



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINÁ**

**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 ALBENDAZOL E MEBENDAZOL***

**Claudriana Locatelli**

**Florianópolis - Santa Catarina - Brasil**

**Fevereiro de 2001**

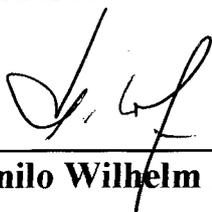
**“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO CITOCROMO P4501A1  
HEPÁTICO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES EM RATOS  
TRATADOS COM ALBENDAZOL E MEBENDAZOL”**

**POR**

**CLAUDRIANA LOCATELLI**

**Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:**

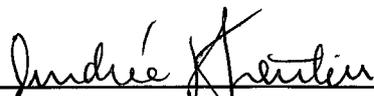
**Banca Examinadora:**



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



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



**Andréia Trentin (BEG/CCB/UFSC – Membro Titular)**

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

**Florianópolis, 21 de Fevereiro de 2001.**

*Avaliação da Expressão do Citocromo P4501A1 Hepático  
e das Defesas Antioxidantes em Ratos Tratados com  
Albendazol e Mebendazol*

por

CLAUDRIANA LOCATELLI



---

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

Orientador: Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho

Co-Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis, SC, Brasil

Fevereiro, 2001

*In memoriam*

**Ao meu pai Oldacy que me ensinou a  
persistência e a abnegação na busca daquilo  
que se acredita.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Danilo Wilhelm Filho, pela orientação, apoio e confiança na realização deste trabalho.

À professora Rozangela Curi Pedrosa, que, desde o tempo da iniciação científica contagiou-me com seu entusiasmo e amor pela pesquisa. Meu muito obrigado por acreditar na minha capacidade e no meu potencial.

À minha querida amiga Andreza Fabro de Bem, que sempre esteve presente durante todo este percurso, pela sua paciência, amizade, companheirismo em me ouvir e ajudar nos momentos de dificuldades e em sorrir comigo nos momentos de vitória.

Ao professor Márcio Alvarez-Silva, pela sua disposição, atenção e paciência em abrir as portas de seu laboratório e compartilhar prontamente os seus conhecimentos para realização deste trabalho.

À professora Andréia Trentin, pela acolhida em seu laboratório e por aceitar prontamente em fazer parte da banca examinadora.

A todos os colegas de laboratório, Fabiola, Michelle, Luciana, Irma, Luiz Flávio, Jean e Reginaldo pela força e pelos inesquecíveis almoços.

A todas as pessoas do Laboratório de Hematologia e Imunologia de Tumores, pelo companheirismo, amizade e pelos bons momentos vividos durante a reta final deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ao amigo Ricardo, pela disposição, paciência e entusiasmo em compartilhar seus conhecimentos sobre a técnica de Western blotting.

Aos meus irmãos Luciana e Gabriel, pelo apoio, amizade, carinho e estímulo dedicados.

À minha mãe, pelo amor e oportunidade concedida e principalmente pela serenidade e sabedoria que me possibilitaram conhecer o verdadeiro valor da luta e da conquista. Minha eterna gratidão.

Aos meus amigos, Sinara, Clarissa, Karine, Andiará e Marcelo pela força e pelas horas de descontração.

Ao meu namorado Fábio, pelo seu amor carinhoso e compreensão incontestáveis quando estive ausente em momentos importantes da sua vida.

À professora Miriam, pela competência com a qual desempenhou a árdua tarefa de instituir e coordenar este programa de pós-graduação.

Ao CNPq-CAPES, pelo apoio financeiro durante parte da minha formação acadêmica.

A Deus, pela graça de poder chegar até aqui, por ser meu amparo, a luz que guia meu caminho, e pelo milagre da vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação. A todos muito obrigado por oferecerem a mim a oportunidade de aprender e transformar o fim em um novo começo.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	m
RESUMO.....	vn
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE QUADROS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XH
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HELMINTÍASES.....	2
1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	3
<b>1.2.1 Defesa Antioxidante Enzimática</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2 Defesa Antioxidante Não-Enzimática</b> .....	<b>9</b>
1.3 HELMINTOS E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	10
1.4 TRATAMENTO DAS HELMINTÍASES.....	12
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELA BIOTRANSFORMAÇÃO DOS FÁRMACOS.....	18
2 OBJETIVO GERAL.....	27
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 ANIMAIS.....	28
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	28
3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	29
<b>3.3.1 Homogenato</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.2 Extrato Ácido</b> .....	<b>29</b>
<b>3.3.3 Fração Microssomal</b> .....	<b>29</b>
3.4 ATIVIDADE DOS MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO E DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	30
<b>3.4.1 Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)</b> .....	<b>30</b>
<b>3.4.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas</b> .....	<b>30</b>
3.4.2.1 Glutationa S-Transferase (GST).....	30
3.4.2.2 Catalase (CAT).....	30
3.4.2.3 Superóxido Dismutase (SOD).....	31
3.4.2.4 Glutationa Peroxidase (GPx).....	31
3.4.2.5 Glutationa Redutase (GR).....	32
<b>3.4.3 Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas</b> .....	<b>32</b>
3.4.3.1 Glutationa Reduzida (GSH).....	32
3.4.3.2 Glutationa Total (GT) e Glutationa Oxidada (GSSG).....	32
<b>3.4.4 Análise do Citocromo P4501A1</b> .....	<b>32</b>
3.4.4.1 Concentração de Proteínas.....	32
3.4.4.2 Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase - EROD.....	33
3.4.4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para Separação das Proteínas.....	33
3.4.4.4 Imunoblotting.....	33
3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	34
4 RESULTADOS.....	35

4.1	AVALIAÇÃO DALIPOPEROXIDAÇÃO TECIDUAL (TBARS).....	35
4.2	AVALIAÇÃO DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS.....	36
4.2.1	<i>Catalase</i> .....	36
4.2.2	<i>Glutathione Redutase</i> .....	36
4.2.3	<i>Glutathione Peroxidase</i> .....	37
4.2.4	<i>Superóxido dismutase</i> .....	37
4.3	ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS (TIÓIS NÃO PROTÉICOS: GT, GSH E GSSG).....	38
4.4	ATIVIDADE DA 7 ETOXIRESORUFINA -O- DEETILASE.....	40
4.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO CITOCROMO P4501A1.....	41
4.6	GLUTATHIONE S - TRANSFERASE.....	43
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÕES.....	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## RESUMO

o albendazol (ABZ) e o mebendazol (MBZ) são dois fármacos derivados benzimidazólicos com marcada atividade antihelmíntica, amplamente utilizados pela população em geral no tratamento e controle das helmintíases. Os fármacos da família benzimidazóis produzem muitas alterações bioquímicas nos helmintos suscetíveis. Eles são muito utilizados no controle de infecções por helmintos, tanto em monoparasitoses como em poliparasitoses, em muitos países onde as helmintíases são endêmicas, principalmente nos países sub-desenvolvidos, onde o sistema de saneamento básico é precário. Como os helmintos são organismos anaeróbicos ou aeróbicos facultativos que vivem com baixas tensões de oxigênio, alguns antihelmínticos parecem exercer sua ação deletéria através da geração de espécies reativas de oxigênio(ERO). Neste contexto, avaliou-se as possíveis alterações nas defesas antioxidantes e estresse oxidativo provocados por estes fármacos nos hospedeiros, além da indução do citocromo P4501A1 (CYP4501A1), sistema ativador de compostos pró-carcinogênicos. Como modelo experimental, utilizou-se ratos machos Wistar tratados com estes antihelmínticos durante diferentes períodos de tempo (2, 4, 8 e 10 dias) com uma dose de 40mg/Kg de peso. Após o tratamento, avaliou-se o estresse oxidativo através de medidas das atividades enzimáticas da catalase, CAT, superóxido dismutase, SOD, glutaciona peroxidase, GPx e glutaciona redutase, GR, além dos níveis de dano celular (TBARS) e os níveis dos tióis não protéicos glutaciona total, GT, glutaciona reduzida, GSH e glutaciona oxidada, GSSG, além da atividade EROD e da expressão do CYP4501A1 e a atividade da glutaciona-S-transferase, GST, em fígado de ratos. Os resultados revelaram que o ABZ e o MBZ promoveram uma condição de estresse oxidativo traduzido pelo aumento nos níveis de TBARS e pela inibição de algumas das enzimas antioxidantes e de outras defesas antioxidantes não enzimáticas. Além de aumentar o estresse oxidativo nestes animais, o ABZ foi capaz de induzir a atividade e expressão do CYP4501A1 e promover uma diminuição na atividade da GST, a qual não foi observada no tratamento com MBZ. Desta forma, é possível concluir que o ABZ é um forte gerador de ERO, enquanto o MBZ tem um pequeno e transitório efeito sobre a geração de ERO e no estabelecimento de um estresse oxidativo. Sobre a expressão do CYP4501A1, o ABZ parece exercer um efeito potente, provavelmente levando à ativação de compostos mutagênicos. A partir destes dados, sugere-se que o MBZ

poderia ser o fármaco de primeira escolha para o tratamento das helmintíases, já que o mesmo parece causar um menor efeito nas defesas antioxidantes e na expressão do CYP4501A1 do hospedeiro, além de apresentar indicações terapêuticas semelhantes às do ABZ.

## ABSTRACT

Albendazole (ABZ) and mebendazole (MBZ) are two benzimidazole derived drugs that show a remarkable anthelmintic activity and with are widely used in the treatment and control of helminthiasis, both in poli and monoparasitosis. They are mainly used in developing countries where these parasitosis are endemic and the sanitary conditions are precarious. Considering that helminths are either anaerobic or facultative aerobic organisms, which live under low oxygen tensions, some anthelmintic drugs seem to act through the deleterious generation of reactive oxygen species (ROS), because they are devoid of or have relatively low antioxidant defenses if compared to aerobic organisms. Taken this context into account, the main objective of the present study consisted of the evaluation of the effect of both drugs on the antioxidant defenses, on some oxidative stress indicators, and on the induction of cytochrome P4501A1 in the host liver. As an experimental model, adult male Wistar rats were treated with ABZ and MBZ during different periods of time (2, 4, 8 and 10 days) with doses of 40mg/Kg. After treatment, the activities of superoxide dismutase, SOD, catalase, CAT, glutathione peroxidase, GPx and glutathione reductase, GR, the activities of EROD and CYP1A1 expression and activity of glutathione S-transferase, as well as the concentrations of TBARS, reduced glutathione, GSH, oxidized glutathione, GSSG, and total glutathione, TG, were measured in rat hepatocytes. The results that both drugs provoked an oxidative stress condition, evidenced through the elevations of TBARS contents and through the inhibition of some antioxidant enzymes. Besides, ABZ was able to induce the EROD activity and CYP1A1 expression as well as an inhibition of GST activities, changes that were not observed under MBZ treatment. Therefore, it is concluded that ABZ is a strong ROS generator, while MBZ has a low and transient effect on ROS generation. Regarding the CYP1A1 expression, ABZ seems to have a potent effect which may activate mutagenic compounds. It is suggested that MBZ could be the first-choice drug in the treatment of helminthiasis because it shares a similar therapeutic indication with ABZ.

FIGURA	PÁGINA
I- Geração de hidroperóxidos.....	6
2- Interação das defesas antioxidantes.....	9
3 - Estrutura química dos fármacos.....	13
4- Mecanismo proposto para o aumento da produção de enzimas.....	21
5- Reações catalisadas pelo citocromo P450.....	23
6- Processo de biotransformação de xenobióticos.....	24
7- Biotransformação e toxicidade de xenobióticos.....	25
8- Determinação do dano celular (TBARS).....	35
9- Atividade da CAT.....	36
10- Atividade da GR.....	37
II - Atividade da GPx.....	37
12- Atividade da SOD.....	38
13 - Concentração de GT.....	39
14- Concentração de GSH.....	39
15- Concentração de GSSG.....	40
16- Atividade EROD dose-dependente.....	41
17- Atividade EROD tempo-dependente.....	41
18- Análise por Westem blot do CYP4501A1 no tratamento com ABZ.....	42
19- Análise por Westem blot do CYP4501A1 no tratamento com MBZ .....	43
20- Atividade da GST.....	44

QUADRO	PÁGINA
1- Principais defesas antioxidantes.....	17
2- Concentração de GT, GSH, GSSG.....	18

ABZ	Albendazol
pNF	P-Naftoflavona
CAT	Catalase
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GT	Glutaciona total
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
MBZ	Mebendazol
O <sub>2</sub> *	Radical ânion superóxido
HO*	Radical Hidroxil
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, mas não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próprios e à comunidade ”.*

**Albert Einstein**

# 1 INTRODUÇÃO

Os helmintos (vermes) são animais multicelulares de corpo mole, comprido e fino que podem parasitar o homem causando inúmeras doenças. As patologias provocadas por esses animais, genericamente chamadas *verminoses*, revestem-se de grande importância sócio-econômica em países como o Brasil, onde as condições precárias de saneamento básico e de moradias favorecem a transmissão dessas doenças, contribuindo, por exemplo, para a baixa produtividade das pessoas afetadas. Nesse contexto, é muito conhecida a figura do Jeca Tatu, personagem idealizado por Monteiro Lobato; camponês brasileiro, apresenta-se pálido, magro, fi-aco e debilitado para o trabalho, em decorrência da ação de parasitas em seu organismo.

O problema da saúde pública está diretamente vinculado às condições sócio-econômicas da população, sobretudo nas regiões mais precárias, que contam com moradias inadequadas, má alimentação e total falta de saneamento básico. Experiências realizadas em diversos países, demonstram que os serviços de saúde somente funcionam de maneira satisfatória, em qualquer parte do mundo, quando há uma relação de compromisso entre a sociedade, os profissionais de saúde e o governo.

