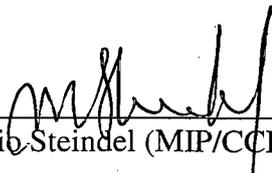
---

Danilo Wilhelm Filho (ECZ/CCB/UFSC – Membro Titular)



---

Rozangela Curi Pedrosa (BQA/CCB/UFSC – Membro Titular)



---

Mário Steindel (MIP/CCB/UFSC – Membro Titular)

Prof<sup>a</sup> Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 23 fevereiro de 2001

*In memoriam*

Ao meu pai Assis e meu irmão Roberto  
pelo verdadeiro exemplo de vida  
e de trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Danilo Wilhelm Filho pela orientação, empenho, estrutura e tempo dedicado para que eu pudesse desenvolver e concluir este trabalho. Foi uma honra tê-lo tido como orientador.

À professora Rozangela Curi Pedrosa pela fundamental coorientação nesta pesquisa e por compartilhar sua sabedoria, competência e paciência.

À amiga Claudriana Locatelli pelo apoio, amizade e compreensão durante todo o tempo que estivemos juntas. Obrigada por dividir comigo esta conquista tão importante.

Aos professores Márcio Alvarez-Silva e Andreia Trentin pela carinhosa acolhida em seu laboratório e pela disposição em compartilhar suas experiências e apoio necessário para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Roberto Curi Pedrosa, incontestável conhecedor da doença de Chagas, pela importante contribuição para um melhor entendimento da clínica desta doença e pela maneira simples, esmerada e amorosa dispensada ao exercício da medicina.

Aos queridos colegas de laboratório Fabíola, Michelle, Luciana, Luis Flavio, Irma, Reginaldo e Jean, pelo auxílio, prestatividade, companheirismo e os inesquecíveis momentos de descontração.

A todo o pessoal do Laboratório de Hematologia e Imunologia de Tumores, pela troca de experiências científicas e pronta colaboração na solução das dificuldades que surgiram. Agradeço os bons momentos em que a amizade, companheirismo e alegria fizeram parte do nosso dia a dia no laboratório, valeu estar com vocês.

Ao amigo Ricardo pela disposição e prestatividade em dividir seus conhecimentos sobre a técnica de Western blotting e por acompanhar nas infundáveis “eletroforever”.

À professora Mirian pelo entusiasmo e competência com que desempenhou a difícil tarefa de coordenar este programa de pós-graduação.

Ao professor Mário Steindel por ter aceitado prontamente fazer parte da banca examinadora.

Ao CNPq – CAPES, pelo apoio financeiro durante minha vida acadêmica.

A todos os colegas de curso pelo prazer de sua companhia durante o período que estivemos juntos.

Aos meus queridos amigos Marcelo, Andrea, Sinara, Andiara, Clarissa, Karine, Danielle pelo incentivo e pelas valiosas horas de alegria. Vocês serão sempre muito especiais.

Ao querido Adriano Coser, que amavelmente colaborou na formatação desta dissertação.

À minha mãe Ielda, pelo seu amor, sua dedicação e pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida.

A Deus por todas as oportunidades, por ser a luz que ilumina meu caminho, refúgio nos momentos difíceis e fonte de renovação para seguir em frente.

Enfim, a todos aqueles aqui não declinados nominalmente, que com seus conhecimentos, comentários, sugestões e apoio tornaram possível a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 A doença de Chagas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Benzonidazol</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Estresse Oxidativo</b> .....	<b>13</b>
<b>1.5 Defesas Antioxidantes</b> .....	<b>14</b>
1.5.1 Proteções Antioxidantes Enzimáticas.....	15
1.5.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	17
<b>1.6 Biotransformação de Xenobióticos</b> .....	<b>18</b>
1.6.1 Citocromo P450 (CYP450).....	20
<b>1.7 Deficiência das defesas nos parasitas</b> .....	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>28</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2 Protocolo Experimental</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3 Preparação das amostras</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 Homogenato.....	30
3.3.2 Extrato Ácido.....	30
3.3.3 Fração Microssomal.....	30
<b>3.4 Atividade dos Marcadores do Estresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes</b> ....	<b>31</b>
3.4.1 Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS).....	31
3.4.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	31
3.4.2.1 Glutationa S-Transferase (GST).....	31
3.4.2.1 Catalase (CAT).....	31
3.4.2.2 Superóxido Dismutase (SOD).....	32
3.4.2.3 Glutationa Peroxidase (GPx).....	32
3.4.2.4 Glutationa Redutase (GR).....	33
3.4.3 Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas.....	33
3.4.3.1 Glutationa Reduzida (GSH).....	33
3.4.3.2 Glutationa Total (GT) e Glutationa Oxidada (GSSG).....	33
3.4.4 Análise do Citocromo P4501A1.....	34
3.4.4.1 Concentração de Proteínas.....	34
3.4.4.2 Atividade da Etoxiresorufina- <i>O</i> -deetilase – EROD.....	34
3.4.4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para separação das proteínas:.....	34
3.4.4.4 Imunoblotting.....	34

3.5	Tratamento Estatístico Dos Dados.....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	Avaliação da indução e da expressão do CYP1A1.....	37
4.1.1	Atividade EROD dose dependente.....	37
4.1.2	Atividade EROD tempo-dependente.....	38
4.2	Atividade da GST.....	39
4.3	Dano Celular (medida de concentração de TBARS).....	40
4.4	Antioxidantes enzimáticos.....	40
4.4.1	Glutaciona Redutase.....	40
4.4.2	Glutaciona Peroxidase.....	41
4.4.3	Catalase.....	42
4.4.4	Superóxido dismutase.....	42
4.5	Antioxidantes não enzimáticos.....	43
4.5.1	Glutaciona Total; Glutaciona reduzida e Glutaciona Oxidada.....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## RESUMO

O benzonidazol (BZN) é um derivado nitroimidazol dotado de uma notável atividade tripanocídica e vem sendo utilizado no Brasil como o único fármaco empregado no tratamento da doença de Chagas. Possivelmente, o mecanismo de ação do BZN seja via produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas através do processo de biotransformação, induzindo uma condição de estresse oxidativo no *T. cruzi*, o qual é deficiente em defesas antioxidantes. Com o intuito de estudar a toxicidade do BZN via geração de ERO, foram avaliadas as defesas antioxidantes, bem como o dano celular e a indução/expressão do CYP4501A1 no hospedeiro, em ratos machos tratados durante diferentes períodos de tempo (2, 4, 6, 10 e 30 dias) com 40mg/Kg de peso de BZN. Após o tratamento, foram examinados os biomarcadores do estresse oxidativo como as atividades da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), dano celular (TBARS), os níveis de tióis não proteicos (GT, GSH e GSSG), bem como a atividade e a expressão do sistema da fase I de biotransformação, CYP4501A1 e a atividade da GST, nos hepatócitos destes animais. Nossos resultados revelaram que o BZN causou uma condição de estresse oxidativo nos hepatócitos do hospedeiro, caracterizado pelo aumento dos níveis de TBARS bem como a indução de algumas e inibição de outras defesas antioxidantes, além da indução do CYP1A1, observada através da medida da atividade EROD e por Western blotting, de uma maneira tempo-dependente. A atividade da GST foi inibida durante o tratamento com BZN. O dano tecidual, observado através da medida de TBARS, mostrou um aumento exponencial até 10 dias de tratamento, mantendo-se igualmente aumentado em 30 dias. Por outro lado, as atividades da CAT e da GR aumentaram no início, sendo que a atividade da GR permaneceu diminuída até o final do tratamento, enquanto que a CAT, após 30 dias, teve sua atividade aumentada em relação aos controles. A atividade da GPx esteve diminuída em 2 e 30 dias de tratamento, enquanto a atividade da SOD permaneceu inalterada durante todo o período experimental. Os níveis de GT e GSH apresentaram um comportamento similar, estando diminuídos no início do tratamento; todavia, as concentrações hepáticas aumentaram no final do período experimental; a GSSG mostrou-se elevada durante todo o tratamento. Sumarizando, estes resultados indicam que, mesmo em doses terapêuticas, o tratamento com BZN proporciona uma condição

de estresse oxidativo nos hepatócitos dos ratos tratados com BZN, caracterizando uma toxicidade relacionada com a geração de ERO no hospedeiro, via indução do CYP1A1, além de sua conhecida toxicidade no parasita.

## ABSTRACT

Benznidazol (BZN) is a derived nitroimidazol with a remarkable trypanocidic activity. It has been used in Brazil as the only drug in the treatment of Chagas' disease. The possible mechanism of action of BZN may occur via the production of reactive oxygen species (ROS) generated through the biotransformation process that induces an oxidative stress in *T. cruzi*, which is deficient in antioxidant defenses. Taken in mind the study of BZN toxicity via the generation of ROS, some antioxidant defenses, the cellular damage (TBARS contents), and the induction and expression of CYP4501A1 were evaluated in the liver of adult male rats treated with 40mg/Kg weight of BZN during different intervals of time (2, 4, 6, 10 e 30 days). After the experimental period biomarkers of oxidative stress were measured in the hepatocytes, such as the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), the concentration of total glutathione (TG), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), the cellular damage (TBARS contents), as well as the expression and activities, of two components the biotransformation system, i. e., CYP4501A1 (phase I) and glutathione-S-transferase (phase II), respectively. Our results showed that BZN caused an oxidative stress in the host hepatocytes, characterized by the increase in TBARS levels, the induction or inhibition of some antioxidant enzymes, as well as the reaction of CYP1A1, observed through time-dependent increased of EROD activities and through Western blotting. The GST activity was inhibited during the experimental period, while the GPx and CAT activities showed an apparent complementary behavior between each other. The SOD activity remained unaltered during the experimental period. The GR activity increased at the beginning but showed decreased levels at the end of the experimental period. The TBARS contents showed increased levels during all the experimental period. The total and reduced glutathione showed decreased concentration at the beginning and increased concentrations at the end of treatment; while the oxidized glutathione concentrations showed permanent higher values. Summing up, these results indicate that, even in therapeutic doses, the BZN treatment elicited an oxidative stress condition in the rats hepatocytes; this toxicity is probably related to the generation of ROS in the host, via the CYP1A1 induction.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1- Áreas infectadas por <i>Triatoma infestans</i> no Brasil.....	2
2- Quadro geral dos possíveis cursos da doença de Chagas.....	4
3- Estrutura do Benzonidazol .....	6
4- Redução parcial do oxigênio .....	10
5- Geração de hidroperóxidos .....	14
6- Interação das defesas antioxidantes enzimáticas.....	17
7- Esquema generalizado do processo de biotransformação .....	20
8- Mecanismo proposto para o aumento da produção de enzimas pelos xenobióticos.....	22
9- Biotransformação e toxicidade de xenobióticos.....	24
10- Reações catalisadas pelo citocromo P450 .....	25
11- Atividade EROD dose-dependente .....	37
12- Atividade EROD tempo-dependente .....	38
13- Análise por Western blot do CYP4501A1 .....	39
14- Atividade da GST .....	39
15- Determinação do dano celular (TBARS) .....	40
16- Atividade da GR .....	41
17- Atividade da GPx .....	41
18- Atividade da CAT .....	42
19- Atividade da SOD .....	43
20- Concentração de GT .....	44
21- Concentração de GSH .....	44
22- Concentração de GSSG .....	45

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro</b>	<b>Página</b>
Resumo das principais defesas antioxidantes.....	15

## LISTA DE ABREVIATURAS

BZN	Benzonidazol
$\beta$ NF	$\beta$ -Naftoflavona
CAT	Catalase
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GT	Glutaciona total
$\text{HO}^{\cdot-}$	Radical Hidroxil
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical ânion superóxido
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

“... melhorar a resistência humana e não mais consentir que o nosso camponês tenha como abrigo a cafua primitiva, infestada pelo inseto que lhe suga o sangue e lhe injeta o parasito, cafua às vezes imprestável como habitação de suínos e de todo incompatível com a civilização de um povo...”

Carlos Chagas, 1934

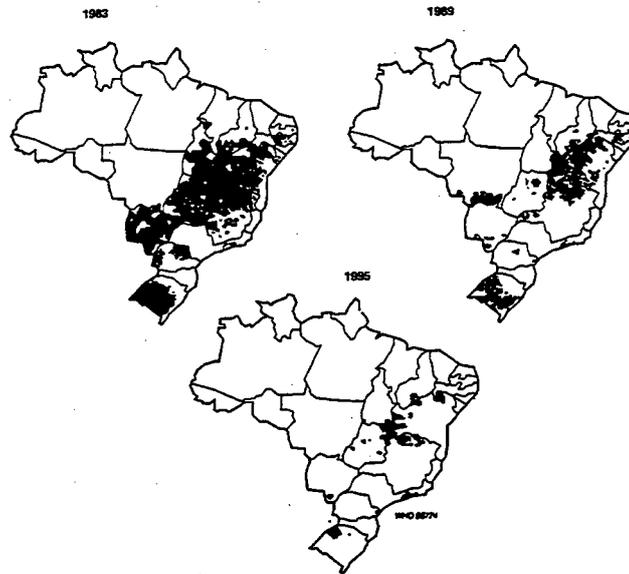
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas é endêmica no continente americano (América do Sul e Central), a tal ponto que estimativas da WHO apontam entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi*, e que mais de 90 milhões estão sob risco de contaminação. Dados do Ministério da Saúde indicam que aproximadamente 30% das pessoas infectadas desenvolvem cardiopatias severas. Estudos epidemiológicos feitos no Brasil (CASTRO FILHO et al., 1979; CAMARGO et al., 1984; MURTA, 1999), indicam que 8 a 9 milhões de pessoas morando em zonas endêmicas estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Todavia, a incidência da doença vem diminuindo nos últimos anos devido à preocupação por parte dos países em que esta é endêmica, em erradicar a doença e seu vetor, sendo que, em 1970, a área endêmica incluía 36% do país. Em 1975 foi criado o Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas, onde a estratégia principal era a eliminação do vetor através do borrifamento de casas com inseticidas químicos para a eliminação do vetor. Este programa teve importantes resultados, sendo que em 1993, a redução das transmissões vetoriais foi de 89% (WHO, 1997) (Figura-1).

A doença de Chagas (tripanossomíase americana, esquizotripanose) foi descoberta em 1909 pelo médico e cientista brasileiro Dr. Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, integrante da equipe de Oswaldo Cruz. Convocado a combater a malária nos sertões de Minas Gerais, na construção da Estrada de Ferro Central do Brasil, permaneceu nesta região por quatro anos, estando em íntimo contato com a patologia e a fauna daquela região (DIAS, 1999). Durante os anos subsequentes, Chagas estudou o parasita, seu ciclo evolutivo, a clínica, a patologia e a etiologia da doença; determinou estudos sobre os vetores e reservatórios, sobre o diagnóstico parasitológico e sorológico; formulou importantes hipóteses sobre a patogenia; verificou a transmissão congênita, chamou a atenção de autoridades e sanitaristas sobre a importância médica e social da parasitose; induziu estudos sobre melhoria habitacional; e impulsionou pesquisas sobre a

tripanosomíase entre vários países latino-americanos. A obra de Chagas é ímpar e exponencial na ciência mundial.



**Figura 1:** Áreas infectadas por *Triatoma infestans* no Brasil em 1983, 1989 e 1995.

A tripanosomíase estava primitivamente restrita aos pequenos mamíferos das matas e campos da América, desde a Patagônia até o sul dos Estados Unidos. Esses animais (tatus, gambás, roedores, morcegos, entre outros) conviviam com “barbeiros” silvestres, e através de um mecanismo biológico (interação), entre eles circulava o *Trypanosoma cruzi*, constituindo uma zoonose. Com a chegada do homem e os processos de colonização, em muitos lugares aconteceram desequilíbrios ecológicos (desmatamentos, queimadas) e os barbeiros foram desalojados, invadindo as habitações rústicas e pobres dos lavradores e colonos. A doença chegou ao homem e aos mamíferos domésticos (DIAS, 1999).

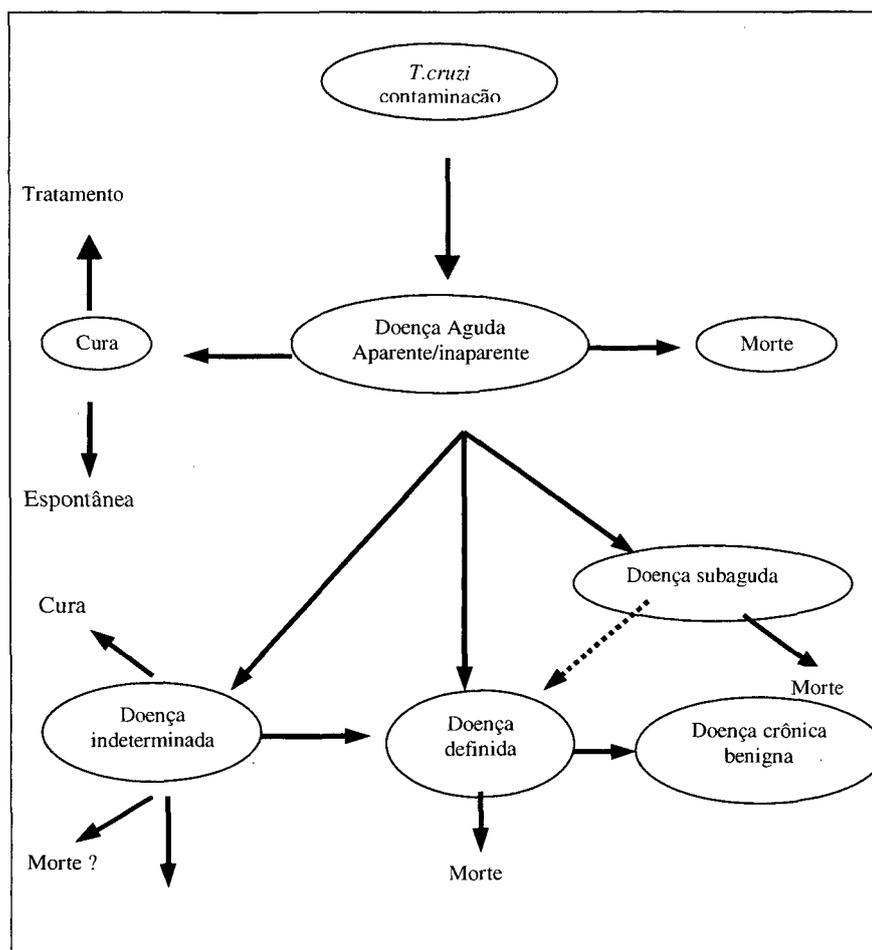
A transmissão natural ou primária da doença de Chagas é a vetorial, que se dá através das fezes dos triatomídeos, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”. Estes insetos, ao picar os vertebrados, em geral defecam após o repasto, eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos presentes em suas fezes e que penetram pelo orifício da picada, ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (GWADZ & HOTEZ, 1995). O parasito necessita obrigatoriamente invadir uma célula a fim de cumprir seu ciclo vital. A interiorização na célula pelo parasito é feita por fagocitose mediada por receptores da membrana plasmática da célula hospedeira.

Uma vez ocorrida a penetração celular, o tripomastigota diferencia-se rapidamente em amastigota (FERREIRA et al., 1996; MORELLO, 1988). Saturada a célula de parasitas, inicia-se a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, sendo as únicas formas viáveis quando ocorrer a ruptura da célula parasitada. Quando ocorre a ruptura, formas em tripomastigota caem na corrente sanguínea ou invadem células vizinhas, constituindo um novo ciclo (BRENER, 1997).

Uma vez infectado, o indivíduo desenvolve uma fase aguda da infecção, caracterizada, principalmente, por fenômenos de natureza inflamatória, na maioria das vezes com manifestações clínicas discretas, podendo mesmo passar despercebida. Esta fase dura cerca de 8 semanas, estabelecendo-se então, a fase crônica, caracterizada principalmente por fenômenos cicatriciais, porém ainda com inflamação presente. Felizmente, apenas a terça parte dos indivíduos infectados desenvolvem formas clínicas propriamente ditas da doença, quer cardíaca, digestiva, mista e outras raras. A maioria permanece na forma dita indeterminada, da qual pouco se conhece, no que tange a patogenia e a fisiopatologia (DIAS, 1985). O quadro geral dos possíveis cursos da doença de Chagas humana, pode ser resumido na figura 2. Desconhece-se elementos que possam identificar a evolução destes pacientes, e é nesta incerteza que se alicerçam as buscas de fármacos tripanosomicidas, na ânsia de alterar a história natural da enfermidade.