Um dos maiores problemas de saúde pública dos países subdesenvolvidos, onde há um precário sistema de saneamento básico, são as helmintíases, as quais afetam principalmente crianças em idade escolar. Além de causar um baixo desempenho escolar provoca várias doenças secundárias como anemias, f<sup>i</sup>aqueza afetando seu desenvolvimento, deprimidas. Para tanto, é indispensável que o problema de saneamento básico no Brasil seja encarado com a necessária seriedade, e, principalmente, que os recursos financeiros exigidos sejam mesmo canalizados para este setor. Afinal, todos nós queremos que cada brasileiro tenha a expectativa de uma vida mais longa e feliz.

## 1.1 Helmintíases

A distribuição geográfica das helmintíases é cosmopolita, sendo que mais de 2 bilhões de pessoas são afetadas em todo o mundo, principalmente nos países tropicais, onde a infecção por mais de um tipo de helminto é comum (Goodman & Limbird, 1996). Essas infecções produzem, em alguns casos, certo desconforto, porém não causam nenhuma doença grave. Por outro lado, outras helmintíases são responsáveis por grande morbidade (Rang et al., 1997).

Talvez a pouca importância dada a este grupo de enfermidades por alguns setores, advinha do fato de que poucas parasitoses são mortais em curto prazo, comparativamente ao câncer e às doenças cardiovasculares. Contudo, as doenças parasitárias são comuns em populações desnutridas, que não contam com saneamento básico, e muitas vezes portadoras de outras afecções. Frequentemente estão associadas à deficiência de crescimento e de desenvolvimento mental, abreviando a expectativa de vida ainda na infância. Estas doenças apresentam conseqüências não só no que se refere à saúde, mas também no âmbito social e econômico.

Os helmintos constituem um grupo muito numeroso, com três filios: *Platyhelminthes*, *Aschelminthes* e *Acanthocephala*, incluindo espécies de vida livre e espécies parasitas. As ocorrências no homem são muito comuns, onde cerca de 20% da população humana do mundo está parasitada por ancilostomídeos, o que equivale a mais de um bilhão de pessoas. A situação é semelhante em relação ao *Ascaris lumbricoïdes*. Estas infecções, em geral, resultam em danos para o hospedeiro, os quais se manifestam de formas variadas (Costa, 1995).

Dentre os três filios de helmintos, os de maior interesse médico são os vermes pertencentes aos filios *Platyhelminthes* e *Aschelminthes*. No filo *Platyhelminthes* destacam-se as classes Trematoda e Cestoda, enquanto no filo *Aschelminthes* destaca-se a classe Nematoda.

Nos últimos anos tem-se progredido muito no entendimento da bioquímica, biologia molecular e imunologia dos parasitas. Um destes aspectos importantes é a deficiência que estes organismos apresentam contra a toxicidade inerente ao uso do oxigênio.

## 1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

A pressão da evolução induzida pela liberação de oxigênio no ambiente tem exigido dos organismos aeróbicos o desenvolvimento de mecanismos para lidar com o componente tóxico derivado do metabolismo oxidativo. A sobrevivência destes num ambiente oxigenado envolve uma complexa interação entre a produção biológica de espécies quimicamente muito reativas, chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), e a habilidade do organismo em controlar estas substâncias. A natureza precária deste inter-relacionamento pode ser demonstrada pelo aumento ou diminuição do oxigênio disponível no ambiente de um organismo aeróbico. Isto resulta em profundas alterações bioquímicas que podem culminar em lesão celular e morte do organismo (Haugaard, 1968; Halliwell, 1978).

Os radicais livres são definidos como átomo ou molécula que possuem um par de elétrons não pareado, podendo ser um cátion, ânion ou nêutron, formados durante as reações biológicas, sendo as ERO as que despertam maior interesse (Sies, 1993). As ERO são formadas através da redução parcial do oxigênio até água, que ocorre através de sucessivas reações, conforme consta a diante.

Nos organismos aeróbicos a maior parte do oxigênio ( $O_2$ ) é reduzida intramitocondrialmente até água através da atividade da enzima citocromo c oxidase, que transfere quatro elétrons ao  $O_2$ , sem liberação de intermediários reativos:

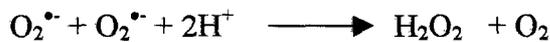
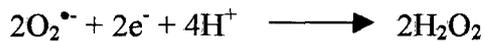


Entretanto, uma pequena fração do  $O_2$  presente nestes organismos é reduzida enzimaticamente, em passos monoelétrônicos, gerando intermediários reativos, as ERO. A redução do  $O_2$  molecular por um elétron dá origem ao radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), podendo ser formado enzimaticamente em quase todas as células aeróbicas, como um resultado da auto-oxidação de algumas moléculas (Freeman e Crapo, 1982):



O  $O_2^{\cdot-}$  é reduzido monoelêtronicamente em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esse processo pode ocorrer através da dismutação espontânea de duas moléculas de  $O_2^{\cdot-}$  ou

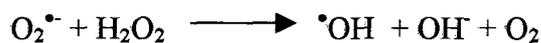
catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando dióxigênio e H<sub>2</sub>O (Farber et al., 1990; Ward & Timothy 1997).



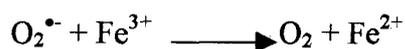
A redução do O<sub>2</sub> pelo terceiro elétron resulta na produção de um potente oxidante, o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ):



Os equivalentes redutores para a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser originados a partir do radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> Através da reação de Haber-Weiss:



Apesar desta reação ser termodinamicamente favorável, ela é cineticamente lenta (Di Giulio, et al., 1989). Geralmente estão envolvidos neste processo catalisadores de oxidação-redução, tais como metais de transição, principalmente o ferro e o cobre (Fe<sup>2+</sup> e o Cu<sup>+</sup>) (Ward & Timothy, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1998). Quando esta reação é catalisada por metais de transição é conhecida como reação de Fenton:



A redução do  $\bullet\text{OH}$  pelo último e<sup>-</sup> origina a molécula de água:



Além do O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e  $\bullet\text{OH}$ , o O<sub>2</sub> molecular no seu estado fundamental (triplete) pode ser eletronicamente excitado formando o oxigênio “singlete” (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Ward & Timothy, 1997).

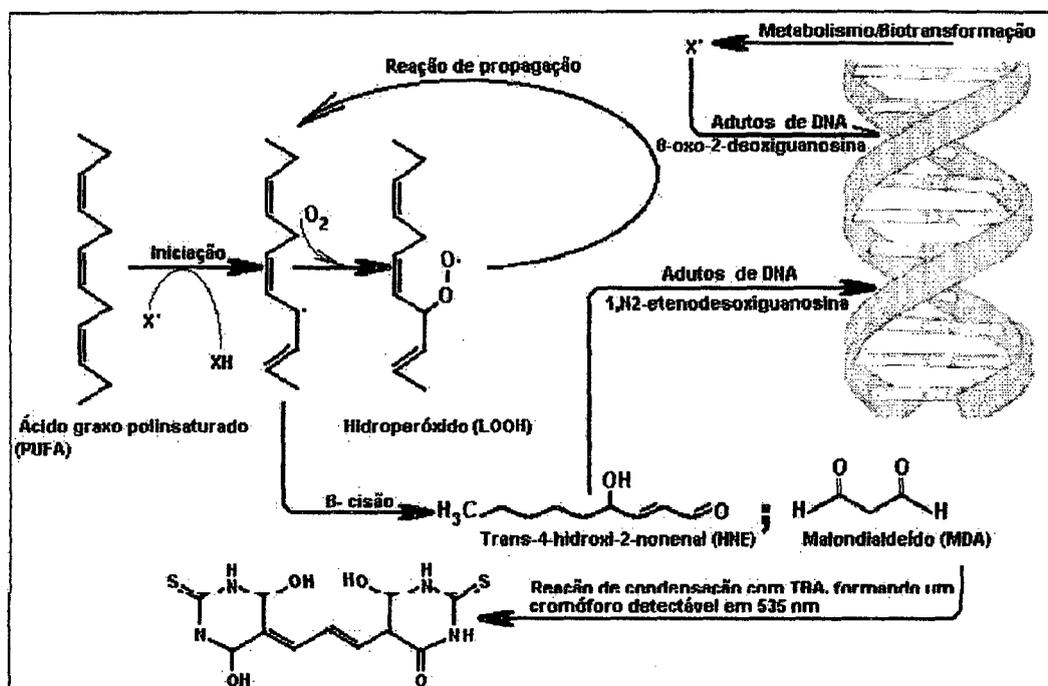
As ERO, quando formadas, ao reagir com biomoléculas, causam diferentes tipos de dano biológico, podendo, em última análise levar à morte celular. O radical que apresenta maior toxicidade é o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), que tem uma alta atividade de reação com os

constituintes celulares, oxidando resíduos de aminoácidos, produzindo as bases de Schiff, podendo também levar a uma alteração química das bases púricas e pirimídicas, quebrando a fita de DNA; ainda pode atacar lipídios de membrana produzindo uma peroxidação lipídica, alterando, assim, a organização da membrana celular. Estes hidroperóxidos de lipídios, na presença de íons ferro e cobre formam uma grande cadeia de aldeídos citotóxicos como malondialdeído e hidroxinonenal, os quais são capazes de modificar quimicamente proteínas e o DNA, conforme figura 1 (Punchard & Kelly, 1996; Ward & Timothy, 1997).

Outras formas de oxirradicais de oxigênio estão envolvidas no dano celular, como peroxinitrito (ONOO'), derivado da rápida reação entre o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) e o óxido nítrico ( $NO^*$ ), que ficou igualmente caracterizado por sua ação acentuadamente deletéria, apesar de não se tratar de uma ERO (Punchard & Kelly, 1996).

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 genericamente de estresse oxidativo (Croft, 1998; Sies, 1993).

Para minimizar os efeitos deletérios associados à constante formação das ERO, os organismos aeróbicos foram dotados ao longo do tempo evolutivo, de distintas defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Desta forma os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis podendo ser enzimáticos e não-enzimáticos (Halliwell & Gutteridge, 1998).



**Figura 1.** Geração dos hidroperóxidos de lipídios, propagação, ataque ao DNA, formação de adutos e geração de cromóforos.

### 1.2.1 Defesa Antioxidante Enzimática

Os principais sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas celulares são compostos pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil, que, embora de meia vida biológica curta, na fração de bilionésimos de segundo e, em reduzida concentração ( $\sim 10^{-18}M$ ), é extremamente reativo e danoso às células (Boveris & Cadenas, 1997).

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos, converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, pela dismutação do ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , constituindo-se numa primeira e importante defesa antioxidante na neutralização de etapas de iniciação na geração de espécies reativas de oxigênio (McCord & Fridovich, 1969). Durante o processo de dismutação, duas moléculas de ânion superóxido reagem seqüencialmente,

resultando na redução (ganho de elétrons) de uma e oxidação (perda de elétrons) de outra, conforme figura 2 (Fridovich, 1986).



As ações da CAT (localizada principalmente em nível de peroxissomas) e da enzima GPx (majoritariamente citosólica) incidem sobre a metabolização/degradação do peróxido de hidrogênio, que pode ser visualizado na figura 2. A CAT decompõe o  $H_2O_2$  em água e  $O_2$  (Farber et al., 1990).



Com exceção de algumas bactérias, algas cianofícias e alguns parasitas helmintos, a maioria das células aeróbicas possui atividade catalásica (Halliwell & Gutteridge, 1998). Nos animais, a CAT 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, Wilhelm Filho, *in press*). O cérebro, o coração e o músculo esquelético contêm somente pequenas quantidades de CAT (Halliwell & Gutteridge, 1998).

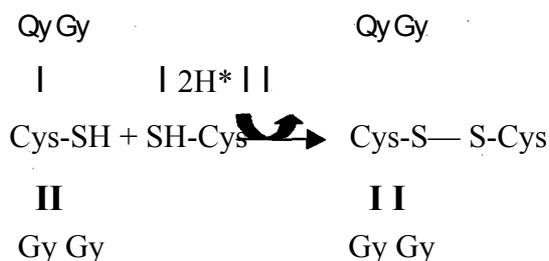
As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir o  $H_2O_2$  à água (Little & O'Brien, 1968; Christophersen, 1969);



Onde  $SH_2$  representa um substrato reduzido que é oxidado durante o ciclo catalítico.

Talvez a mais importante das peroxidases seja a GPx, enzima que possui selênio no sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo glutathiona (GSH) como doador de elétrons para a redução do  $H_2O_2$  e de outros peróxidos orgânicos, tais como lipoperóxidos provenientes da peroxidação lipídica, impedindo a fase de propagação deste processo, conforme figura 2 (Keeling & Smith, 1982).

Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathiona, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH, originando a glutathiona oxidada (GSSG), conforme o seguinte esquema:



A relação de concentração entre GSH/GSSG deve ser muito alta para a manutenção do poder redutor intracelular (Kosower & Kosower, 1978; Meister, 1983; Kappus, 1987). Nas células normais isto ocorre pela presença de enzimas acessórias. Dentre elas, a glutathiona redutase (GR), que utiliza elétrons do NADPH para a redução da ponte dissulfeto da GSSG, restabelecendo os níveis intracelulares de GSH. A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a 6-fosfogluconolactona desidrogenase, ambas enzimas da via das pentose-monofosfato, além da isotiocianato desidrogenase e enzima málica, fornecem os equivalentes redutores (NADPH) indispensáveis para a manutenção da atividade da GR (Reed, 1986).

Adicionalmente existe ainda a ação de degradação protéica, lipídica e do material genético, promovidas, respectivamente, pelas enzimas macroproteínase, fosfolipases, endo e exonucleases e DNA glicolases; além de ação reparadora das lipoperoxidases, DNA peroxidase, ligase e polimerase. Estas enzimas estariam também envolvidas na remoção de constituintes celulares moleculares que sofrem alterações devido à ação das ERO, algumas inclusive realimentando a célula pelo processo biossintético *de novo* (Davies, 1991).

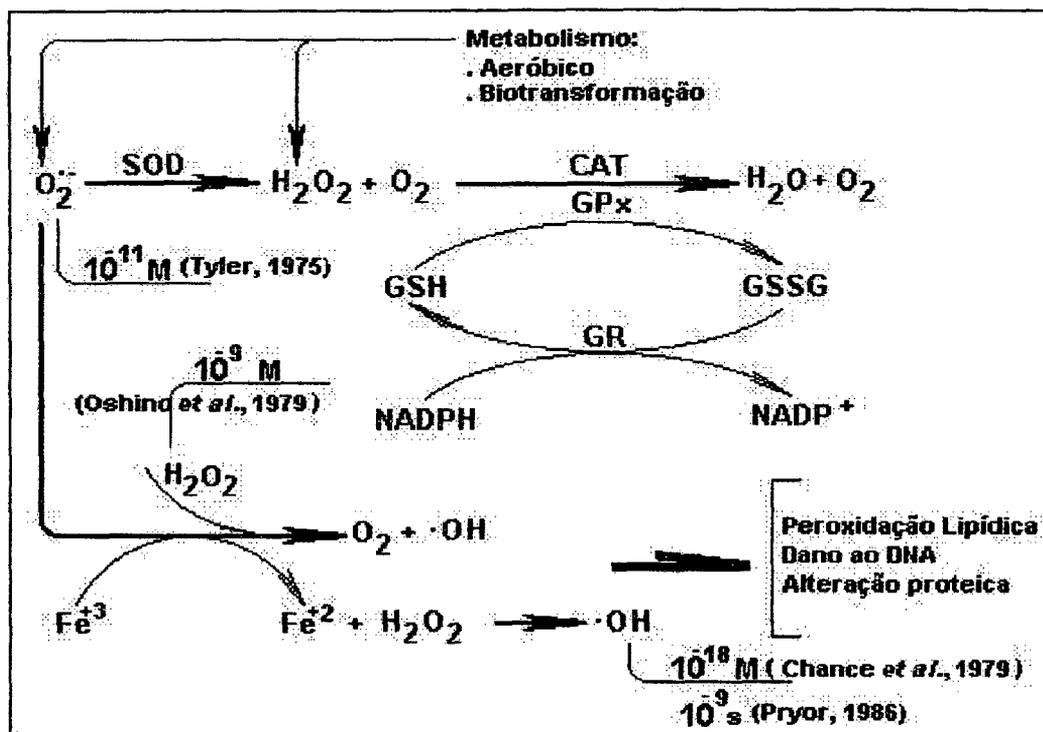


Figura 2. Esquema de integração das defesas antioxidantes enzimáticas, mostrando a geração de ERO e neutralização pelas enzimas citoprotetivas.

### 1.2.2 Defesa Antioxidante Não-Enzimática

As células também exibem antioxidantes não-enzimáticos que inclui compostos endógenos como a GSH e outros exógenos como a vitamina E, C, A, além de precursores carotenóides como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno, flavonóides e várias outras pequenas moléculas derivadas de fontes vegetais (Bors *et al.*, 1990; Scandalios, 1997).

As vitaminas lipossolúveis inseridas nas membranas celulares e de organelas conferem proteção às mesmas. Exemplos fundamentais constituem a vitamina E (principalmente o  $\alpha$ -tocoferol, além da presença de outras formas como o  $\gamma$ -tocoferol), a vitamina A, o  $\beta$ -caroteno e o licopeno, estes dois últimos excelentes na eliminação de oxiradicaís e da energia oriunda do oxigênio singlete  $^1O_2$ , respectivamente (Burton & Ingold, 1981; 1989; Krinsky, 1989; DiMascio *et al.*, 1989; 1990; Sies, 1993). A principal atuação da vitamina E consiste em inibir as reações de propagação decorrentes das reações em cadeia envolvendo a peroxidação lipídica (Krinsky, 1989; Burton & Ingold, 1989; Sies, 1993).

Foram ainda evidenciadas e caracterizadas as contribuições de várias moléculas de pequeno tamanho na detoxificação de ERO, destacando-se os pigmentos biliares como a bilirrubina (Stocker et al., 1990); hormônios estrógenos, (Bors et al., 1990) e quinonas (Beyer, 1992; Mellors & Tappel, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1998).

### 1.3 Helmintos e defesas antioxidantes

o papel das enzimas antioxidantes nos processos fisiológicos tem sido revisto com muita atenção em diversas áreas, incluindo o seu importante papel no envelhecimento, nas injúrias de isquemia e reperflusão, como as doenças cardiovasculares, processos carcinogênicos, e também na parasitologia (Callhan et al, 1988).

Todos os helmintos são aeróbicos facultativos, mostrando vários níveis de tolerância à deficiência de oxigênio, sendo que a maioria dos helmintos parasita o intestino e vive em um ambiente pobre em oxigênio, sendo seu consumo estritamente dependente da tensão de oxigênio (Docampo & Moreno, 1984). Em concordância com sua vida predominantemente anaeróbica *in vivo*, os helmintos são muito sensíveis às ERO. O efeito do estresse oxidativo nos helmintos parasitários tem sido estudado em detalhes em alguns parasitas como *T. spiralis*. Amostras de *T. spiralis* são mortas depois da incubação com  $O_2^{*}$  e  $H_2O_2$ , gerado pelos sistemas como acetaldeído-xantina oxidase ou glicose-glicose oxidase. O efeito larvicida destes sistemas é bloqueado pela adição de SOD ou CAT, e parcialmente inibido por “scavengers” (Docampo, 1989).

Os helmintos são extremamente deficientes em enzimas capazes de neutralizar as ERO. Vários estudos demonstram que a maioria dos helmintos não apresenta glutatona e a única defesa enzimática contra as ERO que estes animais parecem apresentar, é uma baixa atividade de SOD e de CAT (Docampo, 1989).

A SOD ocorre em inúmeras espécies de nematodos e trematodos, e a provável função desta enzima no processo metabólico destes parasitas tem sido estudada (Sanchez-Moreno, et al, 1987, 1989). A atividade da SOD foi descrita no tecido de alguns helmintos, mas não foi completamente caracterizada (Paul & Barrett, 1980; Rhoads, 1983; Garcia-Ruiz et al., 1986).

Nos mamíferos, o produto final da SOD é o  $H_2O_2$ , o qual é destruído pela CAT. Algumas enzimas de mamíferos produzem peróxido de hidrogênio, os quais são geralmente seqüestrados pelas organelas subcelulares (peroxisomas) juntos com a CAT. Para os helmintos parasitas, entretanto, a atividade da CAT é baixa ou ausente, e muitos destes organismos utilizam outros métodos para catálise do peróxido de hidrogênio (Paul & Barret, 1980).

No entanto, em uma pequena parcela destes parasitas, também foi encontrada a GPx. O papel destas enzimas nos parasitas e em outros organismos é de proteção contra o dano causado pelos oxidantes, os quais são produzidos durante o processo metabólico celular normal, durante os processos de radiação e o mecanismo de ação de certos fármacos antiparasitários (DoCampo & Moreno, 1986). Mas, ao mesmo tempo, parece que os helmintos utilizam como “substitutas das peroxidases de mamíferos”, as peroxiredoxinas. Estas peroxiredoxinas são comuns em bactérias, protozoários e helmintos; entretanto, o papel metabólico das mesmas ainda não foi bem estabelecido (Chae et al., 1999; Flohé et al., 1999).

Maiorino e colaboradores (1996), encontraram uma espécie de GPx contendo selênio no *Schistosoma mansoni*, mas parece que ela está presente somente durante a maturação dos ovos, como um sistema de proteção antioxidante.

As infecções por helmintos são freqüentemente caracterizadas pelo aumento no número de eosinófilos circulantes ou concentrados em um tecido específico. Além do nível de algumas células como leucócitos, macrófagos, neutrófilos e basófilos estarem envolvidas nestas infecções secretando uma grande quantidade de  $O_2^*$ . A importância das ERO nas infecções por helmintos, é que estes parasitas podem ter apenas uma pequena atividade da SOD, protegendo de forma ineficiente estes parasitas contra o ataque de muitos leucócitos (Sanchez-Moreno, 1996).

Muitos helmintos aparentemente possuem quantidades suficientes de enzimas antioxidantes que os protegem contra os oxidantes gerados pela atividade de fagócitos *in vivo*. Entretanto, os helmintos são muito suscetíveis aos fagócitos e oxidantes *in vitro*. Isto provavelmente ocorre porque os níveis de enzimas antioxidantes do parasita refletem uma adaptação ao estresse ou a outras respostas do hospedeiro. O aumento nos níveis do

metabolismo aeróbico pode levar a um aumento na produção de enzimas antioxidantes (Smith & Bryant, 1986; Callahan et al., 1988).

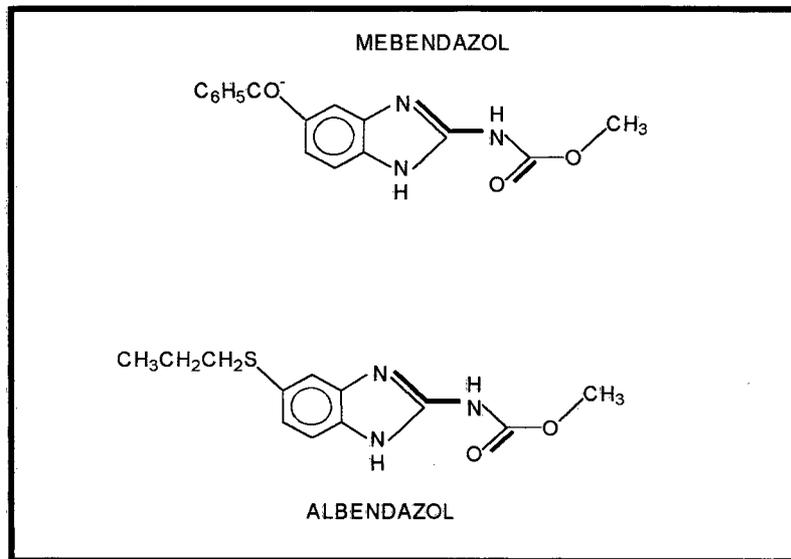
Diferentes espécies de parasitas e diferentes estágios de seus desenvolvimentos apresentam maior ou menor suscetibilidade às ERO, sugerindo que muitos parasitas podem apresentar diferentes níveis basais destas enzimas antioxidantes, dependendo da sua fase de desenvolvimento e da espécie. A estimulação da síntese ou da atividade destas enzimas antioxidantes na presença de ERO e a inibição das mesmas na ausência destes radicais parece bastante evidente (Wassom & Gleich, 1979; Scott et al., 1985).

## **1.4 Tratamento das helmintíases**

Como os helmintos são organismos anaeróbicos ou aeróbicos facultativos, que vivem com baixas tensões de oxigênio, alguns antihelmínticos parecem exercer sua ação deletéria através da geração de ERO, que são extremamente tóxicas a estes parasitas, já que os mesmos não apresentam defesas antioxidantes apropriadas como os organismos aeróbicos.

Na atualidade, os principais fármacos utilizados para o tratamento destes helmintos são os derivados da família benzimidazóis que incluem entre outros o mebendazol e albendazol (Goodman & Limbird, 1996), os quais são quimicamente muito semelhantes, conforme figura 3. Estes antihelmínticos são quimioterápicos de amplo espectro e polivalentes, pelo fato de agirem contra várias espécies de parasitas (Korolkovas, 1997).

Na década de 60 um grupo da Merck-Sharp-Dohme detectou ação antihelmíntica em derivados benzimidazólicos. A partir do composto inicialmente ativo, o 2-fenilbenzimidazol, foram sintetizados e testados centenas de derivados. O primeiro derivado comercializado em 1961 foi o Tiabendazol. Foi um grande progresso terapêutico, pois apresentava ação antihelmíntica intensa, reunindo ainda, baixa toxicidade. Como apresentava rápida absorção e biotransformação, devido a hidroxilação na posição 5, foram investigados derivados substituídos nestas posições. Desta forma, surgiram o Carbenbazol e o Mebendazol e Albendazol.



**Figura 3:** Estrutura química dos fármacos antihelmíntico mebendazol e albendazol.

Os fármacos da família benzimidazóis produzem muitas alterações bioquímicas nos helmintos suscetíveis. Eles são muito utilizados no controle de infecções por helmintos, tanto em monoparasitoses como em poliparasitoses, em muitos países onde as helmintíases são endêmicas (Gilles, 1996), principalmente nos países sub-desenvolvidos onde o sistema de saneamento básico é deficiente.

Nos países onde a transmissão destas helmintíases é sazonal, é realizada uma importante campanha de prevenção e tratamento. Nestas circunstâncias, são realizados dois tratamentos, um primeiro tratamento 8 semanas após começar a estação úmida, e um segundo realizado 8 semanas após cessar as chuvas, reduzindo o risco de reinfecção durante a estação seca. Nos países onde a infecção é perene, o tratamento é feito 3 a 4 vezes por ano (Gilles, 1996).

Em geral, mulheres grávidas e crianças com menos de dois anos de idade ou que pesam menos de 10Kg, não são incluídas nas campanhas comunitárias de controle quimioterápico, porque constitui um grupo de alto risco, ocorrendo relatos de casos fatais após alguns dias da administração do fármaco, aspecto que foi atribuído ao seu efeito tóxico (Silva et al., 1997).

Os medicamentos mais comumente utilizados nas campanhas de controle comunitário são os antihelmínticos albendazol, mebendazol, pirantel e levamisol. São fármacos de amplo espectro, atingindo uma grande variedade de parasitas, de fácil administração, na maioria das

vezes em doses únicas por via oral (Silva et al., 1999). No entanto, estes fármacos podem causar vários efeitos adversos, desde uma leve dor de cabeça até problemas mais sérios, incluindo dor epigástrica, diarreia, náuseas, vômitos, constipação e boca seca, sendo que a maioria destes efeitos parece ser mais freqüente na administração de albendazol (Gilles,1996).