Ao analisarmos o desenvolvimento dos estudos da doença de Chagas no decorrer de nove décadas, nos deparamos com inúmeras dúvidas no que diz respeito à real importância do *T. cruzi* nas alterações ocorridas nos órgãos-alvo na fase crônica da enfermidade.

Na fase aguda há consenso que ela depende fundamentalmente do parasita, sua virulência e da capacidade reativa do indivíduo infectado. Na fase crônica, o aspecto mais desafiador consiste na identificação dos mecanismos determinantes da progressão do comprometimento do miocárdio. Ainda que se desconheçam os fatores da interação parasita-hospedeiro que controlam este gatilho evolutivo, dois mecanismos lesivos parecem consistir a parte central deste processo evolutivo: agressão parasitária das fibras cardíacas e lesão auto-imune (RASSI JUNIOR & MARIN NETO, 2000).



**Figura 2:** Quadro geral dos possíveis cursos da doença de Chagas, segundo DIAS (1989)

Estudos recentes (HIGUCHI et al., 1993), empregando técnicas imunohistoquímicas e à base de anticorpos monoclonais contra antígenos de *T. cruzi* em espécimes de biópsias endomiocárdicas de pacientes chagásicos crônicos demonstraram associação significativa entre presença de antígenos parasitários e focos inflamatórios. Outros trabalhos (AVILA et al., 1991; JONES et al., 1992; PEDROSA et al., 1996), com técnicas de biologia molecular, permitiram a detecção de antígenos *T. cruzi* circulantes em pacientes chagásicos crônicos.

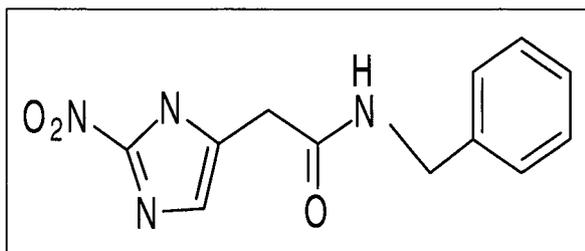
## 1.2 Benzonidazol

A quimioterapia da doença de Chagas é ainda muito inadequada. Dois fármacos, o Nifurtimox (NFX), atualmente fora do mercado brasileiro devido à gravidade de seus efeitos tóxicos, e o Benzonidazol (BNZ), são recomendados no tratamento da Doença de Chagas. O objetivo do tratamento é suprimir a parasitemia e, conseqüentemente, seus

efeitos patogênicos ao organismo. De acordo com o Ministério da Saúde dos governos do Brasil e da Argentina, o tratamento com BNZ está indicado na fase aguda da doença, em casos congênitos, na reativação da parasitemia por imunossupressão (AIDS e outras doenças imunossupressoras), e em casos de pacientes chagásicos transplantados. O esquema terapêutico recomendado é de 5 a 10mg/Kg/ de peso por dia durante 30 a 60 dias consecutivos, dependendo da gravidade do caso e do índice da parasitemia, sendo necessário realizar acompanhamento médico e laboratorial durante o tratamento para monitorar o paciente; a titulação de anticorpos específicos com antígenos monoespecíficos mostrou ser um marcador apropriado para a eficácia da terapêutica (KOROLKOVAS, 1997; DIAS, 1999). Em procedimentos pré-operatórios para transplantes cardíacos, a dose de BZN utilizada é de 4 a 5 vezes mais alta (BOCCHI, et al. 1994; 1999). O BZN é administrado por via oral, é rápida e quase completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, sua ligação a proteínas plasmáticas é da ordem de 44%, atingindo sua concentração plasmática máxima (2,22 a 2,81µg/ml) em 2 a 4 horas. O BZN sofre uma biotransformação parcial, encontrando-se o fármaco no organismo principalmente na forma inalterada; sua meia vida plasmática é de aproximadamente 12 horas, sendo excretado pela urina e pelas fezes na forma inalterada e de metabólitos (KOROLKOVAS, 1997).

Embora este fármaco possa suprimir a parasitemia e, possivelmente, curar ou melhorar a fase aguda da infecção de Chagas, ele tem pouco efeito sobre a doença crônica (BRENER, 1979). No entanto, estes fármacos apresentam sérios efeitos tóxicos indesejáveis, os quais muito frequentemente comprometem os benefícios do tratamento (DIAS, 1984).

O benzonidazol [2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida], um nitroimidazol (Figura 3), é atualmente o único fármaco empregado no tratamento da Doença de Chagas no Brasil e Argentina (DIAS, 1984). Os efeitos terapêuticos do BNZ na infecção chagásica humana mostraram notáveis diferenças, que são explicadas, em parte, pela existência de cepas de *T. cruzi* com suscetibilidades diferentes frente ao fármaco.



**Figura.3:** Estrutura do Benzonidazol

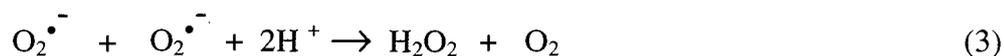
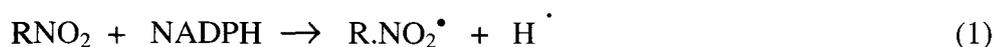
A relativa eficácia deste fármaco como um agente tripanomicida, entretanto, apresenta efeitos colaterais nos pacientes que recebem o tratamento. As manifestações mais comuns podem incluir tremores, náuseas, vômitos, cefaléia, anorexia, perda de peso, eritema, depleção das células da série vermelha (STOPPANI, 1999). Além dos distúrbios gerais e digestivos, o BZN causa sérios efeitos adversos como hipersensibilidade, em geral, dermatite depressão da medula óssea e polineuropatia periférica. O quadro mais preocupante está associado à depressão da medula óssea, caracterizado por granulocitopenia, em especial, neutropenia, que em geral passa despercebida. Todavia, esta discrasia sanguínea pode chegar à agranulocitose, com angina e febre alta por septicemia (CANÇADO & CHUSTER, 1985).

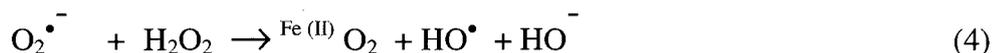
A toxicidade deste fármaco vem sendo comprovada em modelos experimentais. Em bactérias é mutagênico, induzindo pontos de mutação provavelmente por substituição de bases (NAGEL, 1987; FERREIRA et al., 1988), é tóxico para protozoários (GOIJMAN et al., 1985), e para células de mamíferos em hipóxia (ZAHOR et al., 1987). Resultados controversos (GORLA & CASTRO; GORLA, 1987; GORLA, et al., 1988; 1985; SOUZA et al., 1991) foram encontrados em aberrações cromossômicas e micronúcleos.

Há várias evidências da carcinogenicidade induzida por BNZ, sendo seu uso associado com o desenvolvimento de neoplasias malignas em corações chagásicos transplantados (BOCCHI, et al., 1994) e modelos da doença em células murina (TEIXEIRA, 1994). Alta prevalência de linfomas malignos foi observada em coelhos infectados com *T. cruzi* e em ratos não infectados tratados intraperitonealmente com BZN e NFX (TEIXEIRA et al., 1985; 1990 a,b). É possível que o BZN e o NFX atuem diretamente sobre o genoma do *T. cruzi*, inibindo a síntese do DNA, do RNA e de proteínas, e também aumentando a degradação destas macromoléculas (GUGLIOTTA et al., 1980; GONZALEZ & CAZZULO, 1989).

A toxicidade do fármaco pode ser atribuída a diversos fatores: (a) ação direta do radical nitroânion (DOCAMPO, et al., 1981; KEDDERIS & MIWA, 1988; AMES, et.al., 1986; EDWARDS, 1993) sobre moléculas susceptíveis, como o DNA; (b) geração de ERO (DOCAMPO & STOPPANI, 1979; DOCAMPO et al., 1981; SREIDER et al., 1990; GRINBLAT et al., 1989); (c) moléculas reativas reduzidas (os derivados nitroso e hidroxilamina), cuja citotoxicidade é conhecida (STOPPANI, 1999); (d) inibição direta de enzimas (GRINBLAT et al., 1989).

A redução univalente dos nitrocompostos implica nas seguintes reações apresentadas no esquema 1: captura do elétron pelo grupo nitro, que se converte em radical ânion nitroso, onde o NADPH é o doador de elétrons (Reação 1); produção do ânion radical superóxido, por oxidação do radical nitroânion (Reação 2); o ânion radical superóxido dismuta gerando peróxido de hidrogênio, reação catalizada pela superóxido dismutase (Reação 3); o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio em presença de Fe (II) reagem formando o radical hidroxila, o qual é muito tóxico e reativo (Reação 4). Esta série de reações requerem a intervenção de várias enzimas. A reação 1 utiliza flavoproteínas como o NADPH, citocromo P450 redutase e dihidrolipoamina desidrogenase mitocondrial que atuam como nitro redutases (SREIDER et al., 1990; GRINBLAT et al., 1991). A reação 3 é catalizada pela superóxido dismutase. A velocidade da reação 2 está limitada pela concentração de oxigênio do meio; se esta estiver alta, como ocorre nos sistemas que operam em condições aeróbicas, a produção de ERO será aumentada nas reações seguintes. Entretanto, se a tensão de oxigênio estiver baixa, como ocorre nas profundidades dos tecidos em condições fisiológicas, a reação 2 é relativamente lenta, favorecendo a dismutação do radical nitroânion (Reação 5), gerando, assim, um derivado nitroso. O nitrosfurano, em presença de um sistema redutor, forma a hidroxilamida correspondente (R.NHOH; Reação 6). Por fim, uma redução similar leva à produção do amino derivado (R.NH<sub>2</sub>; Reação 7). A reação 6 e 7 também dependem de nitro redutases (EDWARDS et al., 1993).





**Esquema 1:** Redução univalente dos nitrocompostos (produção de ERO)

Os derivados nitrosos e hidroxilamina dos nitroimidazólicos são conhecidos pela sua toxicidade. As reações 1-7 podem ocorrer tanto em *T. cruzi* como no organismo hospedeiro, o que poderia explicar a toxicidade dos nitroderivados para ambos (STOPPANI, 1999). Todavia, o *T. cruzi* é um organismo deficiente em enzimas antioxidantes, como, por exemplo, a catalase e a superóxido dismutase (DOCAMPO et al., 1981; GRIMBLAT et al., 1989; SREIDER et al., 1990; GRIMBLAT et al., 1991). Esta diferença é fator determinante do efeito do fármaco sobre o parasita. Os produtos da redução dos nitroimidazóis, tanto o radical nitroanion como os derivados nitroso e hidroxilaminas, bem como as ERO formadas durante o processo, podem reagir com o DNA, formando aductos (OLIVE & McCALLA, 1977; KEDDERIS et al., 1989) que facilitam a ruptura das cadeias de nucleotídeos, causando mutagênese (HECTH et al., 1979) e alcalinização de proteínas (McCALLA et al., 1971). Estes efeitos se somam aos efeitos tóxicos do ânion superóxido e do radical hidroxil (STOPPANI, 1999).

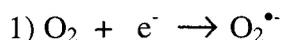
### 1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Durante o processo evolutivo dos seres vivos, iniciado há cerca de quase 4 bilhões de anos atrás, haviam formas unicelulares e anaeróbicas povoando algumas partes da biosfera aquática. Decorrente de sucessivas modificações físico-químicas no universo e pela atividade fotossintética das algas cianofíceas no processo de transformação de energia, promoveu-se o início da incorporação do oxigênio sob forma molecular gasosa (há cerca de aproximadamente 3 bilhões de anos atrás), dando origem, muito recentemente, à forma humana que se apresenta hoje (KARLSSON, 1997). Exceto para aqueles organismos que estão especialmente adaptados a viver em condições de

anaerobiose, todos os animais e plantas requerem oxigênio para uma eficiente produção de energia (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998).

A compreensão do processo pelo qual as células dos organismos superiores obtêm boa parte de sua energia nos remete ao estudo aprofundado do oxigênio e seus efeitos. Contudo, o oxigênio molecular,  $O_2$ , em seu estado fundamental, constitui-se num birradical de 16 elétrons, configurando átomos com oito elétrons, pelo compartilhamento de dois pares de orbitais (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

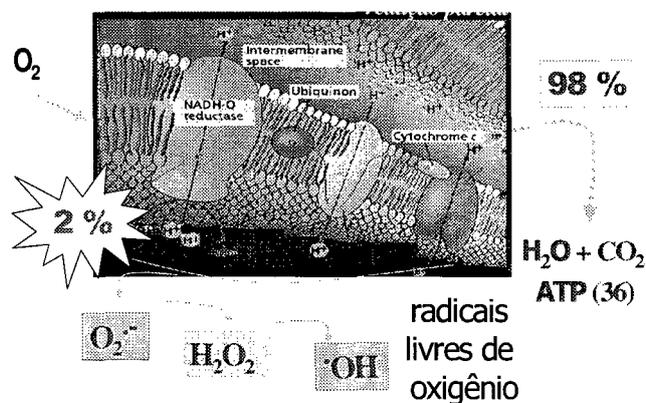
Radicais livres são espécies químicas capazes de existência independente e que contém um ou mais elétrons não-pareados em sua órbita de valência (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). O oxigênio molecular em seu estado fundamental possui reatividade muito baixa e dois elétrons não-pareados, isto é, com spins paralelos (PRYOR, 1986). Segundo TRAVACIO e LLESUY (1996) a redução do dioxigênio pode, entretanto, ocorrer através de reduções univalentes sequenciais, de forma a evitar a restrição associada ao Princípio de Exclusão de Pauli, de acordo com as seguintes reações (constituindo as chamadas formas intermediárias da redução parcial do oxigênio):



Estas formas intermediárias ou ERO são distintas do oxigênio no seu estado fundamental e caracterizam-se pela acentuada reatividade. Outras formas de oxiradicais e espécies relacionadas com o oxigênio, como por exemplo, os radicais peridroxilo e peroxilo, são formados principalmente nas membranas celulares (PRYOR, 1986).

No processo respiratório tem-se, seja em maior ou em menor escala, a formação de espécies intermediárias instáveis de oxigênio, as chamadas Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). As ERO são compostos altamente reativos, a maioria apresentando um tempo de vida incrivelmente fulgaz, da ordem de milésimos a bilionésimos de segundo. Apesar da breve existência, possuem um certo instante de vida livre, no qual

procura reagir com a matéria circundante e assim adquirir estabilidade (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).



**Figura 4:** Redução parcial do Oxigênio

No processo de transformações químicas, grande parte do oxigênio molecular é reduzido à água através das transferências de elétrons na cadeia respiratória (Figura 4). Estima-se que em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbicos é reduzido de forma tetravalente até  $H_2O$  (CHANCE et al., 1979), através da ação da citocromo c oxidase mitocondrial, sem a concomitante geração de ERO, permitindo que a principal via de transferência de elétrons e de energia para a síntese de ATP celular participe apenas particularmente da citotoxicidade decorrente destas formas deletérias (FRIDOVICH, 1979). Mesmo assim, o principal sítio de formação endógena do ânion superóxido estaria localizado na cadeia respiratória mitocondrial (BOVERIS & CHANCE, 1973), correspondendo a cerca de 2% do oxigênio consumido (CHANCE et al., 1979; BOVERIS & CADENAS, 1982). A produção de ânion superóxido é diretamente proporcional ao volume de oxigênio consumido ao nível mitocondrial (BOVERIS & CHANCE, 1973; JONES, 1985; DE GROOT & LITTANER, 1989).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), gerado essencialmente em mitocôndrias e peroxissomos, é uma molécula que, a rigor, não pode ser considerada um radical livre, já que não possui elétrons não pareados, mas possui atividade oxidante e elevada capacidade de difusão (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). As mitocôndrias encontram-se em todas as células aeróbicas de organismos multicelulares, e estão

majoritariamente localizadas nos músculos esqueléticos e cardíaco, sendo portanto, fisiologicamente o sítio gerador mais importante de peróxido de hidrogênio nos organismos (CHANCE et al., 1979).

A produção de  $\text{HO}^\bullet$  intracelular a partir da reação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reação de Haber-Weiss, postulada em 1934), ou a simples mistura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição como ferro e cobre (reação descrita por Fenton em 1894) tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e nocividade (PRYOR, 1986; FRIDOVICH, 1986; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). A elevada reatividade do  $\text{HO}^\bullet$ , apesar de suas concentrações intracelulares extremamente baixas, cerca de  $10^{-18}$  M, e seu reduzidíssimo tempo de vida-média, cerca de  $10^{-9}$ s, conferem uma toxicidade tão elevada aos organismos aeróbicos, que as proteções enzimáticas correspondentes às moléculas geradoras ( $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ultrapassam várias vezes as concentrações intracelulares estimadas para seus substratos (CHANCE et al., 1979). O  $\text{HO}^\bullet$  é o RLO mais reativo, pois, na busca imediata de sua estabilidade, este radical transforma as moléculas circundantes em radicais, que, por sua vez, também precisam estabilizar-se. Esta sequência de eventos é que dá origem às reações em cadeia com os constituintes celulares, oxidando resíduos de aminoácidos produzindo as bases de Schiff, pode também levar a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas quebrando a fita de DNA. Pode ainda atacar os lipídios de membrana produzindo uma peroxidação lipídica, alterando, assim, a organização da membrana celular, além de danos a proteínas e a outras moléculas orgânicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998).

Outras formas de ERO estão envolvidas no dano celular e, recentemente, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), derivado da rápida reação entre o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), ficou igualmente caracterizado por sua ação deletéria, apesar de não se tratar de um radical livre (PUNCHARD, et al., 1996).

A toxicidade do oxigênio é um fenômeno aparentemente contínuo e presente mesmo sob normóxia em organismos aeróbicos sadios dotados de diferentes e específicas defesas antioxidantes (WILHEM FILHO, 1994). A partir do descobrimento da enzima superóxido dismutase (McCORD & FRIDOVICH, 1969), foi possível verificar mais consistentemente, a hipótese formulada por GERSHMAN et al. (1954) de que a principal causa da toxicidade do oxigênio era decorrente da ação dos ERO.

O interesse relativo aos danos provocados pelas ERO ao nível molecular, celular e organismal, cresceu enormemente durante as últimas décadas, principalmente pelas evidências ou suspeitas vinculando as ERO a diversas patologias humanas e ao processo de envelhecimento (JENKINS & GOLDFARB, 1993). Destacam-se especialmente aquelas relacionadas com o sistema imunológico (onde as ERO desempenham também papel de defesa), aparelho respiratório, cardiovascular, neurológico e da visão, ademais de processos ligados à carcinogênese e ao processo de envelhecimento (JI, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). Persistem, entretanto, resistências isoladas quanto à real importância dos efeitos e das proteções envolvendo a ação dos oxirradicais (MARGARITIS, 1997).

Diversos autores citam o envolvimento das ERO em um grande número de patologias, como causa secundária a doenças crônico-degenerativas, ao aparecimento de alguns tipos de câncer e ao processo de envelhecimento humano. Neste sentido, à medida que as pessoas envelhecem, ocorre uma diminuição na eficácia do sistema das enzimas antioxidantes, enquanto que a formação de ERO se mantém ou é aumentada (PAOLISSO et al., 1998). As patologias relacionadas com as ERO estão associadas às deficiências genéticas e/ou ambientais. Nesse contexto, as doenças de natureza genética (a hemocromatose idiopática, a doença de Wilson e as doenças de Alzheimer e Parkinson) estão ligadas a uma falha na codificação para a síntese de determinadas enzimas, o que promove o aumento da geração dos ERO, ou então omite a resposta defensiva contra tais oxirradicais (SIGNORINI & SIGNORINI, 1995).