O albendazol [metil-(5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il)-carbamato] é o antihelmintico mais utilizado no controle comunitário de helmintíases. Parece ser pouco absorvido pelo trato gastrointestinal; no entanto, é rapidamente metabolizado em derivados sulfóxido e sulfona. O metabólito sulfóxido é responsável pela atividade antihelmintica do fármaco *in vivo* (Gilles,1996; Goodman & Limbird, 1996; Silva et al., 1997). Após ser administrado por via oral sofre uma absorção de cerca de 5 a 10%, tendo uma eliminação pré sistêmica rápida (Korolkovas, 1997).

O albendazol foi primeiramente introduzido no tratamento de infecções por helmintos em ovelhas no ano de 1977, e subseqüentemente utilizado em humanos no ano de 1983. O albendazol é rapidamente biotransformado no fígado, e seu metabólito primário, albendazol sulfóxido, que apresenta atividade antihelmintica, atinge uma concentração de 0,25 a 0,30 µg/ml cerca de 2,5 a 3 horas após administração de uma dose. A ligação do metabólito sulfóxido às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 70%, tendo uma meia vida biológica de 8 a 9 horas, sendo excretado pela urina nas primeiras 24 horas (Korolkovas, 1997). A biotransformação do albendazol em compostos ativos parece ser mediada pelo sistema multienzimático citocromo P450 (CYP450) e flavina monooxigenase (FMO) (Bogan & Marriner, 1980).

O albendazol é comercializado na forma de comprimidos de 200 e 400mg e em suspensão pediátrica de 2 e 4%. Uma dose única de 400mg é muito mais efetiva do que múltiplas doses de mebendazol contra *A. lumbricoides* (Silva et al., 1997). O albendazol responde bem a infecções maciças, administrando-se doses durante três dias. Múltiplas doses de albendazol também são requeridas para o tratamento de strongiloidiases, além de outras infecções como: capilariases, teníases, cisticercose, hidantiose alveolar e cística, larva migrans cutânea e larva migrans visceral (Silva et al., 1997). No tratamento de strongiloidiase ou teniase onde é exigido um tratamento de 3 dias consecutivos, caso não ocorra cura após 3 semanas deve-se efetuar um segundo tratamento (Korolkovas, 1997).

O albendazol é efetivo contra *Giardia ssp* no homem e cães e também contra trematodas em gatos, além de agir contra vários outros helmintos. Para o tratamento de giardiase é usado uma dose única de 400mg diariamente durante 5 dias consecutivos. A ação antihelmíntica dos benzimidazóis é baseada na habilidade deles interferirem no microtúbulo do citoesqueleto dos parasitas e protozoários ligando-se à tubulina, inibindo a polimerização da tubulina e formação de microtúbulos. Este fármaco tem uma alta afinidade pela tubulina do parasita; entretanto, em doses mais altas, pode ligar-se à tubulina dos mamíferos, resultando na toxicidade terapêutica (Lacey, 1990).

Delatour e Parish (1986) sugeriram que a toxicidade causada em embriões pelos antihelmínticos benzimidazólicos seria devido à sua capacidade em se ligar à tubulina das células, sendo responsáveis por sérias malformações congênitas como agenesia renal, rim ectópico, espinha bífida, fixação de vértebra e anomalias vasculares (Fabre et al., 1989; Navarro, 1996). Cristofol e colaboradores (1995) encontraram os metabólitos sulfóxidos e sulfona na placenta, em quantidades suficientes para afetar o feto.

Stokol e colaboradores (1997), relataram casos de animais de pequeno porte (cães e gatos), que após tratamento de giardiase e de outros trematodas com doses de albendazol, apresentaram toxicidade medular. Estes cães e gatos desenvolveram pancitopenia causada pela injúria da medula óssea, com mudanças morfológicas nos precursores mielóides, com aumento da basofilia e vacuolização citoplasmática, além da presença de neutrófilos gigantes.

Muito desta toxicidade induzida pelo fármaco pode ser dose-dependente e previsível, ou idiossincrática. Estes fármacos podem interromper a hematopoiese por vários mecanismos diretos ou por iniciar uma resposta imune anormal, afetando diferentes componentes da medula (Weiss, 1993).

O mebendazol [metil-N-(5benzoil-2-benzimidolil)- carbamato] outro antihelmíntico muito utilizado, também derivado benzimidazólico, parece inibir a glicólise dos helmintos, resultando em um aumento da utilização do glicogênio, causando depleção das reservas parasitárias deste, tendo, como conseqüência, a diminuição da síntese de ATP e depressão de energia dos parasitas (Gilles,1996).

O mebendazol é pouco absorvido e biotransformado pelo fígado em compostos inativos (Gilles, 1996), tendo como metabólito primário o 2-amino-5-benzoilbenzimidazol. Este fármaco foi introduzido na terapêutica primeiramente para o tratamento de nematodas intestinais humanos em 1972. É comercializado na forma de comprimidos de 100 e 500mg e em suspensão com concentração de 100mg/5ml. É comumente utilizado em regimes de 100mg duas vezes ao dia, durante três dias, ou em dose única de 500mg (Silva et al., 1997).

O uso prolongado (20 a 30 dias) de mebendazol também é preconizado no tratamento de *Capillaria philippinensis*, e altas doses são também efetivas no tratamento de *Echinococcus granulosus* (Silva et al., 1997). É administrado por via oral sofrendo uma absorção de 5 a 10%, a qual pode ser aumentada quando ingerido concomitantemente com alimentos gordurosos. Liga-se fortemente às proteínas, atingindo níveis plasmáticos máximos dentro de 2 a 5 horas, com meia vida biológica de 2,5 a 9 horas sendo capaz de atravessar a barreira placentária. Excretado na forma íntegra ou como metabólito primário, sendo aproximadamente 95% pelas fezes e 2 a 5% pela urina (Korolkovas, 1997).

Estudos realizados por Antunes e colaboradores (1994) para avaliar o potencial mutagênico deste fármaco em células da medula óssea de ratos Wistar, indicam que o mebendazol não é capaz de induzir um aumento significativo de aberrações cromossômicas, mas, no entanto, demonstrou que ele é eficiente em bloquear o ciclo celular na fase de metáfase.

Em Sri Lanka, nos anos 80, foi administrado mebendazol em mulheres grávidas após completar o primeiro trimestre de gravidez, onde a infecção por *N. americanus* era endêmica, e mais de 60% das mulheres grávidas apresentavam anemia relacionada a esta parasitose. Silva e colaboradores (1999) compararam os principais efeitos congênitos em crianças nascidas de mães que receberam mebendazol durante a gravidez com as que não receberam e não perceberam um aumento significativo de defeitos congênitos nestas crianças, indicando que o mebendazol pode ser administrado após o primeiro trimestre de gravidez nos países onde a infecção por helmintos intestinais é endêmica e constitui um problema de saúde pública. Os antihelmínticos ABZ e MBZ são muito efetivos contra uma grande variedade de helmintos, conforme pode ser visualizado nos quadros 1 e 2.

Quadro 1. Efeito antihelmíntico comparativo dos fármacos ABZ e MBZ no tratamento de infecções mais comuns causadas por nematodos.

Infecções	ABZ	MBZ
Ascaridíase	++	++
Trichuriase	+	++
Strongyloidíase	+	±
Enterobiase	++	++
Trichinelose	±	±
Capilariase intestinal	+	+
Larva migrans cutânea	+	-
Larva migrans visceral	+	+
Filariose linfática	-	-

\* Fonte: Silva et al., 1997.

++ Alta efetividade

± Mínima efetividade

+ Moderada efetividade

- Sem efeito

Quadro 2. Efeito antihelmíntica comparativo dos fármacos ABZ e MBZ usados no tratamento das infecções mais comuns causadas por trematodas e cestodas.

Infecções	ABZ	MBZ
Teníase	+	±
<i>Hymenolepis nana</i>	-	-
Cisticercose	+	±
Echinococcose	+	+
<i>Schistosoma mansoni</i>	-	±
<i>Schistosoma haematobium</i>	-	±
<i>Schistosoma japonicum</i>	.	-

\* Fonte; Silva et al., 1997.

++ Alta efetividade

± Mínima efetividade

+ Moderada efetividade

- Sem efeito

## 1.5 Estresse Oxidativo induzido pela Biotransformação dos Fármacos

Com o rápido processo da industrialização aumentou a exposição a vários compostos estranhos ao organismo (xenobióticos) como - aditivos alimentares, fármacos, contaminantes em geral, e materiais de construção (Waxman, 1999). Na maioria das vezes, estas substâncias são lipofílicas e facilmente absorvidas pelas vias de entrada dos organismos (Heath, 1987; 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, através de sistemas de oxidação mista entre as famílias do CYP450 (Waxman, 1999).

O citocromo P450 (CYP), um sistema de enzimas que biotransforma xenobióticos, costuma ser uma defesa primária contra compostos estranhos. O aumento da expressão de um gene específico do CYP é uma resposta particular de um determinado xenobiótico para sua eliminação; entretanto, a indução também pode aumentar a produção de metabólitos reativos tóxicos (Wei, 2000).

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, sua estrutura protéica 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 CYP450 identificados e classificados em famílias, subfamílias e isoformas específicas, com base na homologia da seqüência de aminoácidos. O mecanismo catalítico do CYP450 é similar devido à funcionalidade conservada da região heme-tiolato, 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).

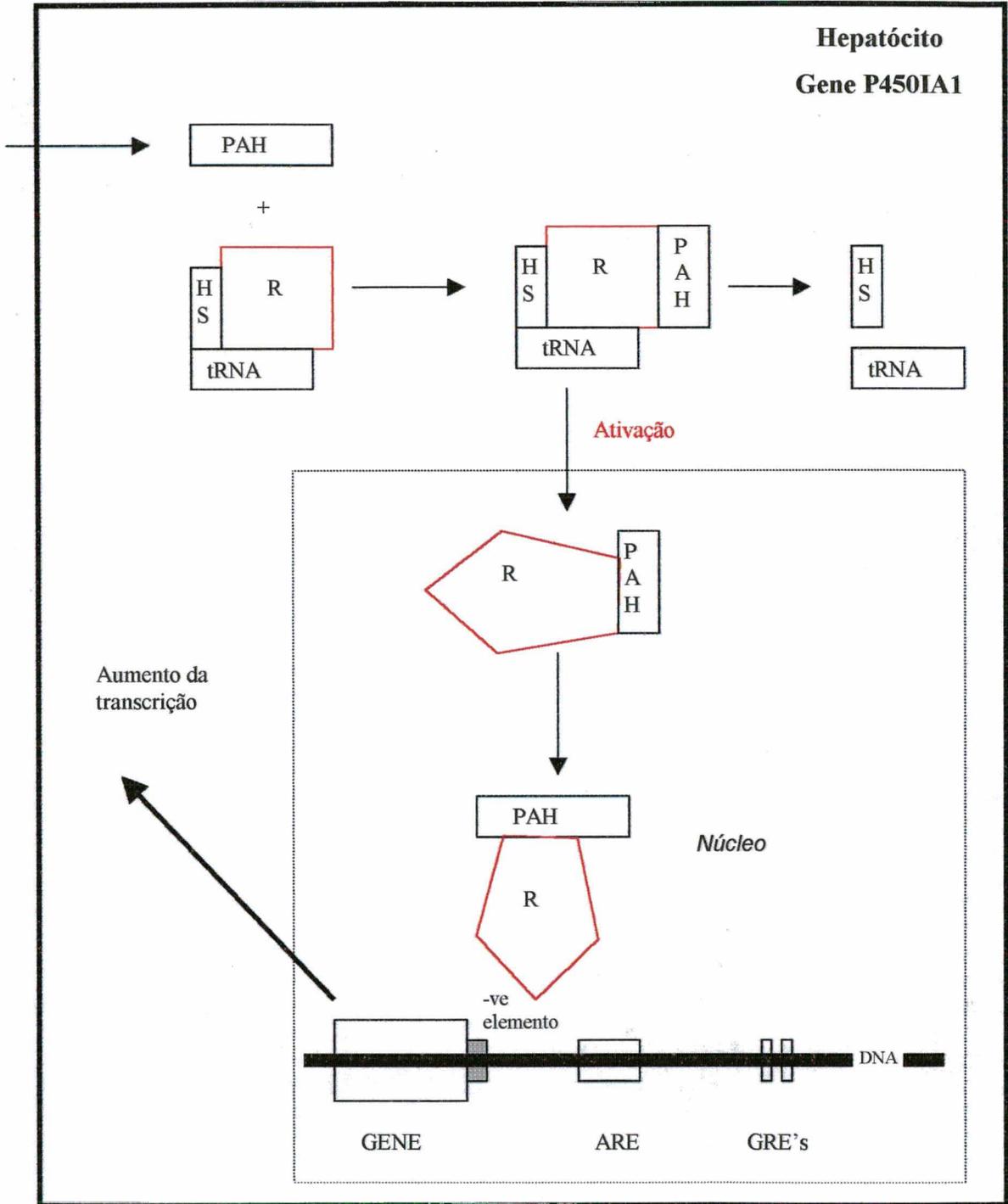
A isoforma CYP1A1 pertence ao sistema de monooxigenases citocromo P450. Paradoxalmente, enquanto estas enzimas são essenciais na detoxificação de xenobióticos, o CYP 1A1 catalisa a ativação de compostos pró-carcinogênicos, frequentemente produzindo intermediários reativos mutagênicos e/ou carcinogênicos (Guengerich, 1990).

Vários agentes anti-micóticos imidazólicos, incluindo clotrimazol, miconazol e cetoconazol, têm efeitos na expressão do citocromo P450 (Lavrijsen et al., 1986). Entre os fármacos benzimidazólicos, como o omeprazol, o lansoprazol e o 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-EI 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 o metabolismo 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, assim como os compostos carcinogênicos 3-metilcolantreno (3-MC) e  $\beta$ -naftoflavona (PNF) são protótipos indutores de várias enzimas do sistema CYP450, mais especificamente as isoformas 1A1/1A2 e IBI (Denison & Whitlock, 1995).

Wei e colaboradores (2000) identificaram um receptor de hormônio nuclear chamado CAR, o qual é responsável pelo aumento da toxicidade da cocaína na presença de fenobarbital. Xie e colaboradores (2000) demonstraram a existência de receptores, os quais, por si próprios promovem a ativação de diferentes enzimas do sistema citocromo P450. Como já havia sido demonstrado por Hodgson & Levi (1994), alguns xenobióticos hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) são capazes de induzir uma família de genes das proteínas P4501A1. Isto 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 (HSPs). 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). Resulta 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 & Gonzales, 1987), conforme pode ser visualizado na figura 4.



**Figura 4:** Mecanismo proposto para o aumento da produção de enzimas pelos xenobióticos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos PAH), onde R é o receptor Ah; HS às heat shock protein; ARE elemento responsivo a xenobiótico; GRE elemento responsivo a glicocorticóides (Hodgson & Levi, 1994).

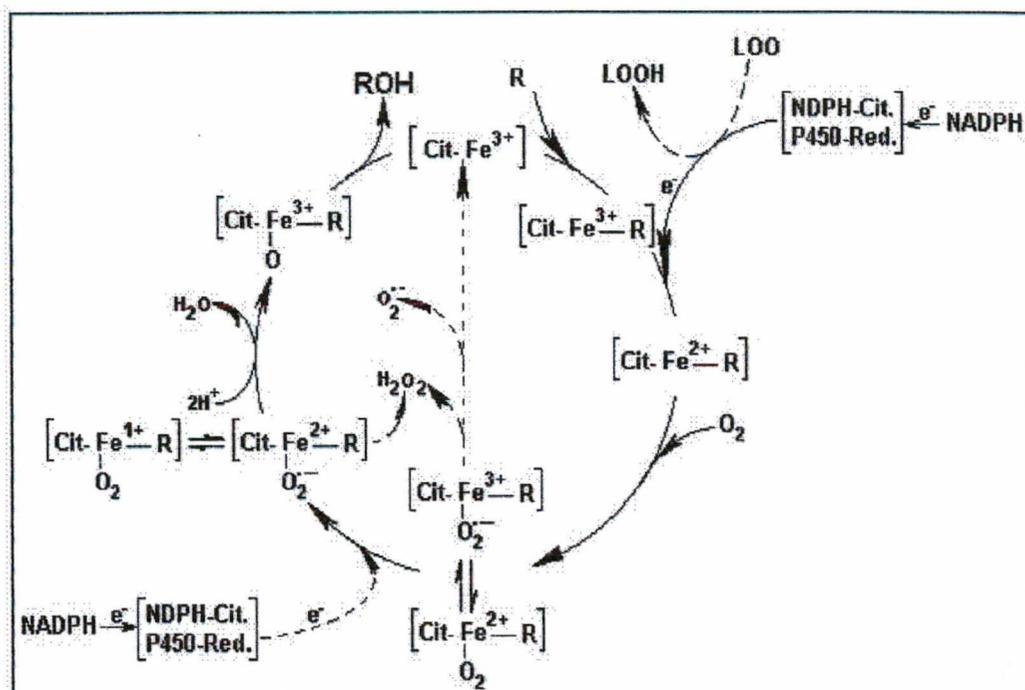
O dano celular associado ao estresse oxidativo pode ser induzido em organismos expostos a diferentes classes de substâncias químicas estranhas aos mesmos (Vaz et al., 1989; Videla & Guerri, 1990; De Groot et al., 1991). Desta forma, a exposição constante dos seres

vivos às substâncias químicas constitui uma das principais causas do estabelecimento de vários processos mutagênicos e carcinogênicos ( Di Giulio et al., 1989).

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 reatividade química 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 hidrosolúveis, que são mais facilmente excretados (Hodgson & Levi, 1994). O objetivo da biotransformação é produzir compostos mais solúveis para serem eliminados do organismo; no entanto, muitos compostos tomam-se mais reativos e mais tóxicos quando biotransformados.

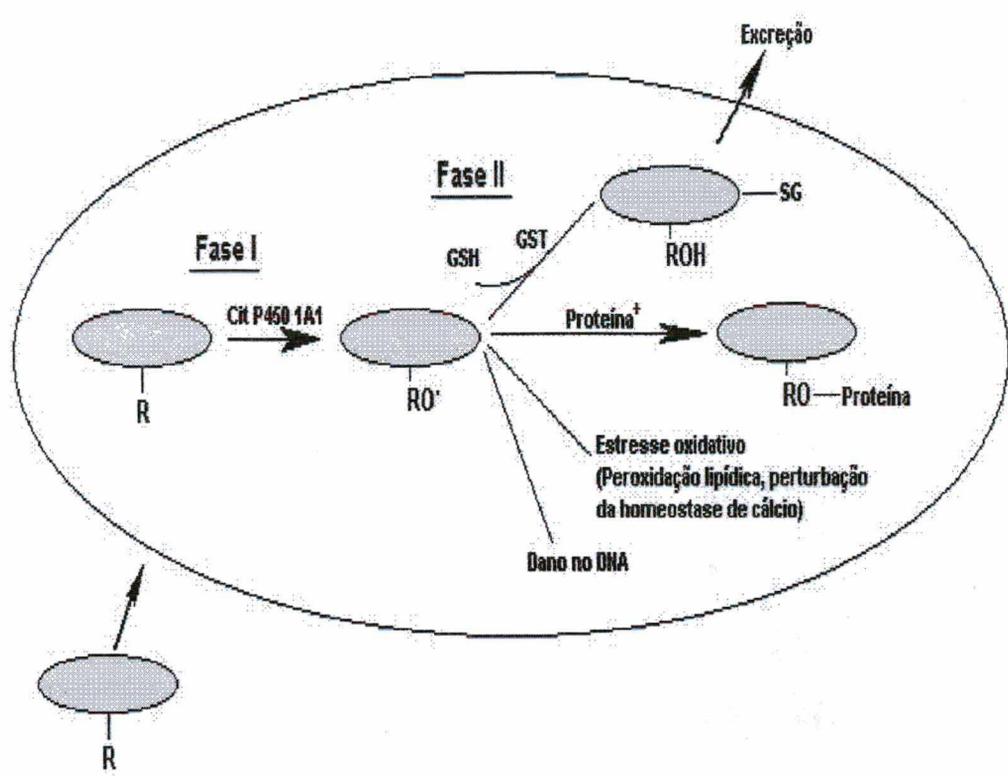
Uma das principais reações da fase I é a monooxigenação microsomal. Esta reação é catalisada por enzimas não específicas tais como, as monooxigenases que contém flavina (FMO), ou pelo sistema multienzimático que contém o citocromo P450 (CYP450) como oxidase terminal (Guengerich, 1990). As monooxigenações 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 (Hodgson & Levi, 1994), conforme figura 5.

Os próximos passos envolvem uma interação inicial com oxigênio molecular, formando um complexo ternário oxigenado. Este complexo ternário aceita um segundo elétron, resultando na formação de um ou mais complexos. Um destes, entretanto, é provavelmente o equivalente de um radical ânion superóxido derivado do substrato ligado à hemoproteína. Após a transferência de um átomo de oxigênio para o substrato e de outro para formar água, ocorre a reação de dismutação que leva à formação do produto hidroxilado, água e citocromo P450 oxidado (Hodgson & Levi, 1994). Em determinadas circunstâncias, quando este ciclo encontra-se desacoplado, o complexo pode ser dissociado, originando peróxido de hidrogênio e o complexo CYP450 oxidado-substrato (Timbrell, 1991).



**Figura 5.** Seqüência de eventos para as moxigenações catalisadas pelo citocromo P450. (R) figura aqui como um xenobiótico; observar as seqüências de reações formando água, o complexo ternário oxidado e o produto hidroxilado. Observar também, em função do desacoplamento do ciclo, a geração de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Hodgson & Levi, 1994).

Os mecanismos de toxicidade dos xenobióticos estão diretamente relacionados com a sua estrutura química e com os processos envolvidos na sua biotransformação (Hodgson & Levi, 1994). Por exemplo, nas reações de detoxificação de carcinogênicos, medicamentos e substâncias químicas, as reações oxidativas da biotransformação (Fase I) resultam na formação de metabólitos que sofrerão uma subsequente conjugação (Fase II), através principalmente da ação das enzimas epóxido hidrolase, glutathiona S-transferase e UDP-glucuronil transferase, para formar conjugados que serão mais facilmente eliminados das células e do organismo. Em contraste, a ativação de carcinogênicos, fármacos e compostos tóxicos, através de oxidação ou redução, resultam na formação de pró-carcinogênicos ou intermediários reativos, que geralmente não são substratos para as enzimas de conjugação, que, por sua vez, reagem covalentemente com biomoléculas (proteínas, lipídios, carboidratos, RNA, DNA) podendo causar mutações, câncer e morte celular (figura 6) (Parke, 1987).

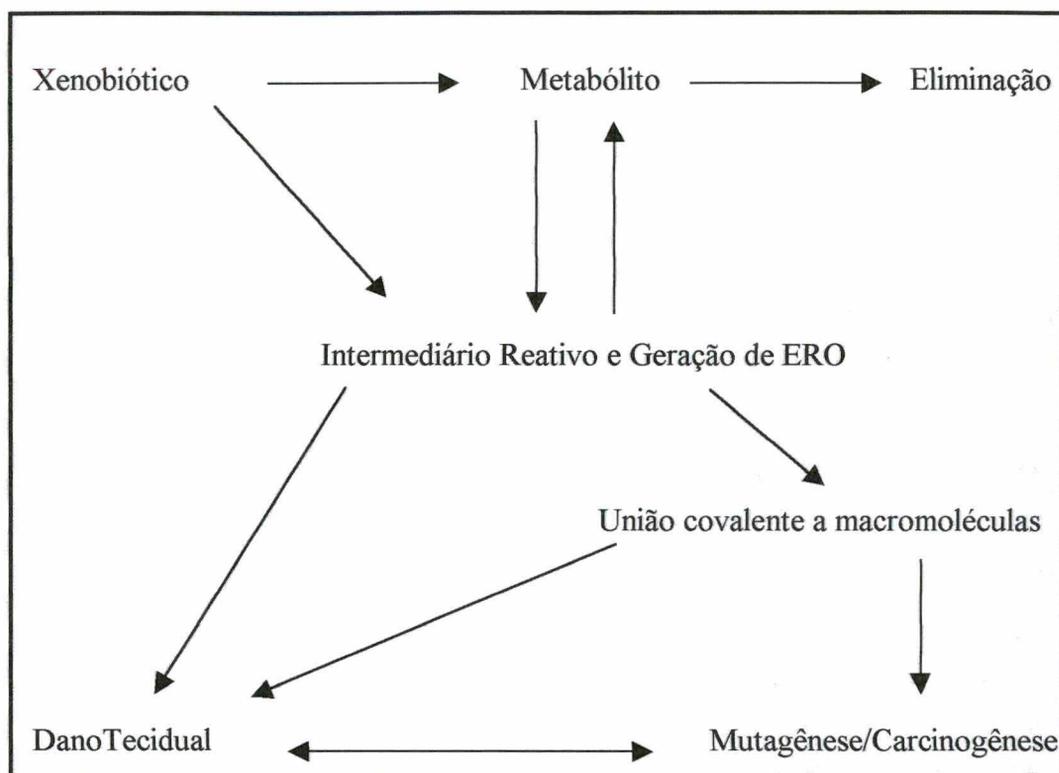


**Figura 6.** Esquema generalizado do processo de biotransformação: o complexo multienzimático CYP450 cataliza a bioativação do composto (Fase I), enquanto que a conjugação e posterior excreção é catalisada pela GST, mediante a transferência do grupamento tiol, GSH.

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 NADPH citocromo P450 redutase estão localizados (Hodgson, 1994). Assim, qualquer caminho possível dos intermediários reativos dentro da célula encontrará as membranas das organelas ou a membrana plasmática. Desta maneira, as ERO podem promover a peroxidação lipídica que, além de comprometer a integridade estrutural das membranas, vai gerar produtos tóxicos derivados, como os 4-hidroxicenais e outros aldeídos, que podem se mover dentro e fora da célula, produzindo dano em sítios distantes ao do local de formação (Comporti, 1989). Intermediários eletrofilicos, gerados pela atividade oxidativa do CYP450, igualmente podem reagir facilmente com nucleotídeos celulares, como a GSH (Comporti, 1989).

Reações do “ciclo redox” são caracterizadas pela 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 de

quantidades apreciáveis de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e  $\bullet OH$ , que podem se sobrepôr à proteção dada pelos diferentes mecanismos de defesa antioxidante, causando estresse oxidativo celular (Di Giulio et al., 1989). A figura 7 resume a relação entre biotransformação e toxicidade de um xenobiótico.



**Figura 7:** Biotransformação e toxicidade de xenobióticos

Dentro deste contexto, a exposição a fármacos, particularmente aqueles de uso popular consagrado, assume grande importância, devido à possibilidade de geração de ERO e indução enzimática.

Os principais fármacos utilizados no tratamento das helmintíases são os derivados imidazólicos, albendazol e mebendazol, com grande potencial terapêutico, estando entre os antiparasitários mais utilizados; seu uso é muito difundido, independentemente das condições sócio-econômicas vigentes. Por serem utilizados há muito tempo, estes medicamentos são considerados populares e poucas são as restrições quanto à sua utilização, levando ao uso indiscriminado pela população em geral.