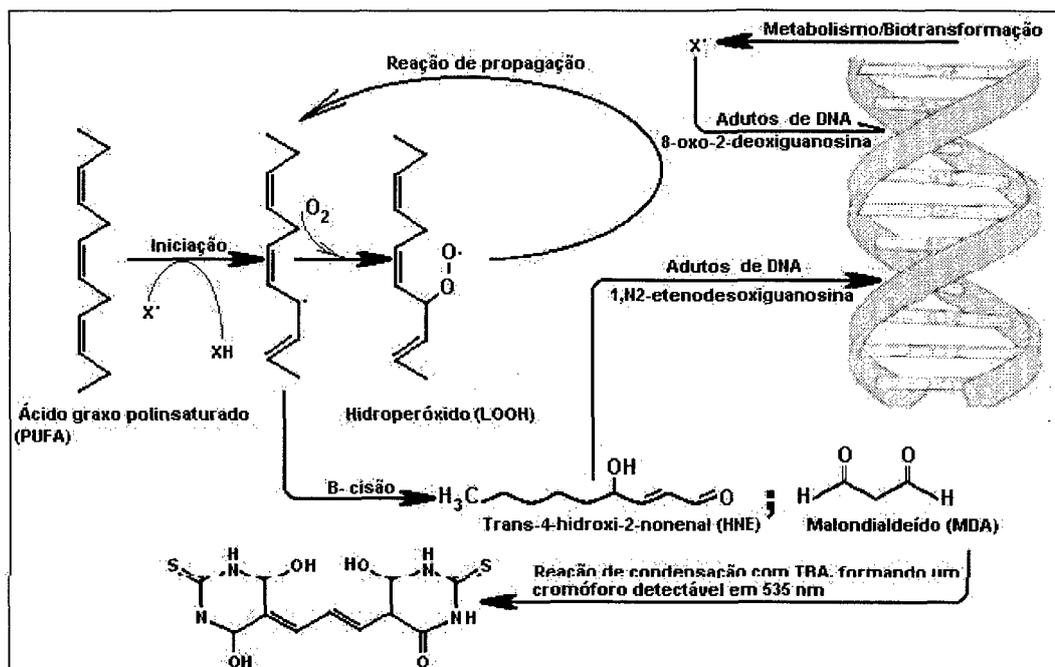
O metabolismo dos seres oxigênio-dependentes está frente a um paradoxo vital: a imprescindibilidade do  $O_2$  para a manutenção da vida e, por outro lado, sua potencial toxicidade diante de várias vias oxidativas defectíveis no processo respiratório. A geração de ERO dá-se de modo contínuo no curso do metabolismo humano, normalmente situando-se em níveis toleráveis, o que possibilita um controle antioxidante satisfatório pelos meios possíveis de inativá-los. Entretanto, existem algumas condições favorecedoras da geração das ERO, e que são inerentes às atividades normais do ser humano, tais como, a exposição prolongada à radiação solar, camada de ozônio, presença de poluentes no ar, água e alimentos, tabagismo, distúrbios genéticos e a ação de certos fármacos.

## 1.4 Estresse Oxidativo

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais, existe uma produção constante de ERO acompanhada pela sua contínua inativação, através da ação de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. A extensão e os tipos de dano causados pelos ERO depende tanto da quantidade como da qualidade ou natureza dos mesmos a que as células estão expostas, bem como das suas defesas antioxidantes. (DAVIES, 1991).

O desequilíbrio entre os mecanismos que causam condições oxidativas e das defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos, provoca uma variedade de mudanças fisiológicas, chamadas coletivamente de estresse oxidativo (CROFT, 1998), onde as ERO podem estar aumentados sem o concomitante aumento das defesas; as proteções podem estar reduzidas sem o aumento daquelas; ou a situação mais crítica, onde o aumento da concentração dos RLO vem acompanhado de uma redução paralela das defesas correspondentes (SIES, 1985; AMSTAD & CERUTTI, 1990).

O estresse oxidativo pode estar relacionado com vários processos tais como: mutagênese, carcinogênese, liperoxidação, oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (SIES, 1986) (Figura 5).



**Figura 5:** Geração de hidroperóxidos de lipídios, propagação, ataque ao DNA, formação de adutos e geração de cromóforos.

## 1.5 Defesas Antioxidantes

HALLIWELL & GUTTERIDGE (1998) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática (Quadro 01). Através de diferentes mecanismos, as ERO são inativadas de forma a impedir reações posteriores de propagação (SIES, 1993).

**Quadro 1** – Resumo das principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos

SISTEMA	FUNÇÃO
Não Enzimáticos	
$\alpha$ -Tocoferol	Intercepta reações de lipoperoxidação
$\beta$ -Caroteno	<i>Quencher</i> de $O_2$
Licopeno	<i>Quencher</i> de $O_2$
Ubiquinol 10	Sequestrador de radicais
Ácido ascórbico	Inúmeras funções antioxidantes
Ácido úrico	Sequestrador de radicais
Glutationa	Inúmeras funções antioxidantes
<b>Enzimáticos</b>	
Superóxido dismutase	Reações de dismutação de $O_2^{\bullet-}$
Catalase	Catalisa a reação sobre $H_2O_2$
Glutationa Peroxidase	Catalisa a reação sobre peróxidos
<b>Enzimáticos auxiliares</b>	
Glutationa-S-Transferase	Reação de conjugação e excreção de xenobióticos
Glutationa Redutase	Colabora no ciclo da GSH

\* Fonte: SIES, 1993

### 1.5.1 Proteções Antioxidantes Enzimáticas

As principais defesas antioxidantes enzimáticas celulares são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutaciona peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO (Figura 6) . Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil (BOVERIS & CADENAS, 1997).

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos, catalisa a dismutação do radical  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$ , (McCORD & FRIDOVICH, 1969). Durante o processo de dismutação, duas moléculas de ânion superóxido reagem sequencialmente, resultando na redução (ganho de elétrons) de uma e oxidação (perda de elétrons) de outra (FRIDOVICH, 1979):



Existem três isoformas conhecidas de SOD, que consiste numa metaloproteína: uma com átomo de ferro, encontrada somente em bactérias; outra com manganês, existente em bactérias e mitocôndrias; e a forma citosólica dos eucariontes, ostentando duplamente átomos de cobre e zinco junto a seus grupos prostéticos (FRIDOVICH, 1979).

As ações da catalase (localizada principalmente a nível de peroxissomas) e da enzima glutathiona peroxidase (majoritariamente citosólica) incidem sobre a metabolização/degradação do peróxido de hidrogênio, que pode ser visualizado na figura 8. A catalase decompõe o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e  $\text{O}_2$  (FARBER et al., 1990):



Com exceção de algumas bactérias, algas cianofíceas e alguns parasitas helmintos, a maioria das células aeróbicas possui atividade catalásica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). Nos animais, a catalase está presente em todos os principais órgãos do corpo, especialmente no fígado e nos eritrócitos, exceção às hemácias de algumas espécies de peixes (WILHELM FILHO et al., 1996). O cérebro, o coração e o músculo esquelético contêm somente pequenas quantidades de catalase (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir, por exemplo,  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  (LITTLE & O'BRIEN, 1968; CRISTOPHERSEN, 1969). Talvez a mais importante das peroxidases seja a glutathiona peroxidase (GPx), enzima que possui selênio em seu sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathiona reduzida (GSH) como doador de elétrons para a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de outros peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos provenientes da lipoperoxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela GPx ocorre a oxidação da glutathiona, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GSSG) (KELLING & SMITH, 1982). A ação combinada do trinômio enzimático (SOD, CAT e GPx), mantém a célula com concentrações reduzidas de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , evitando aumentos na geração de  $\bullet\text{OH}$  (CHANCE et al., 1979), constituindo uma estratégia comum a todos os organismos aeróbicos.

Existem enzimas acessórias que participam auxiliando na manutenção do poder redutor intracelular, tais como a glutathiona redutase (GR). Esta enzima catalisa a

redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH, permitindo, assim, a contínua regeneração da GSH e da ação da GPx (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998; RICE-EVANS et al., 1985).

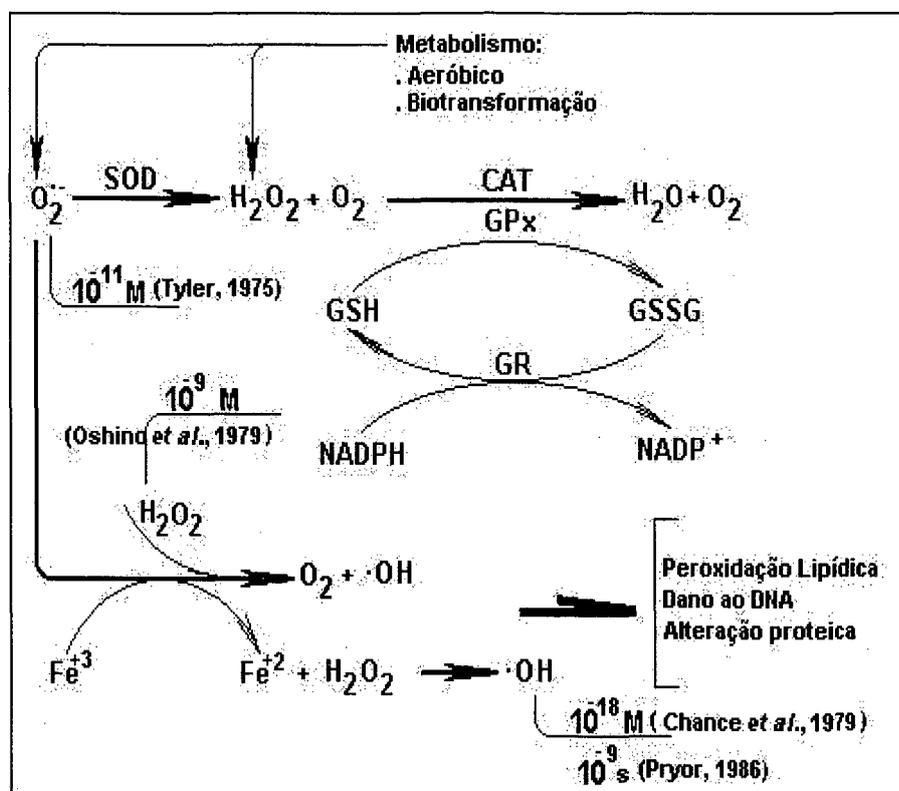


Figura 6: Interação das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de ERO e neutralização pelas enzimas citoprotetoras (Conc. para hepatócitos de ratos).

### 1.5.2 Antioxidantes não enzimáticos

O tripeptídeo glutathiona ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cistenil-glicina, GSH), está presente em concentrações de aproximadamente 1-10mM na maioria das células animais e vegetais (WILHELM FILHO et al., *in press*) A GSH é importante para as defesas antioxidantes, metabolismo de xenobióticos e ecosanóides, na regulação do ciclo celular e regulação genética (KATOH, et al., 1991; MEYER, et al., 1994; FREEMAN, et al., 1993; BERGELSON, et al., 1994; GALTER, et al., 1994). Como antioxidante, a GSH pode agir diretamente como sequestradora de radicais livres ou agir como um co-substrato junto da glutathiona peroxidase (GPx), catalisando a redução de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos lipídicos. A formação de conjugados da GSH com compostos eletrofílicos através da

ação da glutathione-S-transferase (GST), é um importante aspecto do metabolismo de xenobióticos (FORMAN, et al., 1997). Importante também é a contribuição da GSH na reciclagem de dehidroascorbato a ascorbato, por uma via enzimática onde a GSH-dehidroascorbato-redutase é preponderante (COASSIN et al., 1991; MAY et al., 1997; MENDIRATTA et al., 1998a,b). A relação de concentração entre GSH/GSSG deve ser alta para a manutenção do poder redutor intracelular (KAPPUS, 1987).

A vitamina C, presente como ascorbato na maioria dos organismos biológicos, é considerada entre os mais importantes antioxidantes dos fluidos extracelulares (STOCKER & FREI, 1991). O Ascorbato tem sido mostrado como um eficiente *scavenger* de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$  e do radical peroxil ( $\bullet OOL$ ) (ROSE, 1987). O ascorbato age protegendo biomembranas contra a peroxidação, perpetuando, desta forma, a atividade do  $\alpha$ -tocoferol, um antioxidante não enzimático lipossolúvel.

A reatividade da vitamina E com  $\bullet OOL$ , protegendo a membrana lipídica de ataques de ERO, ocorre por sua atividade antioxidante e, acredita-se, seja a sua mais importante função bioquímica *in vivo* (TAPPEL, 1962). Tal reatividade é de considerável importância, porque tocoferóis reagem com  $\bullet OOL$ , produzindo um hidroperóxido relativamente estável (LOOH) e um radical tocoferoxil, interrompendo a cadeia de propagação de ERO (SIES et al., 1993).

Além da função de precursores de vitamina A, os carotenóides têm sido caracterizados por exibirem uma característica biológica adicional, atuando como eficientes *scavengers* de ERO (BURTON & INGOLD, 1984; SIES, 1993). Outros grupos têm descrito o  $\beta$ -caroteno como um agente inibidor de peroxidação lipídica, sequestrando  $\bullet OOL$ , desta forma interrompendo a cadeia de propagação das ERO (KRINSKY & DENEKE, 1982; BURTON & INGOLD, 1984; KENNEDY & LIEBLER, 1992; PALLOZZA et al., 1992).

## 1.6 Biotransformação de Xenobióticos

A biotransformação de xenobióticos é realizada praticamente por todos os tecidos animais. O fígado, entretanto, é o principal responsável por esta função, sendo neste

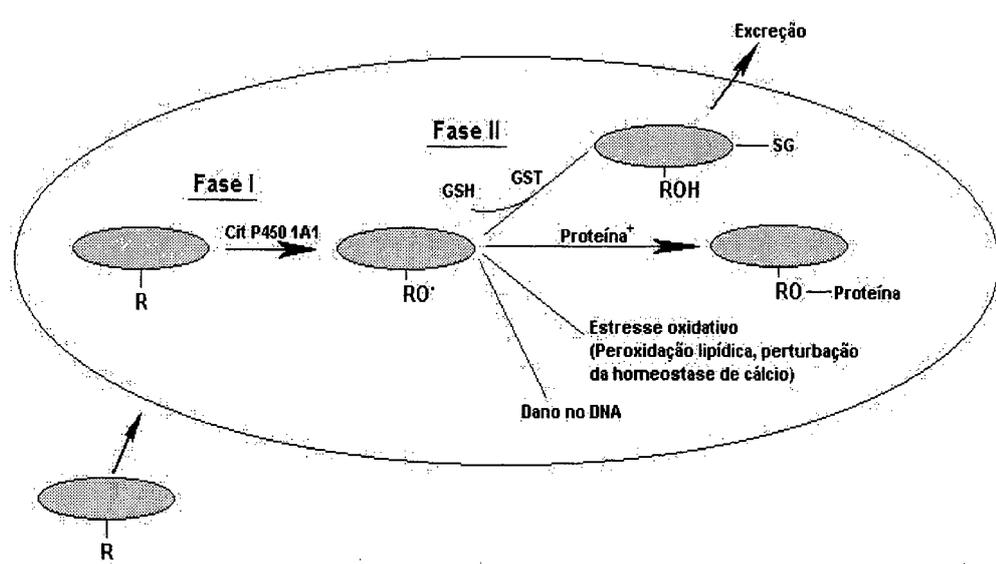
órgão, mas não exclusivamente, observados vários efeitos tóxicos associados aquele processo (COMPORTI, 1989).

Na maioria das vezes, os xenobióticos são lipofílicos e facilmente absorvidos pelas vias de entrada dos organismos (KLAASSEN & ROZMAN, 1991). Uma exposição constante a estas substâncias leva à sua acumulação no organismo. A eliminação depende, entre outros fatores, do grau de solubilidade em água. Com isso, os organismos desenvolveram mecanismos bioquímicos que transformam os xenobióticos lipofílicos em metabólitos mais hidrofílicos, para facilitar a sua excreção, consistindo em um conjunto de reações denominadas de biotransformação, formado por diferentes processos enzimáticos. O sistema enzimático citocromo P450 (CYP P450) é um dos principais responsáveis por biotransformar xenobióticos, sendo, portanto, muitas vezes a primeira linha de defesa contra estes compostos (WEI, 2000).

A biotransformação ocorre principalmente ao nível hepático, e pode ser dividida em duas fases. Nas reações de fase I, um grupo polar é introduzido à molécula, aumentando a hidrossolubilidade da mesma, deixando-a em uma forma química mais adequada para as reações de fase II. Nas reações de fase II, os compostos modificados pelas reações de fase I reagem com um substrato endógeno, produzindo compostos conjugados hidrossolúveis, que são mais facilmente excretados (HODGSON & LEVI, 1994). Nas reações da Fase II, os compostos modificados pelas reações da Fase I reagem com um substrato endógeno, principalmente através da ação das enzimas, glutationa-S-transferase e UDP-glucoronil transferase, para formar compostos conjugados hidrossolúveis, que são mais facilmente eliminados das células e do organismo. As GSTs pertencem a uma família de enzimas envolvidas na Fase II, favorecendo a conjugação da glutationa reduzida a compostos eletrofílicos (HODGSON & LEVI, 1994). O objetivo da biotransformação é produzir compostos mais solúveis para serem eliminados do organismo; no entanto, muitos compostos tornam-se mais reativos e mais tóxicos quando biotransformados.

Uma das principais reações da fase I é a monooxigenação microsomal. Esta reação é catalisada por enzimas não específicas, tais como as monooxigenases que contém flavina (FMO), ou pelo sistema multienzimático que contém o citocromo P450 (CYP450) como oxidase terminal (HODGSON & LEVI, 1994). As monooxigenações são aquelas oxidações nas quais um átomo de oxigênio molecular é reduzido à água,

enquanto outro é incorporado no substrato (TIMBRELL,1991). O passo inicial consiste da ligação do substrato ao CYP450 oxidado, seguido por uma redução de um elétron catalisado pela enzima NADPH citocromo P450 redutase, formando um complexo substrato-citocromo P450 reduzido, conforme figura 7 (HODGSON & LEVI, 1994).



**Figura 7:** Esquema generalizado do processo de biotransformação: o complexo multienzimático CYP450 cataliza a bioativação do composto (Fase I), enquanto que a conjugação e a posterior excreção é catalizada pela GST, mediante a transferência do grupamento tiol GSH.

### 1.6.1 Citocromo P450 (CYP450)

O citocromo P450 foi descrito em 1955, primeiramente como um sistema enzimático encontrado no retículo endoplasmático capaz de biotransformar xenobióticos através de um processo oxidativo. O CYP450 é composto por diferentes isoformas, e sua estrutura proteica contém um domínio heme, regiões conservadas de cisteína e o sítio do substrato na enzima. Esta estrutura permite mudanças conformacionais para a exposição do sítio ativo para a ligação do substrato (DIXON & WEBB, 1979; TANAKA, 1998).