A maior preocupação ao seu uso reside na potencial toxicidade destes medicamentos, pois, apesar de não se saber com clareza o mecanismo de ação farmacológico destes compostos, existem evidências que os mesmos podem agir através da geração de ERO, sendo que alguns pesquisadores têm sugerido que estes derivados imidazólicos são capazes de induzir o sistema de oxidação mista (citocromo P450), em especial a isoforma P450 1A1, a qual tem sido freqüentemente associada à ativação de compostos mutagênicos e carcinogênicos, causando seus efeitos nocivos, não apenas ao parasita, mas também ao hospedeiro (Gleizes et al., 1991; Barker et al., 1994).

O presente estudo tem por objetivo principal avaliar o potencial tóxico destes anti-helmínticos através da medida do estresse oxidativo dos animais submetidos a este tratamento, pela determinação de suas defesas antioxidantes, e o potencial mutagênico pela determinação da atividade e expressão do citocromo P450 1A1, no sentido de verificar o impacto deste tratamento no hospedeiro.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Fazer uma avaliação comparativa do efeito dos antihelmínticos albendazol e mebendazol em termos de estresse oxidativo, defesa antioxidante causados no hospedeiro, bem como da expressão de enzimas da Fase I (CYP450) e da Fase II (GST) de biotransformação de xenobióticos, sobre o hospedeiro, utilizando fígado de ratos Wistar como modelo experimental. Fazer uma avaliação risco/benefício dos dois fármacos em termos dos parâmetros anteriormente citados.

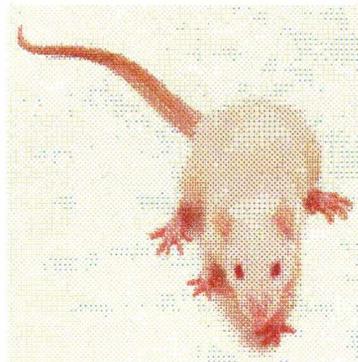
### **2.1 Objetivos Específicos**

Verificar as diferenças nos níveis de diferentes defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, bem como nos níveis de lipoperoxidação (TBARS), no fígado de ratos tratados (tempos de 2, 4, 8 e 10 dias) com albendazol e mebendazol, comparativamente ao grupo não-tratado (grupo controle);

Verificar a indução da atividade EROD e expressão do citocromo P450, em especial a isoforma IA1, no fígado de ratos tratados (tempos de 2, 4, 8 e 10 dias) com albendazol e mebendazol, comparativamente ao grupo não tratado (grupo controle).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais



Para avaliar o potencial oxidativo e a indução do CYP1A1 dos fármacos (albendazol e mebendazol) foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, de aproximadamente 60 dias, não tratados com fármacos anti-parasitários, pesando  $200 \pm 50$  gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram pesados e distribuídos em grupos de 6 animais, permanecendo no biotério por um período de adaptação de 10 dias antes da realização dos experimentos, em gaiolas plásticas, mantidos à temperatura 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

Albendazol [metil-(5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il)-carbamato] e mebendazol [metil-N-(5benzoil-2-benzimidolil)- carbamato] foram dissolvidos 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 e 10 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 de pH 7,4 e outra para preparação de microssomas.

Além disto, para avaliar a indução da atividade e expressão do citocromo P4501A1 foi constituído 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, 8 e 10 dias.

### **3.3 Preparação das amostras**

#### **3.3.1 Homogenato**

Os fígados dos animais foram retirados e colocados imediatamente em gelo. Uma pequena porção foi separada 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 realizada a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogenizador Potter-Elvehjem, seguidos de centrífuga a 10000 g durante 10 minutos. Os sobrenatantes foram mantidos a -20°C até a sua utilização para as diferentes análises 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 centrífuga a 10000 g durante 10 minutos. Imediatamente após foi realizada a determinação dos tióis não-proteicos (GSH, GT e GSSG) nestes sobrenatantes.

#### **3.3.3 Fração Microssomal**

Os microssomos foram preparados pelo método proposto por Schenkman, (1978). onde os fígados foram rapidamente removidos e homogenizados numa concentração de 16,7% com tampão Tris-sacarose 10mM pH 7,4 e centrifugados em centrifuga refrigerada, 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  $\text{CaCl}_2$  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 ressuspendida com tampão de conservação glicerol. Os microssomos 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 incubados em tampão Tris-HCl 60 mM 7,4 (0,1 mM DPT A) 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 medido em 535nm, sendo os valores expressos em TBARS nmol g<sup>-1</sup>.

### **3.4.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas**

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

A atividade da glutathione 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), glutathione 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 (j,mol min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>).

#### **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. As amostras foram analisadas em duplicatas, sendo os valores expressos em mmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> V

### 3.4.1.3 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 tomo 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 tomo de 0,013-0,015 unidades), para então adicionar a alíquota da amostra, geralmente em torno de 10 a 70  $\mu$ 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 da SOD nestas condições. Os valores da SOD (U SOD g<sup>-1</sup>) 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).

### 3.4.2.4 Glutátiona Peroxidase (GPx)

A GPx metaboliza 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, tomando, 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 da GSH em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade desta enzima foram expressos em  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>.

### **3.4.1.5 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 desta enzima 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, permitia, 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, permitia 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.

#### **3.4.4.1 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 etoxiresorufina, 3,8mM foi incubado com microssomas (1mg proteína/ml) a 35°C na presença de NADPH em pH 7,8, 40mM 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**

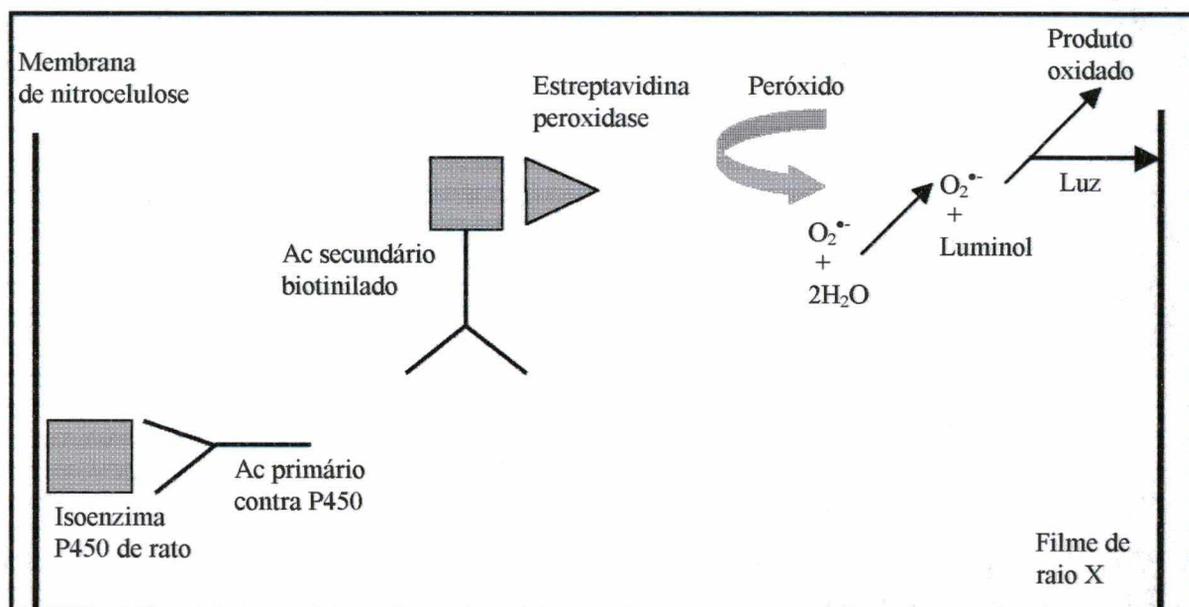
A eletroforese foi executada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), em gel de poliacrilamida em sistema miniVE. O gel de concentração e o de migração foram preparados em uma concentração de 5 e 7,5%, respectivamente. As amostras foram tratadas com tampão Tris-glicina (4,2 mM de Ditioneitol - DDT, 10% de SDS, IM 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 executada em tampão de corrida (Tris 24,8 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), com corrente constante de 20 mA e tensão de 120 V, durante aproximadamente 2 horas.

#### **3.4.4.4 Iminoblotting**

A eletrotransferência foi executada em sistema de eletrotransferência miniVE (Amersham) para transferência de proteínas em membrana de nitrocelulose (0,45µM diâmetro do poro) de acordo com o método de Towbin modificado (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 cnjugado à biotina (1:30000 Sigma) durante 1 hora a 37°C. Após este período, as membranas foram lavas em tampão TBS-T e incubadas durante 1 hora a 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 quimiluminescência, 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:



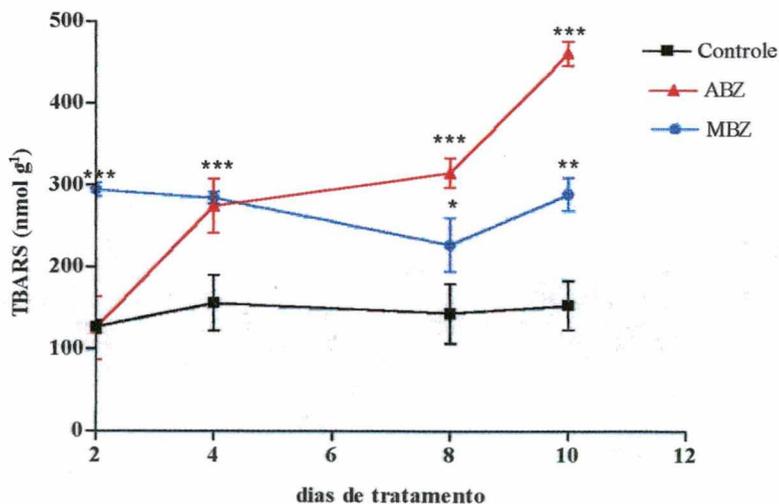
### 3.5 Tratamento Estatístico dos Dados

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da Lipoperoxidação Tecidual (TBARS)

Conforme se pode observar na figura 8, os animais tratados com ABZ tiveram um aumento gradual na lipoperoxidação tecidual com o tempo de tratamento, quando comparados aos animais controles, enquanto que os animais tratados com MBZ tiveram um dano maior nos primeiros dias de tratamento, o qual se manteve praticamente constante até o final do tratamento. Independentemente do perfil apresentado, os animais tratados tanto com ABZ como MBZ, tiveram um aumento no dano tecidual, o qual foi significativo quando comparado com os animais controle que receberam somente óleo. Curiosamente, em dois dias de tratamento não houve diferença significativa no dano tecidual decorrente da exposição ao ABZ quando comparado ao controle. Entretanto, neste mesmo período houve um maior dano na exposição ao MBZ.

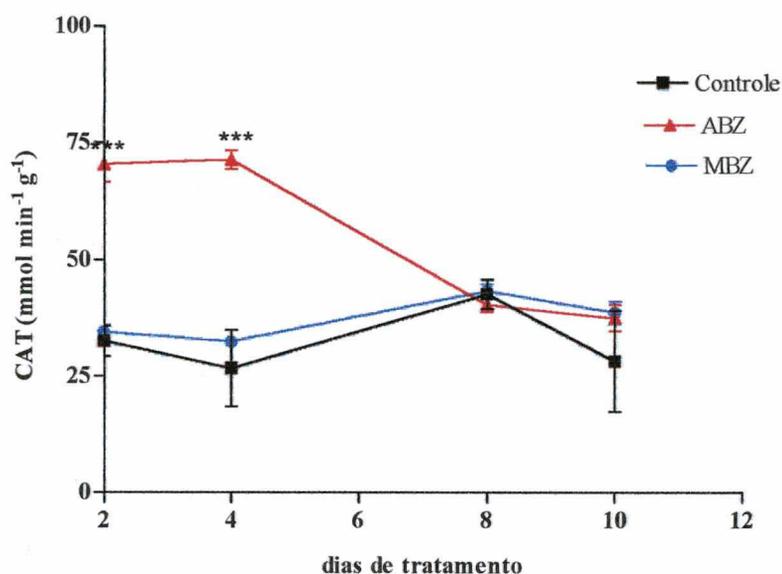


**Figura 8.** Avaliação da lipoperoxidação tecidual pelo método TBARS (nmol g<sup>-1</sup>) em hepatócitos de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso. (\*\*\*) diferença significativa em relação aos animais controle ( p < 0,001). (\*\*) diferença significativa em relação aos animais controle ( p < 0,01). (\*) diferença significativa em relação aos animais controle ( p < 0,05); n= 6; todos os valores foram expressos em termos da média ± SEM.

## 4.2 Avaliação das Defesas Antioxidantes Enzimáticas

### 4.2.1 Catalase

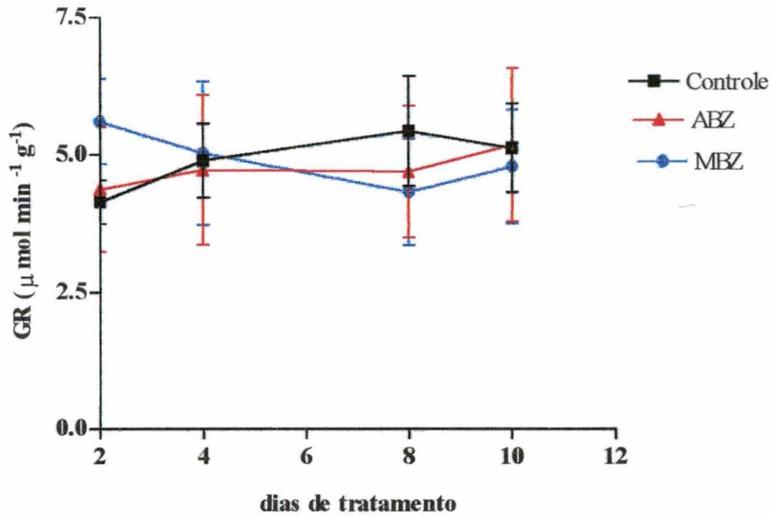
Os animais tratados com ABZ durante 2 e 4 dias tiveram um aumento na atividade desta enzima, a qual decaiu para níveis semelhantes aos controles aos 8 e 10 dias de tratamento, enquanto que os animais tratados com MBZ não tiveram a atividade desta enzima aumentada com o tratamento (figura 9).



**Figura 9.** Atividade da Catalase (CAT mmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) em hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso. (\*\*\*) diferenças significativas em relação aos animais controle (  $p < 0,001$ );  $n = 6$ ; todos os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

### 4.2.2 Glutathiona Redutase

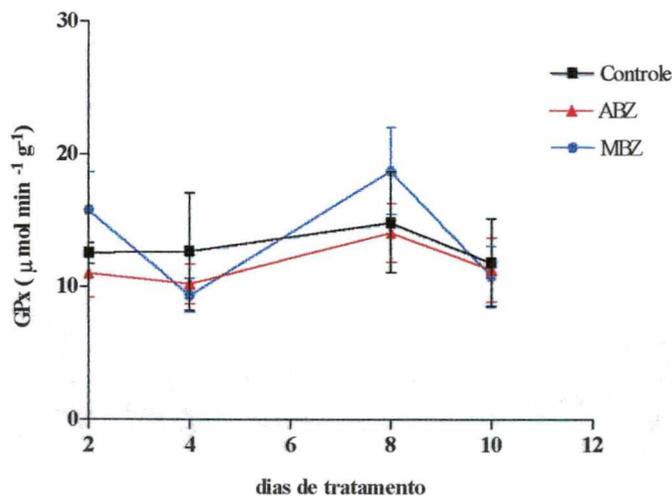
Ao longo do tratamento os animais tratados com ambos os antihelmínticos não tiveram diferença significativa na resposta enzimática da GR, havendo uma tendência de maior redução na atividade enzimática daqueles expostos ao MBZ em relação aos animais controle (Figura 10).



**Figura 10.** Atividade da Glutathione redutase (GR  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) em hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso; n= 6; todos os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

#### 4.2.3 Glutathione Peroxidase

De modo semelhante à GR, não houve diferenças significativas entre as atividades da GPx nos animais controle mediante os tratamentos com albendazol e mebendazol (Figura 11).

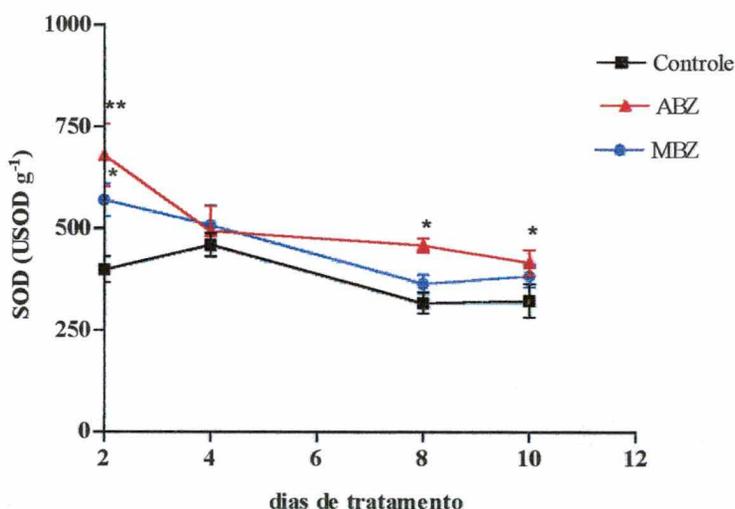


**Figura 11.** Atividade da glutathione peroxidase (GPx  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) em hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso, n= 6, todos os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

#### 4.2.4 Superóxido dismutase

Quando os animais foram submetidos ao tratamento com ABZ 2 dias, houve um aumento acentuado na atividade da SOD, a qual foi decaindo com o passar dos dias de

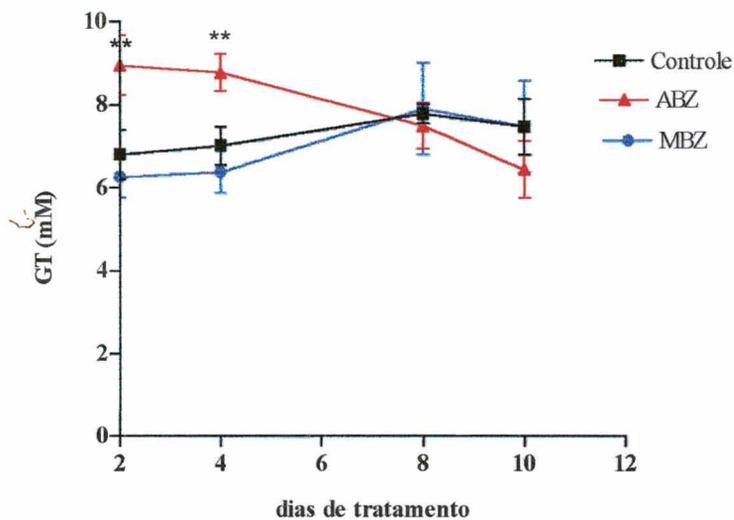
tratamento, mas tendendo a manter-se acima dos níveis dos animais controle. De modo análogo, os animais tratados com MBZ tiveram um aumento na atividade da SOD nos primeiros dias de tratamento e logo após houve um decréscimo na sua atividade mantendo-se semelhante aos níveis dos animais controle (Figura 12).



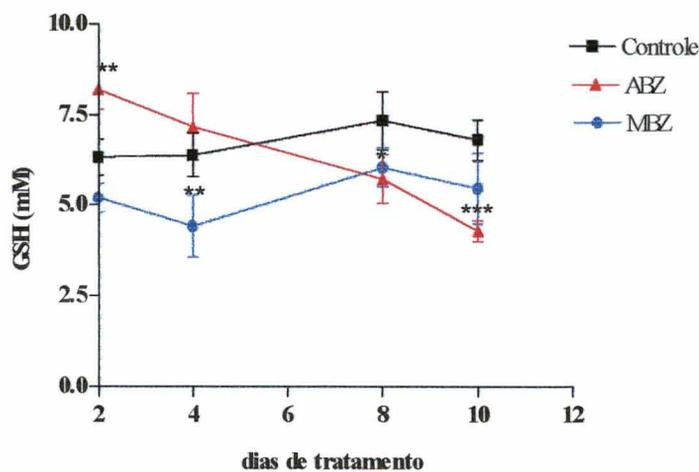
**Figura 12.** Atividade da superóxido dismutase (SOD USOD g<sup>-1</sup>) em hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso. (\*\*) diferença significativa em relação aos animais controle (p<0,01), (\*) diferença significativa em relação aos animais controle (p<0,05); n=6; os valores foram expressos em termos da média ± SEM.

### 4.3 Análise das Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas (Tióis Não Protéicos: GT, GSH e GSSG)

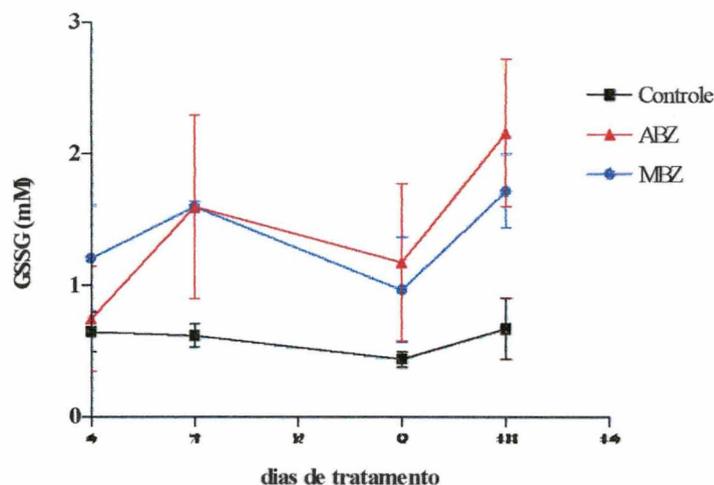
Os valores de GT e GSH aumentaram nos primeiros dias de tratamento com ABZ, enquanto que os níveis de GSSG aumentaram ao longo do tratamento com ABZ, ao mesmo tempo que os níveis de GSH começaram a decair (Figuras 13, 14, 15). Os animais tratados com MBZ apresentaram uma redução significativa nos níveis de GSH em 4 dias e uma tendência à diminuição nos demais dias de tratamento.



**Figura 13.** Níveis de Glutathiona Total (GT mM) hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso. (\*\*) diferenças significativas em relação aos animais controle ( $p < 0,01$ );  $n = 6$ ; os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.



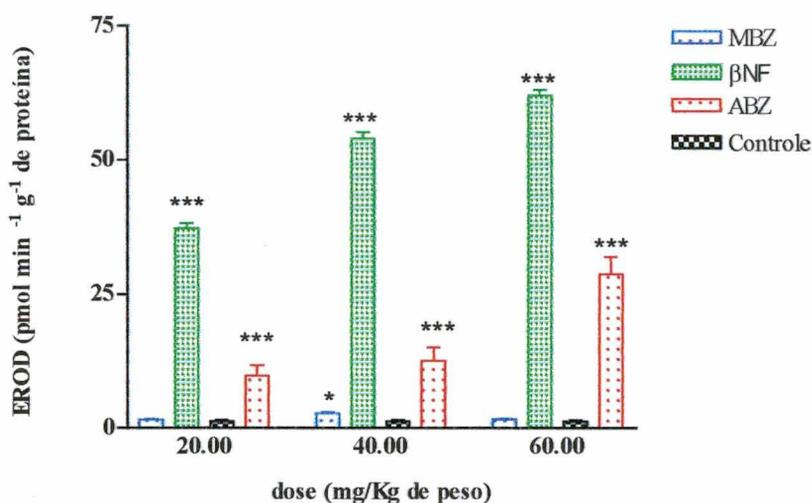
**Figura 14.** Níveis de Glutathiona reduzida (GSH mM) hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso. (\*\*\*) diferenças significativas em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ). (\*\*) diferenças significativas em relação aos animais controle ( $p < 0,01$ );  $n = 6$ ; os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.



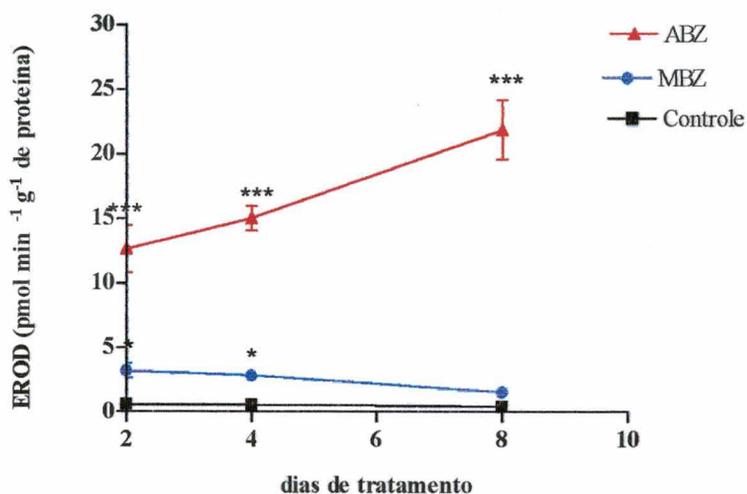
**Figura 15.** Níveis de Glutathiona oxidada (GSSG mM) hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso; n= 6; os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

#### 4.4 Atividade da 7 etoxiresorufina -O- deetilase

Conforme pode-se observar na figuras 16, quando os animais foram submetidos ao tratamento com ABZ em diferentes concentrações (20, 40 e 60mg/Kg de peso), houve um aumento significativo na atividade EROD em relação aos animais controle negativos, ao passo que os animais tratados com MBZ, não apresentaram diferenças significativas em relação aos animais controle negativos. Por outro lado, o tratamento com  $\beta$ NF foi capaz de induzir em aproximadamente 2 vezes mais do que o ABZ os hepatócitos em uma concentração de 60mg/Kg de peso, mostrando a alta sensibilidade deste tipo de célula aos indutores do CYP4501A1. Assim como no tratamento dose-dependente, os animais tratados com ABZ tempo-dependentes tiveram aumento crescente na atividade EROD quando comparados aos animais controles (Figura 17), enquanto que os animais que receberam MBZ apresentaram diferenças significativas somente em 2 e 4 dias de tratamento em relação aos animais controle.