Existem mais de 36 isoformas CYP450 identificadas e classificadas em famílias, subfamílias e isoformas específicas, com base na homologia da sequência de aminoácidos. Entretanto, o mecanismo catalítico do CYP450 é similar devido à funcionalidade conservada da região heme-tiolato, e a variação dos aminoácidos no sítio

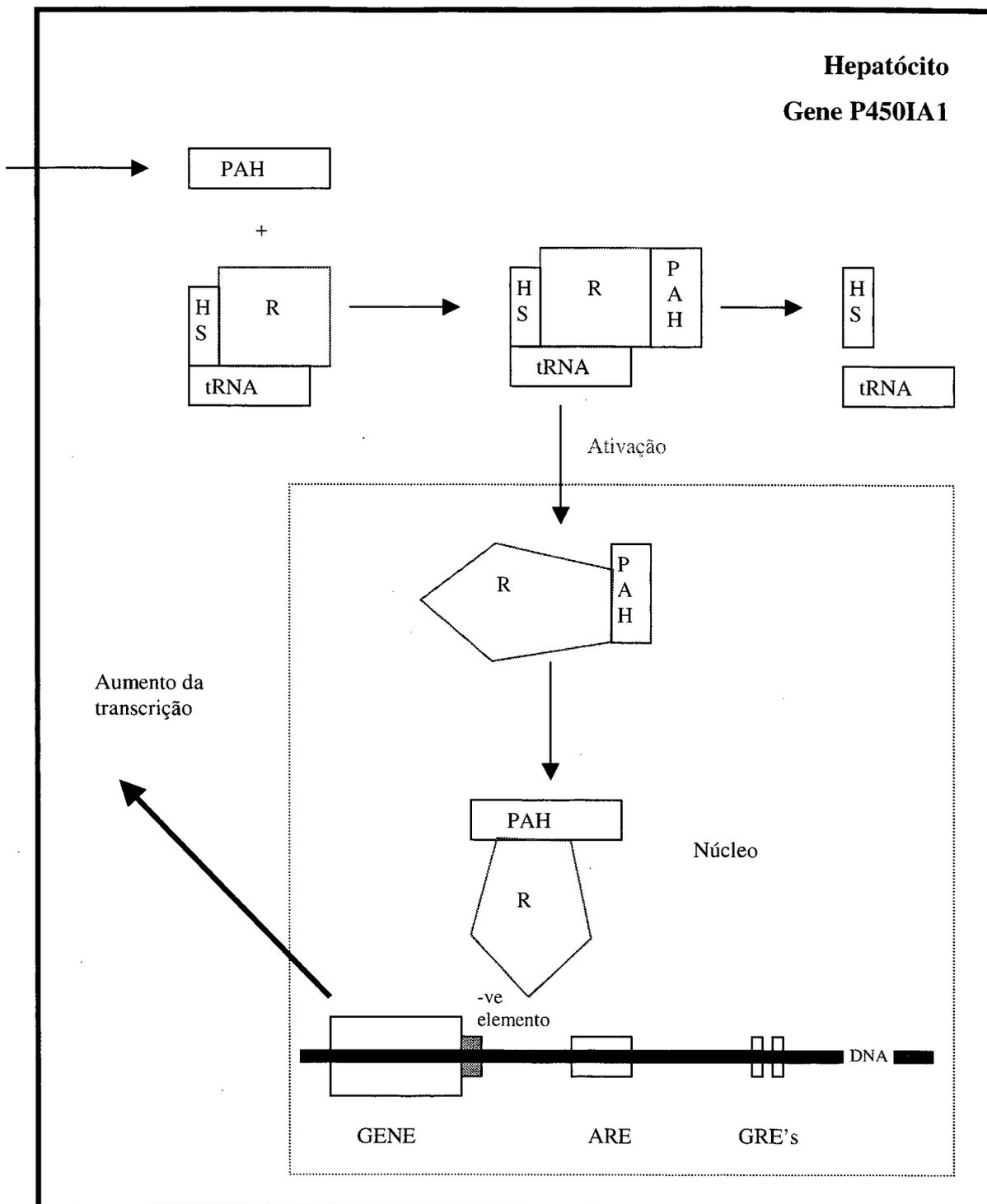
de ligação ao substrato confere uma seletividade relativa de metabolização para diferentes compostos. A biotransformação de xenobióticos é realizada principalmente pelas famílias 1, 2, 3 e 4, enquanto as outras famílias estão envolvidas no metabolismo de moléculas endógenas (LEWIS, 1996).

O CYP1A1, uma isofórmula específica, pertence ao sistema de monooxigenases citocromo P450. Paradoxalmente, enquanto estas enzimas são essenciais na detoxificação de xenobióticos, o CYP1A1 catalisa a ativação de compostos pró-carcinogênicos, frequentemente produzindo intermediários reativos mutagênicos e/ou carcinogênicos (GUENGERICH, 1990).

Vários agentes anti-micóticos imidazólicos, incluindo clotrimazol, miconazol e cetoconazol, têm efeitos inibitórios na expressão do citocromo P450 (LAVRIJSEN, 1986). Entre os fármacos benzimidazóis, como omeprazol, lansoprazol e pantoprazol, apresentam a propriedade de induzir CYP 1A1 e CYP 1A2 em hepatócitos humanos (DIAZ et al., 1990; CURI-PEDROSA et al., 1994; MASUBUCHI & OKASAKI, 1997). Os benzimidazólicos anti-helmínticos como albendazol, oxfendazol e tiabendazol, também induzem CYP1A em hepatócitos de ratos e coelhos (SOUHAILI-EL et al., 1988; GLEIZES et al., 1991; AIX et al., 1994).

Alguns genes do CYP450 são expressos constitutivamente, enquanto outros, como o CYP1A1, particularmente envolvidos com a biotransformação de xenobióticos, são induzíveis. Em muitos casos, os indutores (fármacos, inseticidas, hidrocarbonetos aromáticos e outros) também servem como substrato para as enzimas induzidas; entretanto, a atividade do CYP450 só permanece elevada enquanto há necessidade. A indução enzimática usualmente promove a detoxificação, servindo como um mecanismo de proteção ao organismo (DENISON & WHITLOCK, 1995).

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos planares, assim como os compostos carcinogênicos 3-metilcolantreno (3-MC) e  $\beta$ -naftoflavona ( $\beta$ NF) são protótipos indutores de várias enzimas do sistema CYP450, mais especificamente as isoformas 1A1/1A2 e 1B1. A  $\beta$ -naftoflavona é agonista do receptor AhR (responsável pela transcrição do gene do CYP1A1 (DENISON & WHITLOCK, 1995). Na presença de indutores, como a  $\beta$ NF, há um aumento do nível de fatores de transcrição, para os genes que codificam as diferentes isoformas.



**Figura 8:** Mecanismo proposto para o aumento da produção de enzimas pelos xenobióticos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos PAH), onde R é o receptor Ah; HS as heat shock proteins; ARE elemento responsivo a xenobiótico; GRE elemento responsivo a glicocorticóides (HODGSON & LEVI, 1994).

Esta ativação ocorre através da ligação a um receptor citoplasmático, o receptor Ah, resultando em uma ativação conformacional, a qual pode levar a alterações na

afinidade de outros compostos citoplasmáticos, como as heat shock proteins (HSP). Esta ligação inicial parece ser a causa da migração do receptor Ah para o núcleo, o qual interage com uma região específica do gene, o elemento responsivo Ah (ARE). Resultando em uma transcrição de um número de genes localizados no locus Ah, incluindo algumas isoenzimas do P450, por exemplo, a isoforma 1A1 e 1A2 (NERBERT & GONZALEZ, 1987), conforme pode ser visualizado na figura 8.

Com o rápido processo da industrialização, aumentou a exposição a vários compostos estranhos como aditivos alimentares, fármacos, contaminantes em geral, e materiais de construção. Estes compostos podem ser ingeridos com os alimentos, ar ou água, e outros intencionalmente (fármacos) ou não intencionalmente. Este processo detoxifica xenobióticos danosos, mas também pode converter fármacos utilizados na terapêutica em compostos danosos ao organismo como toxinas e carcinógenos. A ativação e a conversão enzimática de um xenobiótico freqüentemente aumenta o metabolismo de outros compostos, sendo difícil prever o efeito que muitos fármacos podem apresentar (LAZAR, 2000).

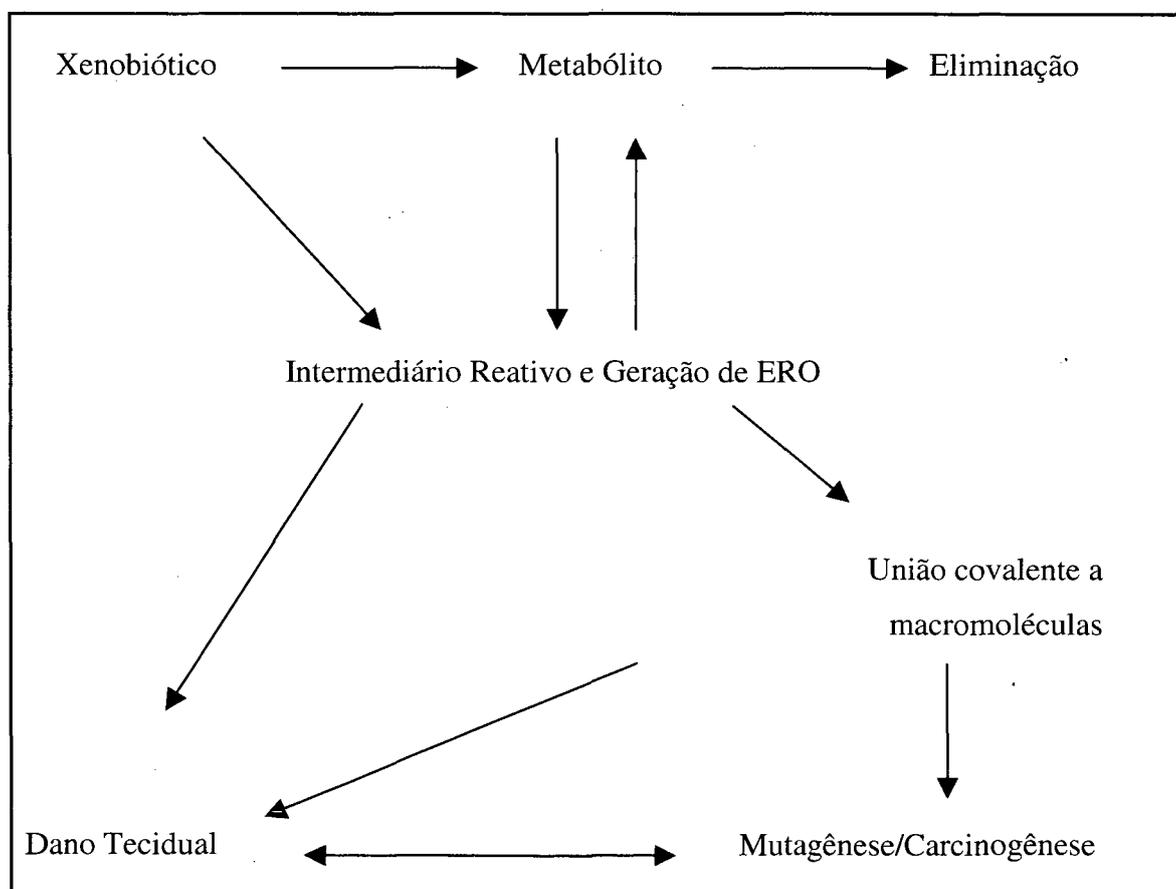
O dano celular associado ao estresse oxidativo pode ser induzido em organismos expostos a diferentes classes de xenobióticos, conforme tem sido evidenciado em vários modelos experimentais (SLATER, 1978; THURMAN et al., 1986; VAZ et al., 1989; COMPORTI, 1987, 1989; VIDELA & GUERRI, 1990; DE GROOT et al., 1991).

Normalmente as membranas biológicas são os principais sítios de dano celular, considerando que os intermediários reativos são formados, em muitos casos, no retículo endoplasmático, onde o sistema citocromo P450 está localizado (HODGSON & LEVI, 1994). Assim, qualquer caminho possível dos intermediários reativos dentro da célula encontrará as membranas das organelas ou a membrana plasmática. Desta forma, as ERO podem promover a peroxidação lipídica que, além de comprometer a integridade estrutural das membranas, vai gerar produtos tóxicos derivados, que podem se mover de dentro para fora da célula, produzindo dano em sítios distantes aos do local de formação (COMPORTI, 1989).

Determinadas situações podem perturbar o balanço entre a velocidade de formação e a de detoxificação de intermediários reativos. A indução enzimática pode aumentar a velocidade de biotransformação de um xenobiótico que, por sua vez, pode

levar a uma produção excessiva de intermediário reativo. Altas doses de um xenobiótico podem inibir rapidamente os mecanismos de defesas celulares, produzindo, então, a saturação das vias clássicas de detoxificação. Nestas condições, vias alternativas podem levar à formação de intermediários reativos, resultando em injúria celular (WENDEL, 1991). A figura 9 resume a relação entre biotransformação e toxicidade de um xenobiótico.

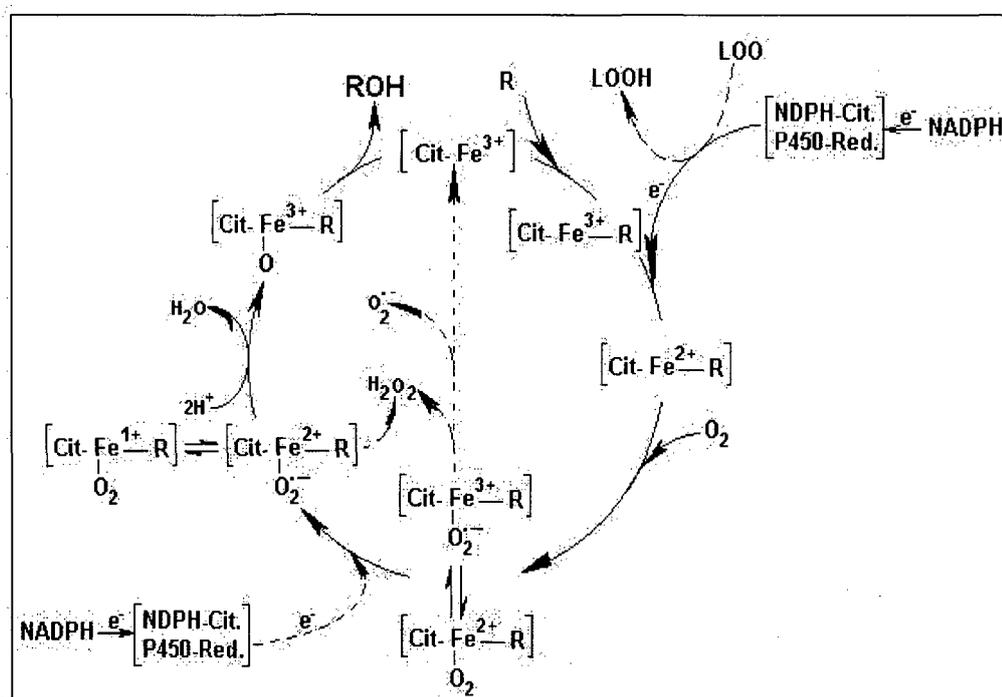
Em contraste, a ativação de carcinogênicos, fármacos e agentes tóxicos, através de oxidação ou redução, resultam na formação de pró-carcinógenos ou intermediários reativos, que normalmente não são substratos para as enzimas de conjugação e que, por sua vez, reagem covalentemente com biomoléculas (proteínas, lipídios, carboidratos, RNA, DNA), podendo causar mutações, câncer e morte celular (PARKE, 1987).



**Figura 9:** Biotransformação e toxicidade de xenobióticos

Reações do “ciclo redox” são caracterizadas pela excessiva utilização de oxigênio e pela oxidação de NADPH, que é gasto para a formação catalítica de ERO (BACHUR

et al., 1978; THOR et al., 1982). Portanto, xenobióticos que sofrem “ciclo redox” tem um potencial produtor concomitante de quantidades apreciáveis de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ , que podem se sobrepôr à proteção dada pelos diferentes mecanismos de defesa antioxidante, causando estresse oxidativo celular (DI GIULIO et al., 1989) (Figura 10).



**Figura 10:** Esquema simplificado, mostrando a sequência de eventos para as monooxigenações catalisadas pelo citocromo P450. (R) figura aqui como um xenobiótico; observar as sequências de reações formando água, o complexo ternário oxidado e o produto hidroxilado. Observar também, em função do desacoplamento do ciclo, a geração de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (HODGSON & LEVI, 1994, modificado)

## 1.7 Deficiência das defesas nos parasitas

Nos últimos anos houve um grande progresso no entendimento da bioquímica, biologia molecular e imunologia dos parasitas. Um número de aspectos peculiares característicos dos parasitas, os quais não estão presentes em outros organismos, contribui para o melhor entendimento do mecanismo de ação destes fármacos e seletivamente de ação farmacológica. Um destes aspectos é a deficiência nos mecanismos de defesa contra a toxicidade do oxigênio. ERO intermediários parecem estar envolvidos na reação das enzimas presentes nos protozoários anaeróbicos. Vários agentes antiparasitários têm mostrado exercer, em parte, suas ações através da formação de ERO (DOCAMPO, 1986).

Tem sido demonstrado que muitos metabólitos reativos de agentes antiparasitários são ERO, que conforme já mencionado, sendo moléculas com o último orbital instável com apenas um elétron de spin desemparelhado, com uma grande afinidade de reação aos constituintes celulares. Estas ERO podem oxidar resíduos de aminoácidos formando as bases de Schiff que são capazes de quebrar a fita de DNA através da alteração química das bases púricas e pirimídicas, e também provocam a peroxidação dos lipídios da membrana, conduzindo à injúria celular por desorganização da estrutura da membrana (WARD & TIMOTHY, 1997).

A sensibilidade dos parasitas aos ERO freqüentemente depende de uma deficiência nas defesas bioquímicas contra o dano provocado pelos ERO. Considerando estas deficiências no aspecto biológico dos parasitas, diferentes daquelas encontradas nos mamíferos, estes vermes são mais susceptíveis ao dano oxidativo. (DOCAMPO, 1986).

De forma semelhante, a ação tripanocida do BZN parece estar relacionada à sua capacidade de sofrer redução parcial, formando radicais quimicamente reativos que determinam a produção de ERO, como, por exemplo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (DOCAMPO & MORENO, 1984, 1986; MORELLO, 1988). Aparentemente, o *T. cruzi* apresenta baixos níveis de glutathiona reduzida e carece de catalase e glutathiona peroxidase, tornando o parasita extremamente vulnerável ao ataque dos ERO (BOVERIS et al., 1980). A reação dos ERO com macromoléculas celulares resulta em peroxidação dos lipídios e lesões de membrana, inativação enzimática, mutagênese e carcinogênese (MORENO et al., 1980).

Os tripanosomídeos perderam ou são deficientes em glutathiona (GSH), peroxidases e catalase (BOVERIS et al., 1980) e contém a maioria de sua glutathiona conjugada com uma bis-espermidina (tripanotiona  $T(SH)_2$ ) e glutathionil espermidina (GSH-SP) (SHAMES et al., 1986; FAIRLAMB, 1990; MORELLO et al., 1994; REPETTO et al., 1994). A  $T(SH)_2$  mantém o balanço redox da mesma forma que a GSH, pois os tripanosomídeos apresentam uma  $T(SH)_2$  redutase no lugar da glutathiona redutase (SHIM & FAIRLAMB, 1990).

Com base nas evidências atuais da participação do parasita na patogenia da cardiopatia chagásica, tem-se dado ênfase à terapêutica parasiticida. Além da terapêutica convencional, novas indicações, como no caso da AIDS e de transplante

cardíaco e renal, tem aumentado a utilização clínica do BZN. Entretanto, alguns autores têm demonstrado que compostos imidazólicos são capazes de induzir o sistema microsomal P450 1A1, freqüentemente associada à ativação de compostos mutagênicos e carcinogênicos, causando efeitos nocivos não apenas ao parasita, mas também ao hospedeiro.

Além disto, têm-se sugerido que um dos possíveis mecanismos de ação farmacológica de compostos com atividade tripanosomicida seria a formação de ERO, que atuaria sobre o parasita. Como o sistema P450 e, especialmente, a sub-família 1A1 está também associada à produção de ERO, observou-se o efeito do Benzonidazol sobre a expressão deste sistema enzimático, e de enzimas da fase II de biotransformação como a Glutathione S-transferase, que também está associada à inativação das ERO quando estes são gerados na fase I de biotransformação. O presente estudo avaliou o estresse oxidativo dos animais submetidos ao tratamento, pela determinação das defesas antioxidantes e do dano celular, bem como o seu potencial mutagênico, pela indução da isoforma CYP450 1A1, tendo o hospedeiro como o alvo.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a situação de estresse oxidativo das defesas antioxidantes bem como a indução de enzimas da fase I e II (CYP1A1 e GST) do sistema de biotransformação de xenobióticos que possuem uma estreita correlação com a geração de ERO, causada pelo BZN em fígados de ratos Wistar, após o tratamento dos mesmos com este fármaco em diferentes tempos de tratamento

### **2.1 Objetivos Específicos**

- ✓ Verificar as diferenças nos níveis de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, bem como nos níveis de lipoperoxidação (TBARS) no fígado de ratos tratados com BZN, comparativamente ao grupo não-tratado (grupo controle) em diferentes tempos de tratamento;
- ✓ Verificar a indução e expressão da GST e do citocromo P450 1A1, no fígado de ratos tratados com BZN, comparativamente ao grupo não tratado (grupo controle) em diferentes tempos de tratamento.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Para avaliar o potencial oxidativo do fármaco BZN foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, de aproximadamente 60 dias, não tratados previamente com fármacos anti-parasitários, pesando entre  $200 \pm 50$  gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram pesados e distribuídos em grupos de 6 indivíduos, permanecendo no biotério por um período de adaptação de 10 dias antes da realização dos experimentos, em gaiolas plásticas, mantidos em temperatura ambiente controlada  $25 \pm 2^\circ$  C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial Nuvilab CR 1 e água *ad libitum*.

### **3.2 Protocolo Experimental**

BZN foi dissolvido em óleo vegetal em uma concentração de 20mg/ml. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com doses de 20, 40 e 60mg/Kg de peso durante 4 dias. Baseado neste ensaio preliminar, a dose de 40mg/Kg de peso foi selecionada para a investigação do estudo tempo-dependente (2, 4, 8, 10 e 30 dias). O grupo controle foi tratado com óleo vegetal. No final dos tratamentos os animais foram pesados, sacrificados por deslocamento cervical, seus fígados retirados e pesados e imediatamente divididos em 3 alíquotas: uma para produção de homogenatos ácidos, uma para produção de homogenatos, e outra para preparação de microsomas.

Além disto, para avaliar a indução da atividade e expressão do citocromo P4501A1, foi feito um grupo controle positivo cujos animais foram tratados com  $\beta$ NF, um indutor específico da isoforma 1A1, 5mg/Kg de peso, dissolvida em óleo vegetal, administrado por via intraperitoneal durante 2, 4, 6, 10 e 30 dias.

### **3.3 Preparação das amostras**

#### **3.3.1 Homogenato**

Os fígados dos animais foram retirados e colocados imediatamente em gelo. Uma pequena porção retirada e pesada para a preparação dos homogenatos, obtidos em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de cloreto de sódio (1:20 p/v). A homogenização foi mantida a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 minutos. Os sobrenatantes foram mantidos a -170°C até a sua utilização para as diferentes análises das atividades enzimáticas, SOD, CAT, GR, GPx e GST, bem como do dano celular (TBARS), através de espectrofotometria.

#### **3.3.2 Extrato Ácido**

Porções do fígado foram precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:20p/v) e homogenizadas com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 minutos. Imediatamente após, foi realizada a determinação dos tióis não-proteicos (GSH, GT e GSSG) nestes sobrenadantes.

#### **3.3.3 Fração Microssomal**

Os fígados foram rapidamente removidos e homogenizados numa concentração de 16,7% com tampão Tris-sacarose 10 mM pH 7,4 e centrifugados, a 0°C a 600g por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 12000g por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi precipitado com CaCl<sub>2</sub> 8mM e em seguida centrifugado a 25000g por 15 minutos. O precipitado foi lavado com KCl 15mM/Tris 10mM pH 7,4 e centrifugado a 25000g por 15 minutos. A fração microssomal assim obtida, foi ressuspensa com tampão de conservação glicerol (SCHENKMAN, 1978). Os microssomas foram imediatamente colocados em nitrogênio líquido (-170°C) para posterior determinação da atividade EROD e realização dos Western blotting para CYP4501A1.

## **3.4 Atividade dos Marcadores do Estresse Oxidativo e das Defesas Antioxidantes**

### **3.4.1 Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)**

A avaliação da peroxidação lipídica endógena foi realizada em triplicatas, através da detecção em  $A_{535}$  nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, ou MDA, produzindo uma base de Schiff de coloração rosa (BIRD & DRAPER, 1984). Os homogenatos foram precipitados com ácido tricloroacético (TCA) a 12% e agitados vigorosamente. Em seguida foram incubados em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPTA) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73% durante 60 minutos a 100°C. Após, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C e centrifugados (5min a 10000g), e a absorbância do cromóforo medida em 535nm, sendo os valores expressos em TBARS  $\text{nmol g}^{-1}$ .

### **3.4.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas**

#### **3.4.2.1 Glutationa S-Transferase (GST)**

A atividade da glutaciona S-transferase foi medida espectrofotometricamente em 340 nm, de acordo com KEEN et al. (1974). A amostra foi adicionada em um meio contendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1 M (CDNB), glutaciona reduzida 0,1 M (GSH) e tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, contra um branco de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressas em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

#### **3.4.2.1 Catalase (CAT)**

Para análise da atividade desta enzima, utilizou-se o método descrito por AEBI (1984), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio, em 240 nm durante 20 segundos, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio 10 mM em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 preparada e titulada

no dia da análise. Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em  $\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

### 3.4.2.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm, de acordo com o método de MISRA & FRIDOVICH (1972), modificado por BOVERIS et al. (1983), mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que forma o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, onde a enzima presente na amostra retarda sua formação. Numa cubeta contendo glicina 50 mM, pH 10,2, foi adicionado adrenalina 60 mM (mantida em pH em torno de 2,0, gelo e frasco âmbar para evitar a oxidação). A velocidade de formação do adenocromo foi monitorada durante cerca de 100 segundos do início da reação (com acréscimo de absorbância a cada intervalo de 15 segundos em torno de 0,013-0,015 unidades), para então adicionar a alíquota da amostra (geralmente em torno de 10 a 70  $\mu\text{l}$ , dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 3 a 5 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD nestas condições. Os valores da SOD ( $\text{U SOD g}^{-1}$ ) expressos em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo (MISRA & FRIDOVICH; 1972).

### 3.4.2.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx dismuta o t-BuOOH gerando uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-SG), que por sua vez volta ao estado reduzido (2 GSH), pela ação da GR. A GR age mediante a oxidação de NADPH, assim, o ensaio é uma medida indireta que consiste em registrar a diminuição do NADPH. Para este ensaio, segundo FLOHÉ & GUNZLER (1984) utilizou-se amostra e ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH) 10mM colocados em meio de reação composto de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, NADPH 1mM, ácido dietilenotriaminopentaacético (DPTA) 0,005 M pH 7,0, água destilada, GSH 10mM, e 5U de GR colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio baseia-se na medida do decréscimo de absorbância (340 nm), promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de t-

BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

#### **3.4.2.4 Glutationa Redutase (GR)**

O método utilizado para a análise da atividade desta enzima foi proposto por CARLBERG & MANNERVICK (1985), onde se verifica durante 30 segundos, em 340 nm, a taxa de oxidação do NADPH, devido à redução da GSSG pela GR presente na amostra, em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0; NADPH 1mM; GSSG e DPTA 5mM. Os valores da atividade foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ .

### **3.4.3 Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas**

#### **3.4.3.1 Glutationa Reduzida (GSH)**

Para avaliar a concentração hepática de pequenos tióis em precipitado ácido, foi empregado o método de BEUTLER (1963). A adição de ácido 2-nitrobenzóico 2,5 mM (DTNB) nas cubetas contendo tampão Tris-HCL 0.2 M pH 8,0 e amostra, permite, após cerca de 3 minutos, a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. As concentrações obtidas neste ensaio foram expressas em mM.

#### **3.4.3.2 Glutationa Total (GT) e Glutationa Oxidada (GSSG)**

Para esta análise utilizou-se o método enzimático de TIETZE (1969), onde a taxa de oxidação do NADPH usada na redução da GSSG, catalisada pela GR, permite avaliar indiretamente a concentração da glutatona total presente na amostra. As concentrações obtidas neste ensaio foram expressas em mM. Os valores de GSSG foram calculados em equivalentes ( $2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$ ), a partir da concentração da glutatona total.

### **3.4.4 Análise do Citocromo P4501A1**

#### **3.4.4.1 Concentração de Proteínas**

A concentração de proteínas foi mensurada pelo método descrito por LOWRY , 1951, utilizando como padrão albumina bovina.

#### **3.4.4.2 Atividade da Etoxiresorufina-*O*-deetilase – EROD**

A atividade da 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase, correspondente à atividade do CYP4501A1 no fígado de ratos, foi medida por espectrofluorimetria em preparações microssomais. O substrato 7-etoxiresorufina-*O*-deetilase foi incubado com microssomas (1mg proteína/ml) a 35°C na presença de NADPH em pH 7,8, e o produto formado foi determinado fluorimetricamente. A resorufina foi utilizada como padrão interno para cálculo do coeficiente de extinção molar (PROUGH, 1978).

#### **3.4.4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para separação das proteínas:**

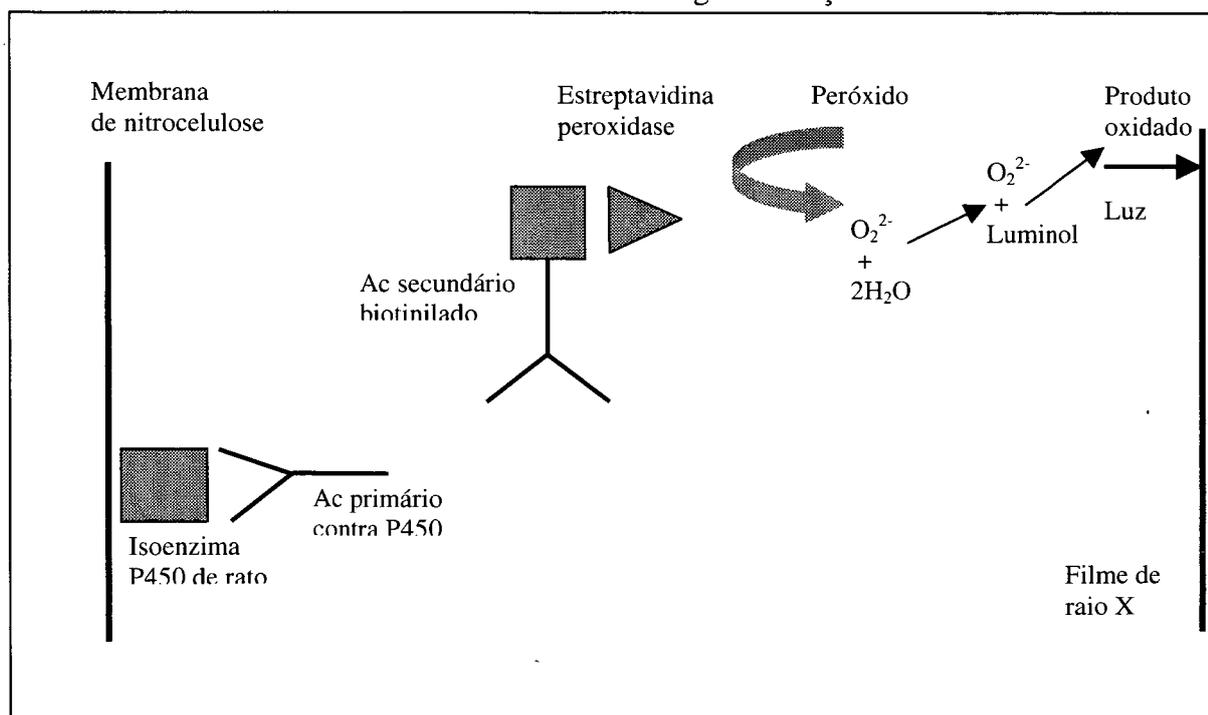
A eletroforese foi executada de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970), em gel de poliacrilamida em sistema miniVE. O gel de concentração e o gel de migração foram preparados em uma concentração de 5 e 7,5% respectivamente. As amostras foram tratadas com tampão Tris-glicina (4,2 x 10<sup>-3</sup>M de Ditioneitol - DDT, 10% de SDS, 1M de Tris pH 6,8: 50% de Glicina, 0,2% de Azul de Bromofenol) e fervidas em banho maria durante 5 minutos em tubos de Eppendorf. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel em uma concentração de 70 µg de proteína e a corrida eletroforética foi executada em tampão de corrida (Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), com corrente constante de 20 mA e 120 V, durante aproximadamente 2 horas.

#### **3.4.4.4 Imunoblotting**

OA eletrotransferência foi executada em sistema de transferência miniVE (Amersham) para transferência de proteínas em membrana de nitrocelulose (0,45µM diâmetro do poro) de acordo com o método de TOWBIN (1979). O gel e a nitrocelulose foram colocados em contato em meio contendo tampão de transferência (Tris 24,8 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20%). Em seguida aplicou-se uma corrente constante de 400

mA e tensão de 20 V durante 1 hora e 30 minutos. No final da transferência a membrana foi incubada com Vermelho de Ponceau (0,2% de vermelho de Ponceau em 3% de ácido acético), para verificar a transferência de proteínas.

As membranas foram saturadas com uma solução de 5% leite Molico desnatado em tampão TBS-Tween incubadas durante 1 hora. Após procedeu-se a lavagem das membranas com tampão TBS-T e em seguida estas foram incubadas com o anticorpo primário (anti- CYP4501A1 1:30000 – RPN 256-Batch 16119-Amersham) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e incubadas com anticorpo secundário biotilado anti IgG de coelho conjugado à biotina (1:30000 Sigma) durante 1 hora à 37°C. Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com estreptavidina (1:5000 Sigma). Em seguida as membranas foram lavadas novamente com tampão TBS-T e realizada a imunorevelação com ECL, método de quimioluminescência, onde ocorre uma dissipação de energia por uma substância quimicamente excitada; este sistema catalisa a oxidação do luminol na presença de peróxido de hidrogênio em meio alcalino. Imediatamente após a oxidação, o luminol encontra-se no estado excitado emitindo luz, a qual é visualizada por uma exposição em filme de raio X. Isto ocorre de acordo com a seguinte reação:



### **3.5 Tratamento Estatístico Dos Dados**

A análise estatística dos resultados foi realizada através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey–Kramer, e/ou teste de Bartlett, quando necessário, admitindo um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da indução e da expressão do CYP1A1

#### 4.1.1 Atividade EROD dose dependente

Para avaliar os efeitos do BZN na expressão do CYP1A1 hepático, bem como estabelecer os níveis de exposição ao fármaco, um estudo de múltiplas doses foi realizado. Ratos foram tratados com doses crescentes de BZN em questão durante 4 dias e uma relação dose-resposta para atividade EROD foi determinada. A figura 9 mostra um crescente aumento da atividade EROD nos microsomas de fígados de ratos tratados com  $\beta$ NF, um indutor específico do CYP1A1; de forma semelhante, o BZN também demonstrou níveis significativamente elevados da atividade EROD em baixas doses, como 20 mg/Kg peso. A  $\beta$ -NF causou uma indução aproximadamente 7 vezes maior quando comparado ao BZN; todavia, este fármaco mostrou indução significativa em doses consideradas terapêuticas (20 e 40 mg/Kg de peso). Quando comparados com os controles, os animais tratados com BZN apresentaram atividade EROD aproximadamente 6 vezes maiores (Figura 11).

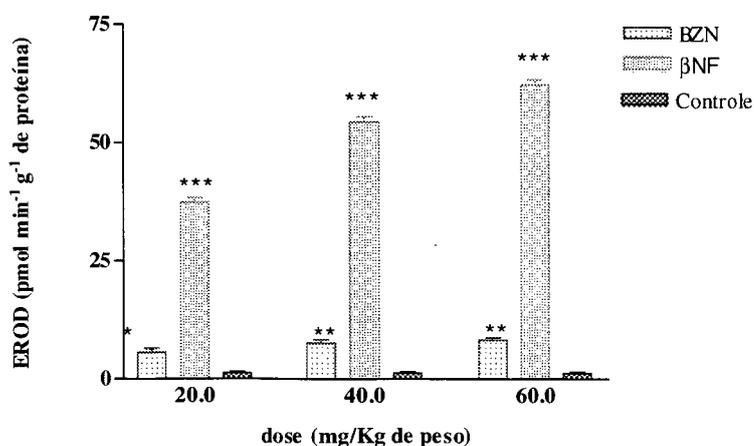


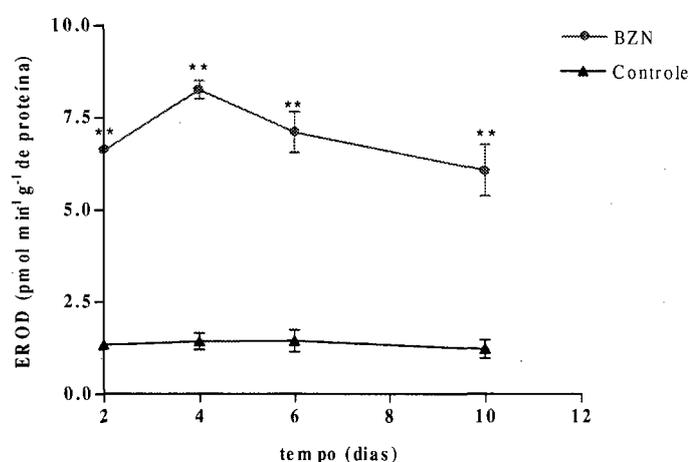
Figura 11: Atividade EROD ( $\text{pmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  de proteína) de microsomas de fígado de ratos tratados com 20, 40 e 60 mg/Kg de peso de BZN,  $\beta$ NF e controle. (\*\*\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,001$ ) em relação aos controles. (\*\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação aos controles. (\*)

demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM,  $n = 6$ .

Baseado neste estudo preliminar com múltiplas doses, e por localizar-se em faixa de dose utilizada terapêuticamente, a dose de 40mg/Kg peso foi selecionada para as investigações posteriores em um estudo tempo-dependente.

#### 4.1.2 Atividade EROD tempo-dependente

A atividade da 7-etoxiresorufina-O-deetilase mostrou-se aproximadamente 6 vezes maior no animais tratados com BZN em relação ao grupo controle. Este aumento na atividade do CYP1A1 foi observado ao longo do tempo, sendo que a maior atividade foi medida em 4 dias de tratamento, como mostra a figura 12.



**Figura 12:** Atividade EROD ( $\text{pmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) de microsomas de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN e controles durante 2, 4, 6 e 10 dias. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . (\*\*\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação aos controles.

Através da análise densitométrica das bandas (Figura 13), observou-se uma clara e evidente indução na expressão do sistema enzimático CYP4501A1, nos animais tratados com BZN em relação ao grupo controle. De acordo com os dados relacionados à atividade EROD (Figura 12), obteve-se um aumento tempo-dependente na indução e na expressão do CYP1A1, o qual mostrou maior expressão proteica em 4 dias.

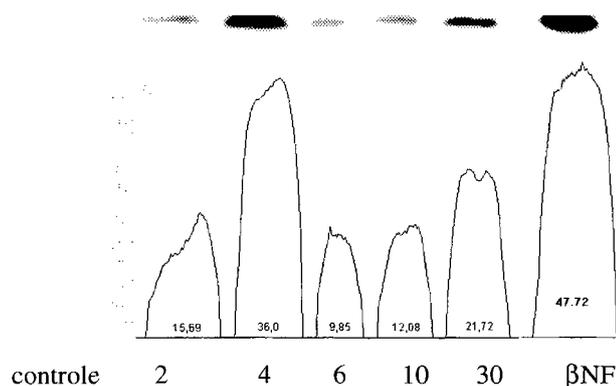
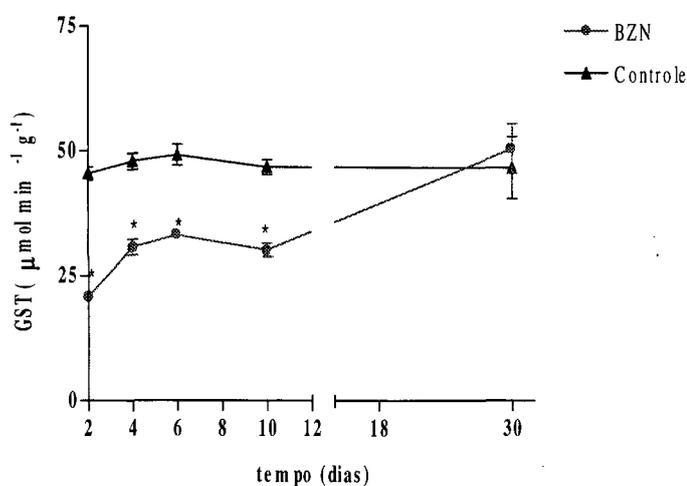


Figura 13: Western blotting (acima) do CYP1A1 de microsomas de fígado de ratos controle, ratos tratados com BZN 40mg/Kg de peso durante 2, 4, 6, 10 e 30 dias e 5mg/Kg de peso de  $\beta$ NF durante 10 dias, com suas respectivas leituras densitométricas (abaixo).

## 4.2 Atividade da GST

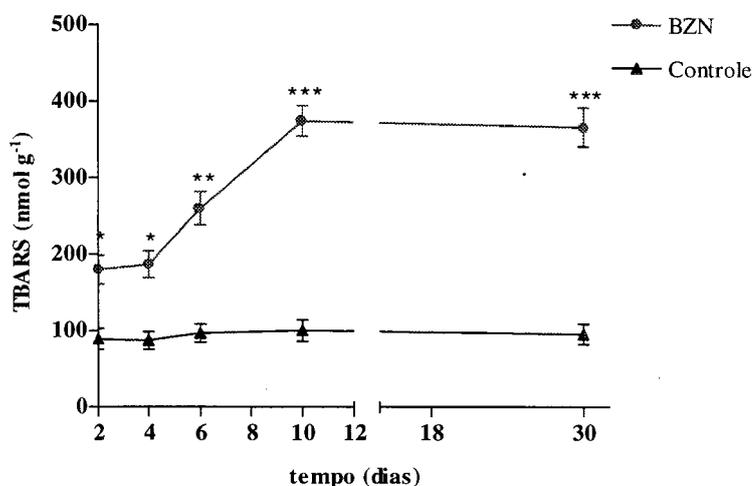
A atividade da glutathiona S-transferase, enzima da fase II de biotransformação de fármacos, foi significativamente diminuída nos primeiros 10 dias do período experimental (Figura14), indicando que o BZN tem um efeito inibitório nesta enzima. O decréscimo na atividade da GST foi evidenciado com maior intensidade com 2 dias de tratamento. Durante o seguimento do tratamento, a atividade desta enzima permaneceu diminuída em relação ao controle, porém, com tendência à recuperação dos níveis normais com 30 dias de tratamento.



**Figura 14:** Atividade da glutathiona S-transferase (GST;  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em hepatócitos de ratos tratados com 40 mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles.

### 4.3 Dano Celular (medida de concentração de TBARS)

A determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenatos de fígado representa uma forma de medida indireta do processo de lipoperoxidação *in vivo*. Os valores médios de TBARS verificados nestes homogenatos foram aumentando progressivamente com o tempo de tratamento com BZN, indicando que este aumento foi tempo-dependente (Figura 15). Quando comparados aos controles, os animais tratados mostraram um aumento de aproximadamente 90% em 2 e 4 dias de tratamento, seguido de aproximadamente 180% em 6 dias, alcançando níveis de aproximadamente 280% vezes maiores com 10 e 30 dias de tratamento, quando permaneceram estáveis.

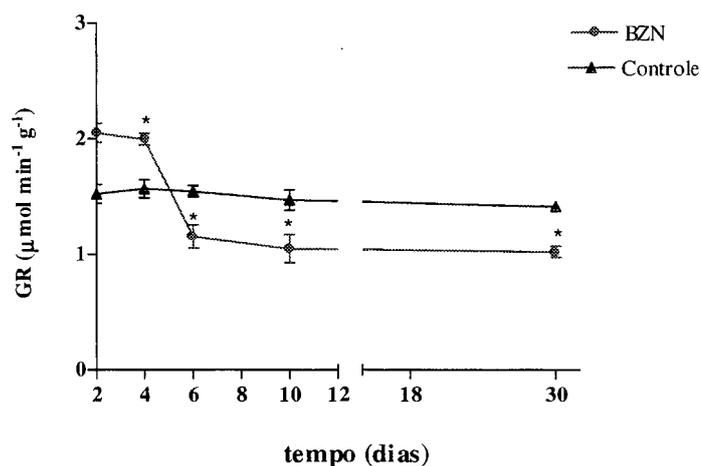


**Figura 15:** Concentração de TBARS (nmol g<sup>-1</sup>) em hepatócitos de ratos tratados com 40 mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*\*\*) demonstra diferença significativa (p<0,001) em relação aos controles. (\*\*) demonstra diferença significativa (p<0,01) em relação aos controles. (\*) demonstra diferença significativa (p<0,05) em relação aos controles.

## 4.4 Antioxidantes enzimáticos

### 4.4.1 Glutationa Redutase

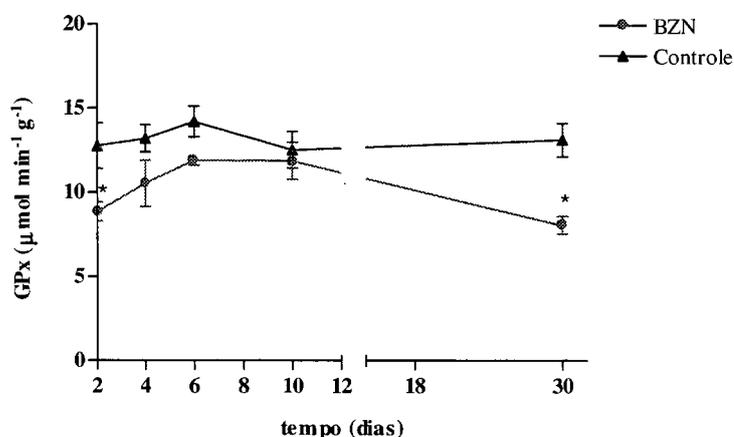
A atividade da glutatona redutase foi significativamente aumentada em 2 e 4 dias de tratamento, e significativamente diminuída nos últimos estágios do tratamento (6, 10 e 30 dias) (Figura 16), sugerindo um efeito inibitório ao longo do tempo do BZN nesta enzima.



**Figura 16:** Atividade da glutatona redutase (GR;  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em hepatócitos de ratos tratados com 40 mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles.

#### 4.4.2 Glutathiona Peroxidase

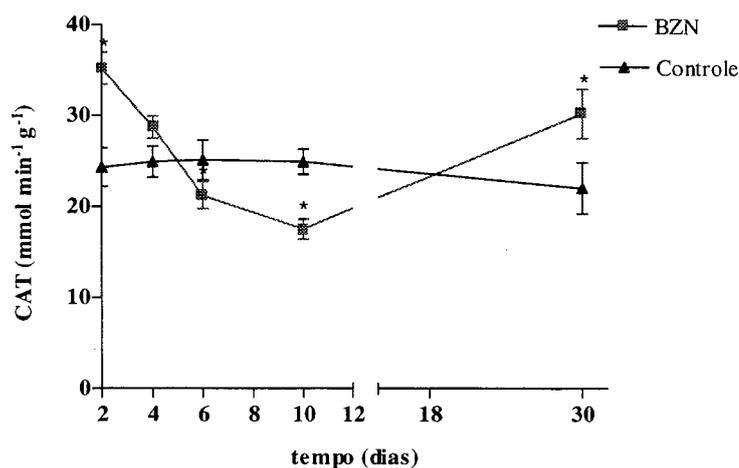
No início do tratamento (2 dias) a atividade da GPx mostrou-se significativamente diminuída em relação ao grupo controle, demonstrando um atraso na resposta a presença do BZN, ou bloqueio da sua atividade. No intervalo correspondente a 4 e 10 dias de tratamento, observou-se uma tendência compensatória da GPx, equiparando-se aos valores do grupo controle (Figura 17). Com 30 dias de administração do fármaco, novamente a GPx apresenta um comportamento inibitório, possivelmente relacionado com o efeito crônico do tratamento.



**Figura 17:** Atividade da glutatona peroxidase (GPx;  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) em hepatócitos de ratos tratados com 40 mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles.

#### 4.4.3 Catalase

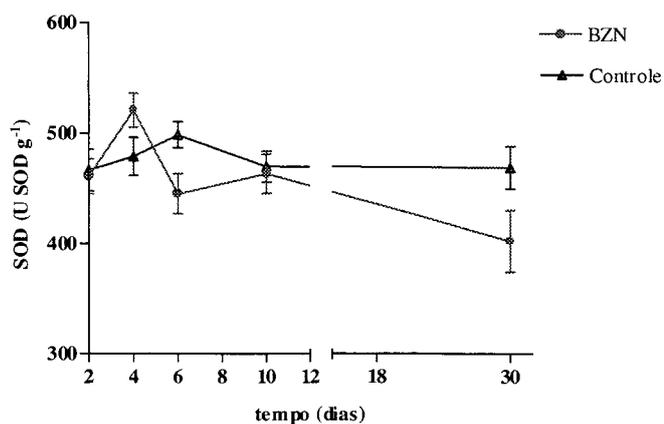
A atividade da CAT mostrou-se elevada já no segundo dia de tratamento, ( $35,2 \pm 1,8 \text{ mmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) quando comparada ao grupo controle ( $24,3 \pm 2,1 \text{ mmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) (Figura 16), seguido por uma diminuição significativa em sua atividade em 6 e 10 dias de tratamento ( $21,2 \pm 1,5$  e  $17,5 \pm 1,1 \text{ mmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ). Todavia, com a evolução do período de tratamento, a atividade desta enzima, novamente mostrou-se significativamente aumentada com 30 dias de tratamento (Figura 18).



**Figura 18:** Atividade da catalase (CAT;  $\text{mmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) em hepatócitos de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores são expressos como a média  $\pm$  SEM,  $n = 6$ .(\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles.

#### 4.4.4 Superóxido dismutase

Não foram evidenciadas diferenças significativas na atividade da SOD durante todo o período experimental (Figura 19).

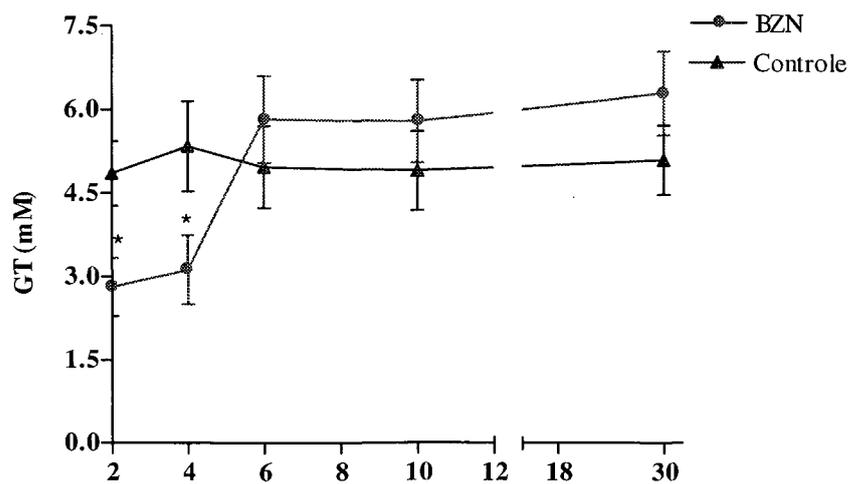


**Figura 19:** Atividade da superóxido dismutase (SOD; U SOD g<sup>-1</sup>) em hepatócitos de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6.

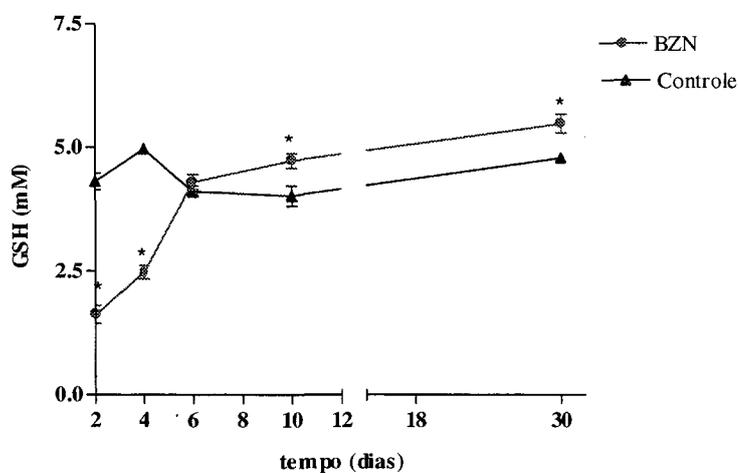
## 4.5 Antioxidantes não enzimáticos

### 4.5.1 Glutaciona Total; Glutaciona reduzida e Glutaciona Oxidada

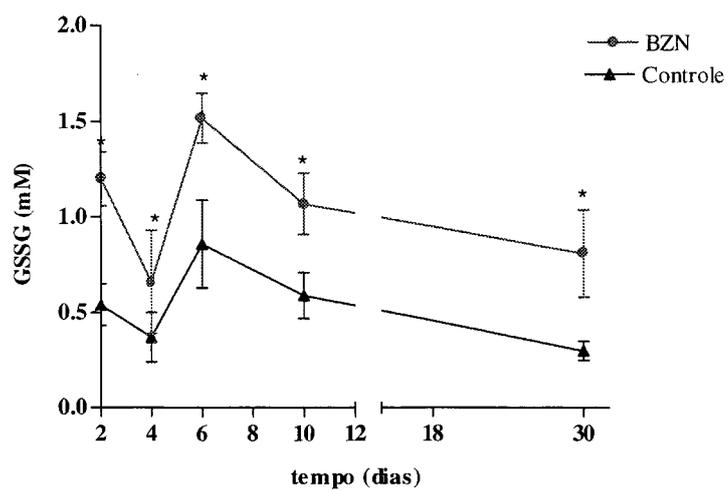
Durante o período experimental foi observada uma semelhança de comportamento no que se refere aos níveis de glutaciona total e reduzida (Figuras 20-21). Ambas, no início do tratamento (2 e 4 dias), apresentaram um decréscimo significativo em seus níveis. A partir do sexto dia, apresentaram um comportamento aparentemente compensatório, equiparando-se aos controles no final do tratamento (10 e 30 dias), onde os níveis de GSH estavam mais altos que o controle e os níveis de GT similares aos do grupo controle (Figuras 20 e 21). Os níveis de GSSG apresentaram valores mais altos quando comparados aos animais controle durante todo o período experimental (Figura 22).



**Figura 20:** Níveis de glutatona total (GT) em hepatócitos de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles.



**Figura 21:** Níveis de glutatona reduzida (GSH) em hepatócitos de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles



**Figura 22:** Níveis de glutatona oxidada (GSSG) em hepatócitos de ratos tratados com 40mg/Kg de peso de BZN por diferentes períodos de tempo. Todos os valores foram expressos como a média  $\pm$  SEM, n = 6. (\*) demonstra diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles.

## 5 DISCUSSÃO

A quimioterapia da doença de Chagas é ainda muito inadequada. Apenas dois fármacos são utilizados para esta finalidade, nifurtimox e o benzonidazol, sendo que o primeiro não vem sendo mais utilizado no Brasil devido à gravidade de seus efeitos tóxicos. A capacidade da cura parasitária destes fármacos não está muito clara e a sua utilização está associada à alta incidência de sérios efeitos colaterais (MORELLO, 1988).

As controvérsias sobre a importância da quimioterapia da doença de Chagas está associada à eficiência do tratamento. Pesquisas recentes sobre a alta incidência de neoplasias em pacientes transplantados que fizeram uso do BZN (BOCCHI, 1999), sugerem a necessidade de um melhor conhecimento da correlação risco/benefício deste fármaco, bem como da pesquisa de novos fármacos mais efetivos e com efeitos colaterais menores.

Os dados aqui apresentados mostraram claramente uma elevação da atividade EROD, medida indireta do CYP1A1 e atividade específica desta isoforma, sustentada durante o período de tratamento (figura 10) e dose-dependente (figura 9). Confirmando estes dados, a medida da expressão proteica do CYP1A1 avaliada por Western blotting apresentou um perfil de estabilização e elevação similar à sua atividade. Desta forma, assume-se que a elevação da atividade específica, efetivamente traduz uma elevação na concentração/expressão da proteína/enzima CYP1A1. Portanto, podemos considerar que o BZN deve ser um indutor do CYP1A1, e que o efeito indutivo parece ser tempo e dose-dependente. As enzimas do CYP450 têm grande importância no metabolismo oxidativo de xenobióticos. A utilização do oxigênio molecular combinado com a oxidação do NADPH reflete o mecanismo pelo qual estes compostos são metabolizados, e o resultado deste processo enzimático é uma fonte de ERO (SEVANI et al., 1990). Considerando que a peroxidação lipídica aumenta em correlação linear com a indução do CYP1A1, os níveis de TBARS estão provavelmente refletindo a geração de ERO por este sistema de biotransformação. Este alto índice de oxidação lipídica indica que os animais estão participando de um processo oxidativo, e que o CYP1A1 deve ter um

importante papel na toxicidade tecidual. Entretanto, estudos mais aprofundados deveriam ser realizados para que se pudesse efetivamente comprovar a hipótese de elevação dos níveis de ERO via CYP4501A1.

De acordo com BARKER, et al. (1994), a manutenção de uma diminuída expressão hepática do CYP1A1 durante uma situação de estresse oxidativo pode ser parte de uma resposta adaptativa do fígado, a fim de minimizar o dano celular. Uma diminuição na atividade do sistema de oxidases poderia diminuir tanto a conversão de carcinógenos em intermediários reativos, como reduzir a produção de hidroperóxidos e radicais hidroxil.

O sistema de monooxigenases citocromo P450 consiste em uma grande família de enzimas responsáveis pela oxidação de xenobióticos. A subfamília CYP1A1 tem um importante papel na bioativação de um grande número de carcinógenos químicos e contaminantes ambientais. Fatores endógenos e exógenos como esteróides, fármacos e produtos químicos podem modular as enzimas do citocromo P450. Alterações no “pool” das enzimas do P450 podem influenciar no processo de biotransformação de xenobióticos em animais experimentais (GUENGERICH, 1990). O uso de omeprazol leva à indução do CYP1A1 em cultura primária de hepatócitos humanos (CURI-PEDROSA et al., 1994). Vários estudos utilizando hepatócitos de coelho tem mostrado um aumento similar na expressão do CYP 1A1, em resposta a derivados benzimidazólicos como lansoprazol, tiabendazol e pantoprazol (CURI-PEDROSA, et al., 1994; RICHARD et al., 1995; MASUBUCHI, 1997), demonstrando a possibilidade dos efeitos tóxicos destas enzimas quando biotransformam fármacos e carcinógenos. Como a utilização de certos fármacos é indispensável, é necessário conhecer o processo de biotransformação e seus metabólitos ativos, para que haja uma correlação com o dano oxidativo e o potencial mutagênico e carcinogênico, bem como, uma avaliação do risco/benefício na sua utilização.

Como já mencionado anteriormente, além dos distúrbios gerais e digestivos, o BZN causa sérios efeitos adversos como reações de hipersensibilidade, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica. O quadro mais preocupante está associado à depressão da medula óssea, caracterizado por granulocitopenia, em especial, neutropenia, que, em geral, passa despercebida. Todavia, esta discrasia sanguínea pode

chegar à agranulocitose, com angina e febre alta por septicemia (CANÇADO & CHUSTER, 1985).

A depressão da medula óssea, provocada pelo uso do BZN, está provavelmente relacionada com a sua estrutura química. Provavelmente o BZN é biotransformado pelo CYP1A1, ocasionando uma nitroredução no grupo nitro ligado ao imidazol, formando assim um grande radical livre e produzindo ERO, as quais são co-produtos do processo de biotransformação. É possível que estas espécies agressivas e altamente reativas estejam relacionadas com o processo de depressão medular.

Outra grave complicação observada na terapia com BZN, em especial em indivíduos que utilizaram BZN em doses tóxicas (doses superiores a 8mg/Kg/dia, usadas por mais de 30 dias, mais precisamente quando ultrapassar a dose total de 15g), é a polineuropatia periférica (CANÇADO & CHUSTER, 1995). Este efeito é dose-dependente e pode assumir gravidade causando sofrimento ao paciente. Nossos resultados relacionados com a atividade EROD e Western blotting para CYP1A1, demonstraram que a indução deste sistema de biotransformação é dose-dependente e mantêm-se elevada durante todo o tempo de tratamento, sugerindo a participação da indução do CYP1A1 neste tipo de manifestação. A regressão dos sintomas é lenta, e em alguns casos, a polineuropatia aparece até uma semana depois de terminado um tratamento bem tolerado. Este fato vem ao encontro de observação de que a indução do CYP1A1 pelo uso do BZN ocorre de maneira progressiva, e, provavelmente seus efeitos deletérios são observados por um determinado período após findado o tratamento, demonstrando um efeito cumulativo, pois é fato que a repetição do tratamento, mesmo após longos intervalos e com doses menores, pode provocar o reaparecimento da polineurite (CANÇADO & CHUSTER, 1995).

A glutathione S-transferase compreende uma grande família de enzimas capazes de detoxificar uma grande variedade de compostos catalisando a sua conjugação com a GSH (SAGARA, et al., 1998). Um aumento da atividade da GST pode combater os efeitos das ERO produzidas no processo de detoxificação endógeno ou de fontes exógenas. Como a GST também tem um papel na neutralização das ERO, os dados aqui obtidos sugerem que a GST foi inibida pelo BZN, refletindo uma diminuição da capacidade antioxidante combinada com a alta peroxidação lipídica nos hepatócitos expostos ao BZN. Além disso, a diminuição do conteúdo de GSH (co-fator da GST)

observada no início do tratamento com BZN também poderia ter contribuído para a diminuição da atividade da GST. É interessante observar que a atividade da GST encontrada no *T. cruzi* é aproximadamente uma ordem de magnitude menor do que aquela usualmente presente nos mamíferos (MONCADA et al., 1989), e esta diferença pode tornar o parasita mais susceptível do que o hospedeiro às ERO geradas por fármacos como o BZN.

A expressão máxima do CYP1A1 no quarto dia de tratamento coincide com uma série de alterações em tremos das defesas antioxidantes. Este resultado refletiu a resposta-sentinela do organismo frente à exposição ao fármaco, que seria sucedida pela acomodação no comportamento daqueles parâmetros, constituindo uma resposta adaptativa à presença do xenobiótico (HODGSON & LEVI, 1994)

Relativamente às defesas antioxidantes, diferentemente da CAT, a atividade da SOD permaneceu inalterada durante todo o período experimental. A SOD catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  para  $O_2$  e  $H_2O_2$ , representando a primeira linha de defesa contra as ERO. A CAT catalisa a decomposição do  $H_2O_2$  para produzir água e oxigênio molecular, e, devido a este fato, tem um importante papel na proteção das células contra o dano oxidativo. A elevada atividade da CAT em 2 dias de tratamento sugere uma alta geração de peróxido de hidrogênio no início do período experimental. A diminuição na atividade da CAT no final do período experimental, poderia determinar um aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio dentro da célula, elevando o risco de um estresse oxidativo (NEBERT et al., 2000; BOVERIS & CADENAS, 1997).

A GPx possui uma função complementar à CAT, sendo, contudo, mais importante nas reações de detoxificação dos peróxidos orgânicos produzidos durante o estabelecimento do estresse oxidativo (FLOHÉ, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1998). Neste estudo, o comportamento na atividade da GPx mostrou-se o inverso da CAT. A atividade da GPx esteve inibida no início e no final do tratamento, enquanto que a CAT esteve inibida em uma etapa intermediária do tratamento, demonstrando que o BZN parece inibir tanto a GPx como a CAT, todavia de modo diferenciado.

A glutatona, um tripeptídeo que contém cisteína, tem um importante papel na defesa celular contra o estresse oxidativo (MEISTER, 1983), e também protege as

células contra outros insultos tóxicos como xenobióticos e processos infecciosos. Como todas as células eucariontes contêm altas concentrações de GSH (WILHELM FILHO et al., *in press*) e a depleção deste peptídeo causa um imediato dano celular, a manutenção dos níveis adequados de GSH é indispensável para a sobrevivência e o desenvolvimento das funções normais das células (KOSOWER & KOSOWER, 1978). Neste contexto, é interessante observar que as concentrações totais de tióis no *T. cruzi* (considerando GSH e tripanotona, TSH, 0,60-1,20mM), são pelo menos 5 vezes menores do que as concentrações nos vertebrados (~ 1-10 mM) (BOVERIS et al., 1980), e esta diferença reflete seu metabolismo oxidativo. A depleção dos níveis de glutatona observada no início do período experimental foi seguida por um aumento destes valores em 10 e 30 dias de tratamento, demonstrando a capacidade da célula hepática em adaptar-se a presença deste fármaco. MONCADA, (1989) demonstrou *in vitro* um decréscimo similar no conteúdo de glutatona, utilizando concentrações de BZN mais altas que as utilizadas em nosso ensaio. A depleção de glutatona isoladamente não deve ser um requerimento necessário para a estimulação do processo de peroxidação lipídica. De acordo com DUBIN et al., (1984), a geração de ERO através do ciclo redox dos fármacos heterocíclicos deve ser o fator determinante no processo peroxidativo, e no aumento deste processo pela diminuição da capacidade antioxidante celular ou vice-versa.

O processo enzimático e não enzimático de detoxificação de ERO por GSH produz glutatona oxidada (GSSG). Como pequenos aumentos das concentrações de GSSG depois de um insulto tóxico e um estresse oxidativo é muito deletério para as células, a GSSG é transportada para o compartimento extracelular quando uma concentração crítica de GSSG é atingida no citoplasma, causando uma depleção no nível intracelular de glutatona (MEISTER, 1983). Níveis de GSSG acima de 1-2 % são tóxicos e considerados um índice de dano oxidativo em células de mamíferos (KOSOWER & KOSOWER, 1978; MEISTER, 1983). A glutatona redutase (GR) regenera GSH a partir de GSSG em presença de NADPH, e altas razões de regeneração podem prevenir a perda celular de GSH. A inibição da atividade da GR observada no início do período experimental, provavelmente, ocorreu no sentido de compensar a depleção de GSH verificada no 2º e no 4º dia de tratamento. A inibição da GR a partir do 6º dia, até o final do período experimental parece constituir um fenômeno comum desta enzima frente a fármacos nitroheterocíclicos (DUBIN et al., 1984). A diminuição

da atividade da GR não possibilitaria a recuperação da GSH, conforme verificado. Entretanto, os aumentos nas concentrações de GT sugerem que ocorre uma síntese de novo da glutatona. Isto poderia ser confirmado através das análises das enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase, no sentido de verificar o potencial redutor do sistema (via síntese de NADPH), e da enzima  $\delta$ -glutamyl-sintetase, afim de verificar a síntese de novo de glutatona. O persistente aumento do conteúdo de GSSG durante o período experimental está de acordo com esta interferência. Os altos níveis de GSSG juntamente com a depleção de GSH observada no 2º e no 4º dia de tratamento e o concomitante aumento nos níveis de TBARS, são uma clara indicação da severidade do insulto oxidativo neste hepatócitos. Todavia, a recuperação dos níveis de GSH e GT na segunda metade do período experimental sugere uma resposta compensatória. A inibição da atividade da GR, a depleção de GSH e os aumentos dos níveis de TBARS e GSSG estão de acordo com estudos prévios *in vitro*, que mostraram o decréscimo hepático da atividade da GR depois do tratamento com BZN (DUBLIN, et al., 1984).

Além de apresentar uma eficácia relativa, o BZN apresenta sérios efeitos colaterais como neuro e dermatotoxicidade, as quais ocorrem em 30% dos pacientes que recebem o tratamento, mas, em geral, estas manifestações não justificam a sua interrupção (GONTIJO et al., 1999). Testes de mutagenicidade têm mostrado o potencial genotóxico deste derivado imidazólico (FERREIRA et al., 1988). Consistente com estas observações, TEIXEIRA e colaboradores (1990a,b) relataram o desenvolvimento de linfomas em coelhos tratados com BZN, enquanto BOCCHI et al, (1999, 1994) encontraram uma alta incidência de neoplasia maligna depois de transplantes cardíacos em pacientes que tiveram tratamento crônico com BZN. Todavia, resultados contraditórios foram demonstrados por SOUZA e colaboradores (1991), que não observaram aumento na frequência de aberrações cromossômicas ou na frequência de micronúcleos em medula de roedores submetidos a tratamentos crônico e agudo com BZN, antagonizando com os resultados positivos na frequência de aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleos em cultura de linfócitos do sangue periférico de crianças tratadas com doses terapêuticas de BZN por 30 dias (GORLA et al, 1988).

O fato de que o efeito de fármacos nitroheterocíclicos como o BZN e o nifurtimox, e de outros agentes tripanocídicos, poderem ser antagonizados por

“scavengers” de ERO (DUBLIN et al., 1984), reforça o argumento de que ambos nitroimidazólicos também agem através da geração de ERO. Ambos fármacos provocam um efeito similar em várias cepas de *T. cruzi*, causando depleção do conteúdo de glutathiona total em aproximadamente 5 vezes (MORELLO, 1988; DUBLIN et al., 1984).

Apesar dos fármacos nitroheterocíclicos como o BZN e o nifurtimox, poderem suprimir a parasitemia, e possivelmente curar ou melhorar a fase aguda da infecção chagásica, eles apresentam um efeito muito reduzido na fase crônica da doença (SOUZA et al., 1991). O *T. cruzi* é vulnerável aos fármacos que formam ERO e o fármaco de primeira escolha no tratamento da tripanosomíase americana é o BZN, pois o nifurtimox é muito tóxico ao hospedeiro (MORELLO, 1988). A dosagem preconizada na terapia da doença de Chagas está entre 5 e 10 mg/Kg de peso corporal, durante 30 a 60 dias, dependendo da gravidade do caso e do nível de parasitemia. Em procedimentos pré-operatórios para transplantes cardíacos, a dose de BZN utilizada é 4 a 5 vezes mais alta (KOROLKOVAS, 1997; BOCCHI, et al., 1999; 1994). No presente estudo, os efeitos adversos causados pelas ERO, foram refletidos no insulto oxidativo originado pelo uso de doses terapêuticas, bem como pela indução do CYP1A1.

Nossos resultados demonstraram claramente que os animais que receberam o tratamento com BZN apresentavam uma condição severa de estresse oxidativo, aparentemente dividido em dois estágios temporais. Na primeira metade do período experimental, há uma evidente indução das atividades da CAT e da GR, também ocorrendo depleção nos níveis de GT e GSH. Na segunda metade do tratamento, junto com uma persistente inibição da GST e um aumento nos níveis de TBARS, foi observada uma inibição na atividade da CAT e da GR. Depois de uma resposta aparentemente compensatória (intervalo entre 2 e 4 dias de tratamento), os animais parecem incapazes de manifestar uma resposta compensatória mais prolongada, aparentemente face aos contínuos insultos provocados pelas ERO, e, como consequência houve um desequilíbrio na homeostasia celular. Simultaneamente, houve uma indução progressiva da isoforma CYP1A1, a qual, está diretamente associada à ativação de compostos pró-carcinogênicos, geração de intermediários altamente reativos e ERO. Estes resultados enfatizam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a toxicidade e papel das ERO nas defesas antioxidantes geradas pelo BZN, tanto no parasita quanto no próprio hospedeiro.

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos, podemos concluir:

- ✓ O estudo realizado demonstrou que os animais tratados com BZN enquadram-se em uma condição de estresse oxidativo.
- ✓ A atividade e expressão do CYP4501A1 estiveram aumentadas ao longo do tratamento, demonstrando que o BZN é um indutor do CYP1A1, e que este efeito indutivo é dose-dependente e se mantém ao longo do tempo. A indução do CYP1A1 aumenta em correlação linear à peroxidação lipídica (TBARS), sugerindo que este sistema de biotransformação esteja participando da geração de ERO.
- ✓ Ocorreu uma inibição na atividade da GST nos ratos tratados com BZN, refletindo uma diminuição da capacidade antioxidante e da capacidade de conjugação da fase II do processo de biotransformação.
- ✓ Os níveis de peroxidação lipídica, apresentaram um aumento acentuado durante o período experimental, caracterizando a condição de estresse oxidativo e dano celular nos hepatócitos.
- ✓ Após 4 dias de exposição ao BZN, a atividade da GR sofreu uma inibição que se manteve até o final do tratamento, refletindo diretamente nos aumentos dos níveis de TBARS e GSSG, e conseqüentemente no dano celular.
- ✓ As atividade da GPx e da CAT apresentaram um comportamento complementar durante todo o período de exposição ao fármaco, alterando-se em termos de elevação e redução das atividades.
- ✓ A atividade da SOD manteve-se inalterada durante todo o período experimental.
- ✓ Os níveis de GT e GSH no início do período experimental foram diminuídos, seguido por um aumento destes valores nas etapas seguintes do tratamento, demonstrando uma tendência adaptativa dos animais frente à condição agressiva causada pela administração do fármaco.
- ✓ Os níveis de GSSG, foram aumentados durante todo o tempo de exposição ao fármaco, refletindo a gravidade do insulto tóxico e a situação de estresse oxidativo nos hepatócitos expostos ao BZN.

- ✓ Os resultados, aqui obtidos, corroborando citações na literatura, revelaram uma evidente toxicidade vinculada ao BZN, mesmo em doses terapêuticas.
- ✓ Esta toxicidade provavelmente ocorre via geração de ERO, provavelmente pela indução do CYP1A1, acompanhada da desorganização da capacidade antioxidante no hospedeiro, dando algumas indicações dos possíveis mecanismos de ação tóxica, principalmente aqueles relacionados com efeitos mutagênico/carcinogênico.
- ✓ O BZN vem sendo utilizado no Brasil como o fármaco de escolha no tratamento da doença de Chagas, há necessidade de melhor avaliação de sua toxicidade incidente sobre o hospedeiro, notadamente àquelas relacionadas com a geração de ERO.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth. Enzymol.**, v.105, p.121-126, 1984.
- AIX, L.; REY-GROBELLET; LARRIEU, G.; LESCA, G.; GALTIER, P. Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.220, p.789-794, 1994.
- AMES, J. R.; RYAN, M. D.; KOVACIC, P. Mechanism of antibacterial action: electron transfer and oxy radicals. **Free Radic. Biol. Med.** v.2, p.377-91, 1986
- AMSTAD, D.; CERUTTI, P. Genetic modulations of the cellular antioxidant defense capacity. **Env. Health Persp.** v.88, p.77-82, 1990.
- ANDRADE, A. L. S. S.; ZICKER, F. OLIVEIRA, R. M. Randomied trial of efficacy of treatment of early *T. cruzi* infection. **Lancet**, v.348, p.1407-13, 1996.
- AVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M. Polimerase chain reaction amplification of *T. cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lisates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.48, p.211-221, 1991.
- BACHUR, N. R.; GORDON, S. L.; GEE, M. V. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agent to free radicals. **Cancer Res.** v.38, p.1745-50, 1978.
- BARKER, C. W.; FAGAN, J. B.; PASCO, D. S. Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.3985-90, 1994.
- BERGELSON, S.; PINKUS, R.; DANIEL, V. Intracellular glutathione levels regulate *fos/jun* induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. **Cancer Res.**, v.54, p.36-40, 1994.
- BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Med.** v.61, p.882-90, 1963.
- BIRD, R. P.; DRAPER, A. H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Meth. Enzymol.**, v.90, p.105-10, 1984.
- BOCCHI, E.A.; HIGUSHI, M.L.; FIORELLI, A. et al. Higher incidence of malignant neoplasma after heart transplantation for treatment of Chagas' heart disease. **Eur. Heart. J.**, v.15, p.179, 1994.

- BOCCHI, E. A.; HIGUCHI, M. L.; VIEIRA, M. L. C.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; FIORELLI, A.; UIP, D.; JATENE, A.; PILEGGI F. Higher incidence of malignant neoplasms after transplantation for treatment of chronic Chagas' heart disease. **J. Heart & Lung Transplantation** v.17, p.399-405, 1999.
- BONDY, S.; NADERI, S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. **Biochem. Pharmacol.**,v.48, p.155-59, 1994.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, v.34, p.707-17, 1973
- BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E. E. et al. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v.188, p.643-48, 1980.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W., **Superoxide Dismutase**, p.159-68, v.2. CRC, Boca Raton.,1982.
- BOVERIS, A.; FRAGA, C. G.; VARSAVSKY, A. I.; KOCH, O. R. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Arch. Biochem. Biophys.** v.227, p.534-41, 1983.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function**, Marcel Dekker : New York, v.105, p.1-25, 1997.
- BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. **Pharmacol. Ther.**,v.7, p.71-90, 1979.
- BRENER, Z. Trypanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J.C.P., COURA, J.R. (eds). Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. **Um manual prático para o clínico geral**. Rio de Janeiro:Fiocruz, p.25-32, 1997.
- BURTON, G.W; INGOLD, K.U.  $\beta$ -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v.62, p.569,1984.
- CAMARGO, M. E.; SILVA, G. R.; CASTILHO, E. A.; SILVEIRA, A. C. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975-1980. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.26, p.192-204, 1984.
- CANÇADO, R. J.; CHUSTER, M. **Cardiopatia Chagásica**. Belo Horizonte:Fundação Carlos Chagas, 1985.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Meth. Enzymol.**, v.113, p.484-90, 1985.
- CASTRO-FILHO, J.; SILVEIRA, A. C. Distribuição da Doença de Chagas no Brasil. **Rev. Bras. de Maral. e Doenças Trop.**, v.31, p.85-98, 1979.

- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** v.59, p.527-602, 1979.
- CHRISTOPHERSEN, B. O. Formation of monohydroxi-polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase. **Biocim. Biophys. Acta.** v.176, p.463-7, 1969.
- COASSIN, M.; TOMASI, A.; VANNINI, V.; URSINE, F. Enzymatic recycling of oxidized ascorbate in pig heart: one-electron vs two-electron pathway. **Archi. Biochem. Biophys.** v.290(2), p.458-62, 1991.
- COMPORTE, M. Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.45, p.143-69, 1987.
- COMPORTE, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Biol. Interactions**, v.72, p.1-56, 1989.
- CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Towards Prolongation of the Healthy Life Span.**, v.854, p.435-43, 1998.
- CURI-PEDROSA, R.; DAUJAT, M.; PICHARD, L.; OURLIN, J. C.; CLAIR, P.; GERVOT, L.; LESCA, P.; DOMERGUE, J.; JOYEUX, H.; FORTANIER, G.; MAUREL, P. Omeprazole and lazoprazole are mixed inducers of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.269, p.384-92, 1994.
- DAVIES, K.J.A. (ed) **Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects.** Oxford:Pergamon, 910 p., 1991.
- DE GROOT, H ; LITTANER, A. Hipoxia, reactive oxygen and cell injury **Free Rad. Biol. Med.**, v.6, p.541-51, 1989.
- DE GROOT, H.; ANUNDI, I ; SIES, H. Cytochrome P-450 and lipid peroxidation. In: RUCKPAUL, K & REIN, H. (eds.), **Membrane organization and phospholipid interaction of cytochrome P-450.** Berlin:Akademie Verlag, p.184-205, 1991.
- DENISON, M. S; WHITLOCK, J. P. Jr. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. **J. Biol. Chem.** v.270, p.18175-8, 1995.
- DIAS, J.C.P. Acute Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Suppl.79, p.85-91, 1984.
- DIAS, J. C. P. Cardiopatia Chagásica: história natural. In: CANÇADO, J. R.; CHUSTER, M. (ed) **Cardiopatia Chagásica**, Belo Horizonte:Fundação Carlos Chagas de Pesquisa Médica, p.99-113, 1985.
- DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human Chronic Chagas disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, p.147-156, 1989.
- DIAS, J.C.P. Doença de Chagas In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais.** São Paulo:Editora Atheneu, p.81-110, 1999

- DIAZ, D.; FABRE, I.; DAUJAT, M.; SAINT HAUBERT, B.; BORIES, P.; MICHEL, H.; MAUREL, P. Omeprazole is a arylhydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450 **Gastroenterol**, v.92, p.737-47, 1990.
- DI GIULIO, R.T.; WASHBURN, P.C.; WENNING, R.J.; WINSTON, G.W.; JEWELL, C.S. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. **Environ. Toxicol. Chem.** v.8, p.1103-23, 1989.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**. 3 ed.; Longman Group, 1979.
- DOCAMPO, R.; STOPPANI, A.O.M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.197, p.317-21, 1979.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.; STOPPANI, A. O. M. Nitrofurantoin enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. **Arch. Biochem.** v.207, p.316-24, 1981.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, v.6, p.223-38, 1984.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Fed. Proc.**, v.45, p.2471-76, 1986.
- DUBIN, M.; GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effect of nitroheterocyclic drugs on lipid peroxidation and glutathione content in rat liver extracts. **Biochem. Pharmacol.** v.33, p.3419-23, 1984.
- EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **J Antimicrob Chemother**, v.31, p.201-10, 1993.
- FABER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMANN, J. B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Invest.** v.62, p.670-8, 1990.
- FAIRLAMB, A. H. Trypanothione metabolism and rational approaches to drug design in biochemistry of trypanosomes. **Biochem. Soc. Trans.**, v.18, p.717-20, 1990.
- FERREIRA, R. C. C.; SCHWARZ, U.; FERREIRA, L. C. S. Activation of anti-*trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. **Mutation Res.**, v.38, p.577-83, 1988.
- FERREIRA, M. S.; LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. et al. Doença de Chagas. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (eds). **Tratado de Infectologia**. São Paulo:Editora Atheneu, 1175-1213, 1996.
- FLOHÉ, L. Glutathione peroxidase brought into focus. In: PRYOR, W. A. (ed) **Free Radicals in Biology** v. V, p.223-255, Orlando, 1982.
- FLOHÉ, L., GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.**, v. 105, p. 114-121, 1984.

- FORMAN, H. J.; LIU, R. M.; TIAN, L. Glutathione cycling in oxidative stress. In: CLERCH, L. B. & MASSARO, D. J. (eds) **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function**. New York:Marcel Dekker, p. 99-121, 1997.
- FREEMAN, M. L.; SIERRA-RIVERA, E.; VOORHEES, G. J.; EISERT, D. R.; MEREDITH, M. J. Synthesis of hsp-70 is enhanced in glutathione-depleted Hep G2 cells. **Radiat. Res.**, v.135, p.387-93, 1993.
- FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxygen toxicity In: FANH, S. et al., (ed), **Advances in Neurology**, p. 225-6, New York:Raven, 1979.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase , **Adv. Enzymol.**, v.58, p.62-98 1986.
- GALTER, D.; MIHM, S.; DROGE, W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factors kB and the activator protein-1. **Eur. J. Biochem.** v.221, p.639-48, 1994.
- GERSHMAN, R.; GILBERT, D. L.; NYE, S. W.; DWYER, P.; FENN, W.O. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v.119, p. 623-6, 1954.
- GLEIZES, C.; EECKJOUTTE, C.; PINEAU, T.; ALVINERIE, M.; GALTIER, P. Inducing effect of oxfendazole on cytochrome P4501A2 in rabbit liver. Consequences on cytochrome P450 dependent monooxygenase. **Biochem. Pharmacol.**, v.41, p.1813-20, 1991.
- GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C. C.; STOPPANI, A. O. M. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v.34, p.1457-61, 1985.
- GONTIJO, E. D.; GALVÃO, L. M. C.; ELOI-SANTOS, S. Chagas disease: criteria of cure and prognosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94 (suppl. 1), p.357-62, 1999.
- GONZALEZ, N. S.; CAZZULO, J. J. Effects of trypanocidal drugs on protein biosynthesis in vitro and in vivo by *Tripanosoma cruzi*. **Biochem. Pharmacol.**, v.38, p.2873-7, 1989.
- GORLA, N. B.; CASTRO, J. A. Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benznidazole. **Toxicol. Let.** v.25, p.256-263, 1985.
- GORLA, N. B. Sister-chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to nifurtimox or benznidazole. **Mutation Res.**, v.188, p.129-33, 1987.
- GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. P.; LARRIPA, I. B. Assessment cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. **Mutation Res.**, v.206, p.217-20, 1988.
- GRINBLAT, L.; SREIDER, C. M.; STOPPANI, A. O. M. Nitrofurantoin inhibition of yeast and rat tissue glutathione reductase. **Biochem. Pharmacol.**, v.38, p.767-72, 1989.

- GRINBLAT, L.; SREIDER, C. M.; STOPPANI, A. O. M. Superoxide anion production by lipoamine dehydrogenase redox-cycling: effect of enzyme modifiers. **Biochem Int.** v.23, p.83-92, 1991.
- GUENGERICH, F. P. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** , v.25, p.97-153, 1990.
- GUGLIOTA, J. L.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M.; SOEIRO, R. *Trypanosoma cruzi* : inhibition of protein synthesis by nitrofuram SQ 18, 506. **Exp. Parasitol.**, v.34, p.1331-6, 1980.
- GWADZ, W.; HOSTEZ, J. **Parasitic Disease.** 3 ed, Springer-Verlag, 1995.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3. ed. Oxford:Oxford University Press, 1998.
- HECHT, S. S.; EL-BAYOUMY, K.; TULLEY, L.; LAVOIE, E. **J. Med. Chem.** v.22, p.981-7, 1979.
- HIGUCHI, M. L.; BRITO, T.; REIS, M. M. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic myocardites: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc. Pathol.** v.2, p.101-106, 1993.
- HODGSON, E.; LEVI, P. E. Metabolism of toxicants: Phase I reactions. In: HODGSON, E.; LEVI, P. E.(eds), **Introduction to Biochemical Toxicology.** 2 ed, p. 75-111, Norwalk:Appleton&Lange, 1994.
- JL, L.L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. **Med. Sci. Sports Exerc.** v.25 p.225-231, 1993.
- JENKINS, R. R.; GOLDFARB, A. Introduction: oxidative stress, aging and exercise. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v.25(2), p.225-31, 1993.
- JONES, D.P. The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: SIES, H. (ed) **Oxidative Stress**, p.151-95, London:Academic, 1985.
- JONES, E. M.; COLLY, D. E. TORTES, S. A *T. cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Trans. Assoc. Am. Physicians.** V.105, p.182-9, 1992.
- JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology.** Oxford:Oxford University Press, 1997.
- KAPPUS, H. A. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chem. Phys. Lipids.**, v.45, p.105-15, 1987.
- KARLSSON, J. **Antioxidants and exercises.** Human Kinetics, USA, 1997.
- KATOH, T.; OHMORI, H.; MURAKAMI, T.; KARASAKI, Y.; HIGASHI, K.; MURAMATSU, M. Induction of glutathione S-transferase and heat-shock proteins in rat after ethylene oxide exposure. **Chem. Biol. Interact.**, v.42, p.1247-54, 1991.

- KEDDERIS, G. L.; MIWA, G. T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. **Drug Metab. Rev.**, v.19, p.33-62, 1988.
- KEDDERIS, G. L.; ARGENBRIGHT, L. S. MIWA, G. T. Covalent interaction of 5-nitroimidazoles with DNA and protein in vivo: mechanism of reductive activation. **Chem. Res. Toxicol.** v.2, p.146-9, 1989.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JACOB, W. B. Mechanism for the several activities from glutathione S-transferase. **Biol. Chem.**; v.251, p.6183-8, 1974.
- KELLING, P. L. ; SMITH, L. L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochem. Pharmacol.** v.31, p.3243-49, 1982.
- KENNEDY, T. A.; LIEBLER, D.C. Peroxyl radical scavenging by beta carotene in lipid bilayers: effect of oxygen partial pressure. **J. Biol. Chem.** v.267(7), p.4658-63, 1992.
- KLAASSEN, C.; ROZMAN Absortion, distribution and excretion of toxicants. In; AMDUR, M. O.; DOUL, J. ; KLAASSEN, C. D. (ed) **Cassarett & Doull's Toxicology. The basic sciences of poisons.** 4 ed, p.50-87, New York:Pergamon Press, 1991.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** Edição 1997-1998, Rio de Janeiro:Guanabara Kogan, 1997.
- KOSOWER N. S.; KOSOWER E. M. The glutathione status of cells. **Int. Ver. Cytol.** v. 54, p.109-60, 1978.
- KRINSKY, N. I.; DENEKE, S. M. Interaction of oxygen and oxyradicals with carotenoids **J. Natl. Cancer Inst.** v.69, p.205, 1982.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p.680-5, 1970.
- LAPLUMÉ, H.; BAROUSSE, A. P.; CABRERA, H. Efectos indeseables del nifurtimox y benzimidazol. **Medicina.**, v.42, p.223, 1982.
- LAVRIJSEN, K.; VAN HOUTT, J.; THIJS, D.; MEULDERMANS, W.; HEYKANTS, J. Induction potential of antifungals containing an imidazole or triazole moiety. Miconazole and ketoconazole, but not itraconazole, are able to induce hepatic drug metabolizing enzymes of male rat at high doses. **Biochem. Farmacol.**, v.35, p.1867-78, 1986.
- LAZAR, M. A. One man's food. **Nature**, v. 407, p. 852-3, 2000.
- LEWIS, D.F.V. **Cytochromes P450: structure, function and mechanism.** London:Taylor & Francis, 1996.
- LITTLE, C.; O'BRIEN, P. J. An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxid substrate **Biochem. Biophys. Res. Commun** v.31, p.145-50, 1968.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-75, 1951.
- MARGARITIS, I. No evidence of oxidative stress after triathlon race in highly trained competitors. **Int. J. Sports. Med.**, v.18 (3), p.186-90, 1997.
- MASUBUCHI, N.; OKASAKI, O. An evaluation of the CYP1A induction potential of pantoprazole in primary rat hepatocytes: a comparison with other proton pump inhibitors. **Chem. Biol. Interact.**, v.107, p.63-74, 1997.
- MAY, J.; MENDIRATA, S.; HILL, K. E.; BURK, R. F. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by selenoenzyme thioredoxin reductase. **J. Biol. Chem.** v.271 (36), p.22607-10, 1997.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **J. Biol. Chem.** v.244, p.6049-55, 1969.
- McCALLA, D. R.; REUVERS, A.; KAISER, C. **Biochem. Pharmacol.**, v.20, p.3532-8, 1971.
- MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, v.220, p.445-7, 1983.
- MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. Enzyme dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: role of thioredoxin reductase. **Free Rad. Biol. Med.** v.25 (2), p.221-8, 1998a.
- MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. Erythrocyte ascorbate recycling: Antioxidant effects in blood. **Free Rad. Biol. Med.** v.24(5), p221-8, 1998b.
- MEYER, M.; PAHL, H. L.; BAEUERLE, P. A. Regulation of the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 by redox changes. **Chem. Biol. Interact.**, v.91, p.91-100, 1994.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase **J. Biol. Chem.**, v.247, p.3170-74, 1972.
- MONCADA, C.; REPETTO, Y.; ALDUNATE, J.; LETELIER, M. E.; MORELLO, A. Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.94C, p.87-91, 1989.
- MORELLO, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and detoxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.90c, p.1-12, 1988.
- MORELLO, A.; ALDUANTE, J.; REPETTO, Y.; Present status of Chaga's disease chemotherapy at the molecular level. In: EHRlich, R.; NIETO, A. (ed) **Biology of Parasitism**, Montevideo Uruguay: Ediciones Trilce, p.33-9, 1994.
- MORENO, S. N. J.; PALMERO, D. J.; PALMERO, K. E. Stimulation of lipid peroxidation and ultrastructural alterations induced by nifurtimox in mammalian tissues. **Medicina**, v.40, p.553-559, 1980.

- MORENO, S.N.J.; DOCAMPO, R.; MASSON, R.P.; LEON, W.; STOPANI, A.O.M. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys.** v.218, p.585-591, 1982.
- MURTA, S. M. F.; ROPERT, C. ; ALVES, R. O.; GAZZINELLI, R. T.; ROMANHA, A. J. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. **Parasite Immunology**, v.21, p.535-44, 1999.
- NAGEL, R. Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. **Mutat Res**, v.191, p.17-20, 1987.
- NEBET, D. W.; AMY, R. L.; MATTEW, D. Z.; SOLIS, W. A.; YANG, Y.; DALTON, T. P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. **Biochem. Pharmacol.** v.59, p.65-85, 2000.
- NERBERT, D.W.; GONZALEZ, F. J. P450 genes: structure, evolution and regulation. **Ann. Rev. Biochem.** v.56, p.945-1043, 1987.
- OHMARI, S., MIZAIZU, T., NAKAMURA, T. Differential role in lipid peroxidation between rat P4501A1 and P4501A2. **Biochem. Pharmacol.**, v.46, p.55-60, 1993.
- OLIVE, P. L.; Mc CALLA, D. R. **Chem Biol Interact.**, v.16, p.223-233, 1977.
- PALLOZZA, P.; MOUALLA, S.; KRINSKY, N.I. Effects of beta carotene and alpha tocopherol on radical initiated peroxidation of microsomes. **Free Rad. Biol. Med.**, v.13(2), p.127-36, 1992.
- PAOLISSO, G.; TAGLIAMONTE, M. R.; RIZZO, M. R.; MANZELLA, D.; GAMBARDELLA, A.; VARRICCHIO, M. Oxidative stress and advancing age: results in healthy centenarians. **Amer. Geriatrics. Soci.** v.46, p.833-8, 1998.
- PARKE, D. Activation mechanisms to chemical toxicity. **Arch. Toxicol.** v.60, p.5-15, 1987.
- PEDROSA, R. C.; SAAD, E. A.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. M. Resposta proliferativa das células T contra a cruzipaina na cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. De Med. Trop.** v.29(4), p. 331-9, 1996.
- PROUGH, R. A.; BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Direct fluorimetric methods for measuring mixed function oxidase activity. **Meth. Enzymol**, v.52, p.372-7, 1978.
- PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annu Rev Physiol**, v.48, p.657-667, 1986.
- PUNCHARD, N. A.; KELLY, F., J. **Free radicaais. A functional Approach** Oxford: IRL Press, 1996.

- RASSI JUNIOR, A.; MARTIN NETO, J. A. Cardiopatia Chagásica Crônica. **Rev. Soc. Cardiol. do Estado de São Paulo**. v.10(4), p.vi-xxxii, 2000.
- REPETTO, Y.; OPAZO, E.; ALDUNATE, J.; MORELLO, A. Role of glutathione and trypanothione in parasites. In: EHRLICH, R.; NIETO, A. (ed). **Biology of Parasitism**, Montevideo, Uruguai: Ediciones Trilce, p.25-32, 1994.
- RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E.; PASBY, D. P.; HOSCHSTEIN, P. *t*-butyl hydroperoxide induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. **Biochem. Biophys Acta**, v.815, p.426-32, 1985.
- RICHARD, L.; PEDROSA, R. C.; BONFILS, C.; AIGRAN, E. J.; DOMERGUE, J.; JOYEUX, H. COSME, J.; GUENGERICH, P.; MAUREL, P. Oxidative metabolism of lansoprazole by human liver cytochromes P450. **Molecular Pharmacol.**, v.47, p.410-18, 1995
- ROSE, R. C. Solubility properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation. **Biochem. Biophys. Acta**, v.924(1), p.254-256, 1987.
- SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D.; DAVIS, J.; SCHUBERT, D.; AHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.24, p.1375-89, 1998.
- SCHENKMAN, J. B.; CINTI, D. L. Preparation of microsomes with Calcium. **Methods Enzymol**, v.52, p.83-8, 1978.
- SEVANIAN, A.; NORDENBRAND, K.; KIM, E.; ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. **Free Radic. Biol. Med.**, v.8, p.145-52, 1990.
- SHAMES, S. L.; FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A.; WALSH, C. T. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*: a new member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. **Biochemistry** v.25, p.3519-26, 1986.
- SHIM, H; FAIRLAMB, A. H. Levels of polyamine, glutathione and glutathione-spermidine conjugates during growth of the insect trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **J. Gen. Microbiol.** v. 134, p.807-17, 1988.
- SIES, H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: SIES, H. (ed), **Oxidative Stress**, p.1-8, London :Academic:, 1985.
- SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** v.25, p.1058-71, 1986.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defenses. **Eur. J. Biochem.**, v.215, p.213-9, 1993.
- SIGNORINI, R.; SIGNORINI, R. Atividade física e radicais livres. In: GOHAYEB, N.; BARROS, T. (ed). **O Exercício: preparação fisiológica, avaliação médica, aspectos gerais e preventivos**. São Paulo: Atheneu, 1995.

- SLATER, T. F. Biochemical studies on liver injury. In: STALER, T. F., (ed) **Biochemical mechanisms of liver injury**, p.1-44, New York :Academic Press, 1978.
- SOUHAILI-EL AMRI, H., FARGETTON, X., BENOIT, E.; TOTIS, M.; BATT, A. M. Inducing effect of albendazole on rat liver drug-metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.92, p.141-9, 1988.
- SOUZA, C. S, CATARINA, S. T., SILVA, J. S. Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. **Mutation Res.**, v.259, p.139-46, 1991.
- SREIDER, C. M.; GRINBLAT, L.; STOPPANI, A. O. M. Catalysis of nitrofuram redox-cycling and superoxide anion production by heart lipoamide dehydrogenase. **Biochem. Pharmacol**, v.40, p.1849-57, 1990.
- STOCKER, R.; FREI, B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha tocopherol. In: SIES, H. (ed) **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**, p.213-43, London:Academic Press, 1991.
- STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas **Medicina**, v.59, p. 147-65, 1999.
- TANAKA, E. Clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions: role of cytochrome P450 enzymes, **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.23, p.403-16, 1998.
- TEIXEIRA, A. R. L.; CALIXTO, M. A.; RIZZO, L. V.; CORDOBA, J. C.; TEIXEIRA, M. L. Cancerinogênese em camundongos tratados com compostos nitroderivados. **Programa e Resumos do XXI Congresso da Soc. Bras. Med. Trop.** p.48-9, 1985.
- TEIXEIRA, A. R. L.; CORDOBA, J. C.; SOUTO MAIOR, I. C.; SOLORZANO, E. Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.43, p.146-58, 1990a.
- TEIXEIRA, A. R. L.; SILVA, R; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J. M.; RIZZO, L. V. Malignant non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with nitroarenes. **J. Comp. Pathol.** v.103, p.37-48, 1990b.
- TEIXEIRA, A. R. L.; CALIXTO, M. A.; TEIXEIRA, M. L. Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. **Mutation Res.** v.305, p.189-196, 1994.
- THOR, H.; SMITH, M. T.; HARTZELL, P.; BELLOMO, G.; JEWELL, S. A.; ORRENIUS, S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. **J. Biol. Chem.** v.257, p.12419-25, 1982.
- THURMAN, R. G.; KAUFFMAN, F. C.; BARON, J. Biotransformation and zonal toxicity. In: THURMAN, R. G.; KAUFFMAN, F. C.; JUNGERMANN, K. (ed), **Regulation of hepatic metabolism**. p.321-81, New York:Plenum Press, 1986.

- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, v.27, p.502-22, 1969.
- TIMBRELL, J.A. **Principies of biochemical toxicology**. TIMBRELL, J. A. (ed), Londres:Taylor & Francis, 1991.
- TOWBIN, H.; STAEBELI, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from poliacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v.455, p.68-78, 1979.
- TRAVACIO, M.; LLESUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Advancement of Science** v.48 (1/2), p.9-13, 1996.
- VAZ, A. D. N.; ROBERTS, E. S. ; COON, M. J. Radical intermediates in the catalytic cycles of cytochrome P450. In: SIMIC, M. G.; TAYLOR, K. A.; WARD, J. P.; VON SONNTAG, C. (ed), **Oxigen Radicals in Biology Medicine**, p.501-7, New York:Plenum Publishing, 1989.
- VIDELA, L. A.; GUERRI, C. Glutathione and alcohol. In: VINA, J. (ed) **Metabolism and Physiological Functions**, p.57-67, Boca Raton: CRC Press, 1990.
- WARD R.F., TIMOTHY, F.P. **Free radicaais**, 1997
- WEI, P., ZHANG, J., EGAN-HAFLEY, M., LIANG, S., MOORE, D.D. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. **Nature**. v.407, p.920-3, 2000.
- WENDEL, A. Cytochrome P-450-dependent and independent liver injury in mice. In: DAVIES, K. J. A. **Oxidative damage and repair**. London:Pergamon Press, p.732-7, 1991.
- WILHELM FILHO, D.; MARCON, J. L.; TORRES, M. A.; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in vertebrates: a comparative approach. **Trends in Comparative Biochemistry in Physiology**. India:Poojapura, (*in press*).
- WILHELM FILHO, D.; MARCON, J. L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. A. L.; RANDAL, D. J. **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon**, Manaus:INPA, p.299-312, 1996.
- WILHELM FILHO, D.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2879-82, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease: Interpretion of transmission. **Weekly Epidemiological Record**, Genova:WHO, v.72, p.1-8, 1997.
- ZAHOOR, A., LAFLEUR, M. V. M., KNIGHT, R. C. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. **Biochem. Pharmacol.** v.36, p.3299-304, 1987.