**Figura 16.** Atividade EROD em animais tratados com ABZ, MBZ, βNF e animais controle em diferentes concentrações por Kg de peso durante 4 dias de tratamento. (\*\*\*) diferenças significativas em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ), (\*) diferença significativa em relação aos animais controle;  $n = 6$ ; os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

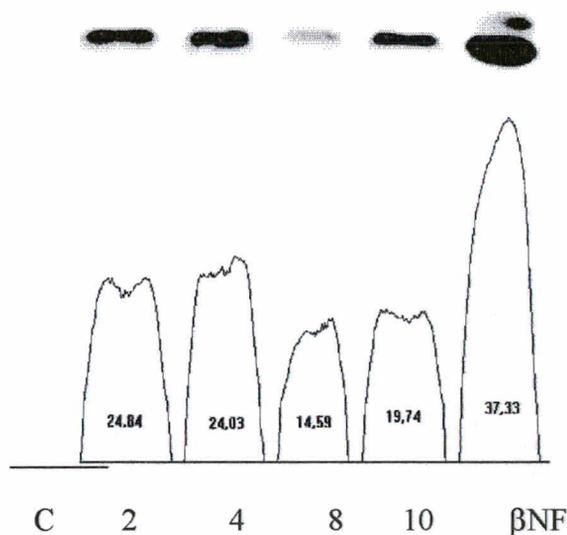


**Figura 17.** Atividade EROD em animais tratados com ABZ, MBZ e animais controle em diferentes dias de tratamento, submetidos a uma concentração de 40mg/Kg de peso. (\*\*\*) diferenças significativas em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ) (\*)diferenças significativas em relação aos animais controle ( $p < 0,05$ );  $n = 6$ ; os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

#### 4.5 Avaliação da expressão do citocromo P4501A1

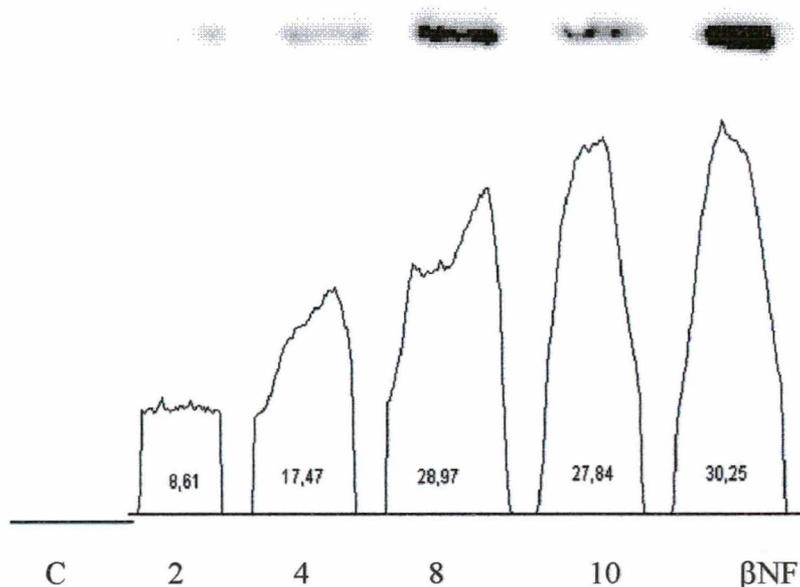
A figura 18 apresenta a expressão protéica do citocromo P4501A1 dos hepatócitos de ratos tratados com ABZ em diferentes períodos de tempo. Como pode ser observado houve uma forte expressão desta isoforma já no início do tratamento, correspondendo a 66,5% da

expressão da  $\beta$ NF. Após 8 dias houve uma queda nesta expressão seguida de um novo aumento em 10 dias.



**Figura 18:** Western blot do CYP4501A1 de microsomas de fígado de ratos controle (C), ratos tratados com ABZ 40mg/Kg de peso durante 2, 4, 8 e 10 dias respectivamente e 5mg/Kg de peso de  $\beta$ NF 10 dias de tratamento, com suas respectivas leituras densitométricas abaixo.

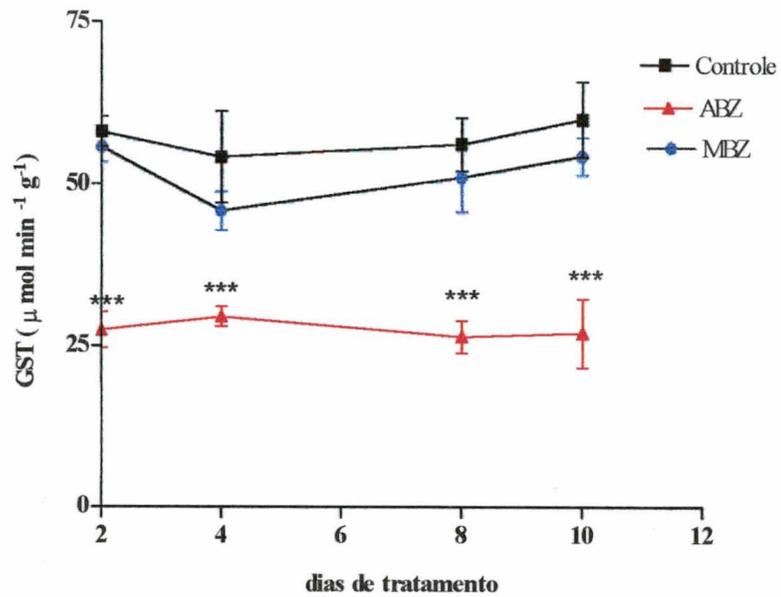
A figura 19 apresenta a expressão protéica do citocromo P4501A1 dos hepatócitos de ratos tratados com MBZ em diferentes períodos de tempo. Diferentemente do ABZ a expressão do CYP4501A1 nos primeiros dias de tratamento foi pequena, representando 28,5% daquela da  $\beta$ NF, mas esta expressão mostra-se progressivamente elevada no decorrer do tratamento, aparentemente estabilizando-se em 10 dias de tratamento.



**Figura 19:** Western blot do CYP4501A1 de microsomas de fígado de ratos controle (C), ratos tratados com MBZ 40mg/Kg de peso durante 2, 4, 8 e 10 dias respectivamente e 5mg/Kg de peso de βNF, durante 10 dias, com suas respectivas leituras densitométricas abaixo.

#### 4.6 Glutathione S – Transferase

A atividade da glutathione S transferase mostrou-se inibida nos animais tratados com ABZ já nos primeiros dias de tratamento, mantendo-se durante os 10 dias de tratamento (Figura 20). Por outro lado, os animais tratados com MBZ não apresentaram nenhuma alteração estatisticamente significativa em relação aos animais controle, apesar dos valores serem também inferiores aos controles.



**Figura 20.** Atividade da Glutathione S – Transferase (GST  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) em hepatócito de ratos tratados com ABZ e MBZ 40mg/Kg de peso. (\*\*\*)diferença significativa em relação aos animais controle ( $p < 0,001$ ),  $n=6$ , os valores foram expressos em termos da média  $\pm$  SEM.

## 5 DISCUSSÃO

As importantes infecções causadas por helmintos em humanos podem ser tratadas basicamente com um destes cinco antihelmínticos: albendazol, mebendazol, dietilcarbamazina, ivermectina ou praziquantel. Estes fármacos são vitais não somente para o tratamento dos indivíduos infectados, mas também no controle dessas infecções (Silva et al., 1997). Os antihelmínticos derivados benzimidazóis são fármacos de amplo espectro e todos possui em comum um anel bicíclico. O primeiro fármaco derivado benzimidazol introduzido no tratamento das helmintíases humana foi o tiabendazol em 1964. Apesar de serem utilizados já há muitos anos, ainda não se sabe ao certo o mecanismo de ação destes fármacos, mas existem evidências de que os mesmos estejam associados à geração de ERO.

A ação pró-oxidante induzida pelos fármacos antihelmínticos ainda não foi estudada em hospedeiros como rato e homem, sendo somente avaliado seu aspecto oxidativo nos helmintos parasitas. Entretanto, estima-se que estes fármacos, quando absorvidos, possam exercer sua toxicidade através da geração das ERO, podendo inclusive apresentar hepatotoxicidade (Sanchez-Moreno et al., 1996).

O aumento na lipoperoxidação tecidual verificado nos animais tratados com ABZ aumentou gradativamente a partir do quarto dia de tratamento, enquanto que os animais tratados com MBZ mostraram um aumento da peroxidação lipídica que foi mantido constante durante todo o tratamento. Os fármacos antihelmínticos quando absorvidos, são biotransformados predominantemente pelo fígado, em especial o albendazol. Provavelmente, e como consequência, o dano provocado no tecido hepático foi maior nos animais tratados com ABZ do que com MBZ. Desta forma, apesar de possuírem uma estrutura quimicamente semelhante, o ABZ parece exercer uma toxicidade maior no tecido hepático se considerada a produção de lipoperoxídeos, um claro indicador de estresse oxidativo (Banks & Soliman, 1997).

Erzurumlu e colaboradores (1995; 1996), avaliaram a toxicidade hepática destes fármacos em coelhos, através da análise de enzimas plasmáticas, fosfatase alcalina e

transaminases, além da bilirrubina, em animais tratados até 60 dias com os fármacos ABZ e MBZ, e não notaram nenhuma alteração significativa nos valores destas enzimas. No entanto, quando trataram coelhos com ABZ-sulfóxido, perceberam um aumento nos níveis de bilirrubina, mas, mesmo assim, acreditaram que o ABZ-sulfóxido poderia ser utilizado para o tratamento intra operatório em aplicações sistêmicas de pacientes com hidatose cística (Erzurumlu et al., 1998).

Estudos realizados por Banks Soliman (1997) com um antifúngico derivado benzimidazol (Benomyl), indicaram um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica e uma diminuição nos níveis de GSH hepática, após 7 dias de tratamento. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho em ratos tratados com MBZ durante 2 e 4 dias após tratamento dos animais com ABZ durante 8 e 10 dias. Esta diminuição nos níveis hepáticos de GSH poderia estar associada com o aumento das ERO, e a elevação da lipoperoxidação poderia ser responsável pela hepatotoxicidade observada (Banks & Soliman, 1997). Também foi notado que, à medida que houve um decréscimo nos níveis hepáticos de GSH, houve também uma diminuição nos níveis de GT que foi acompanhado por sua vez de um aumento nos níveis de GSSG nos animais tratados com ABZ. Isto constituiria em mais um indicativo de que a diminuição da GSH estaria associada com o aumento das ERO, além da concentração da GT estar elevada no início do tratamento com ABZ, mostrando claramente uma situação de estresse imposta ao organismo. De acordo com Dubin & Goilman (1984), a geração de ERO através do ciclo redox dos fármacos heterocíclicos deveria ser o fator determinante no processo peroxidativo, sendo o aumento deste processo responsável pela diminuição da capacidade antioxidante celular, ou vice-versa.

O processo enzimático e não enzimático de detoxificação de ERO por GSH produz GSSG. 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). Como aumentos da GSSG após um insulto tóxico e um estresse oxidativo são muito deletérios para as células, a GSSG é transportada para o compartimento extra celular quando uma concentração crítica de GSSG é atingida no citoplasma, causando uma depleção no nível intracelular de glutatona (Meister, 1983). A glutatona redutase (GR) regenera a GSH a partir de GSSG em presença de NADPH, e altas taxas de regeneração podem prevenir a perda celular de GSH. No presente estudo não houve uma indução da GR durante todo o período de

tratamento mas no quarto até o oitavo dia de tratamento verificou-se uma tendência de inibição de suas atividades tanto pelo ABZ como pelo MBZ. Conseqüentemente, proporcionam uma acentuada diminuição de GSH e um concomitante aumento da lipoperoxidação causado pelo aumento da geração das ERO. A GR é uma flavoproteína dependente da integridade da via das pentoses, e sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, pode haver prejuízo da função da GR (Ferreira & Matsubara, 1997). Aparentemente, os tratamentos com ABZ e MBZ poderiam estar depletando os hepatócitos de seu potencial redutor, uma vez que os antihelmínticos benzimidazólicos podem agir através da inibição da glicólise pelo consumo de glicose 6- fosfato, impedindo a via das pentoses e, conseqüentemente, a formação de NADPH (Sanchez-Moreno et al., 1996).

As reações da chamada primeira fase de biotransformação (Fase I) são principalmente oxidativas e envolvem o citocromo P450 monooxigenase (Kerboeuf & Aycardi, 1999). Por um longo tempo acreditou-se que os helmintos eram deficientes no sistema citocromo P450 monooxigenase. No entanto, recentemente, níveis significativos da atividade CYP450 foram demonstrados em estágios de vida livre do *Heligmosomoides polygyrus* (Kerboeuf et al., 1995). Em 1997 Kotze também observou uma atividade similar ao P450 em *Haemonchm contortus*, em larvas de primeiro e terceiro estágio.

No presente estudo, o ABZ mostrou-se um potente indutor do CYP1A1. Esta indução parece ser contínua e tempo-dependente, tendo em vista os resultados coerentes observados entre a expressão da proteína e sua resposta em termos de atividade EROD. Estes resultados assemelham-se aos resultados encontrados por Souhaili-El Amri e colaboradores (1988), quando demonstraram que a atividade da 7-etoxyresorufina 0-deetilase aumentou até 30 vezes em relação aos animais controle, quando ratos foram tratados com ABZ 10,6mg/Kg, através de incubação gástrica por 10 dias. Já o MBZ apresentou uma indução pequena progressiva da expressão da proteína CYP4501 A1 a qual foi acompanhada de uma indução da atividade enzimática correspondente (atividade EROD). De fato, a atividade EROD foi relativamente pequena (Figura 17) quando comparada com os tratamentos com PNF e ABZ, além de apresentar um perfil de inibição com o decorrer do tratamento. Esta contradição entre expressão proteica e atividade enzimática poderia ser explicada de várias maneiras: i) inicialmente a exposição a uma estrutura benzimidazólica teria causado uma indução proteica fugaz e que não foi mantida durante todo o tratamento, devido às características químico-

estruturais próprias da molécula do MBZ. Esta hipótese poderia ser melhor confirmada por um ensaio de exposição contínua por um período de tempo maior, por exemplo 30 dias. ii) o MBZ poderia ser um inibidor enzimático, o que não seria surpreendente, tendo em vista que alguns compostos imidazólicos são inibidores enzimáticos, constituindo exemplo clássico o clotrimazol e o miconazol (Kahl et al., 1980, Gibbs et al., 1999). iii) o MBZ poderia ter um comportamento duplo, onde em pequenas doses e/ou frequência de exposição, funcionaria como indutor enzimático, mas em doses elevadas ou maior frequência de exposição funcionaria como inibidor enzimático. Ou seja, em baixas concentrações ou baixa frequência se ligaria à parte protéica do CYP450 1A1 (sítio catalítico) agindo como substrato e ou indutor, conhecido como substrato tipo I (Blauber, 1996). Já em doses elevadas ou alta frequência de exposição, além de se ligar na região protéica, também se ligaria ao grupamento heme, desta forma bloqueando ou reduzindo sensivelmente a atividade da enzima. São os chamados substratos reversos tipo RI, um exemplo clássico deste tipo de ligante é o cetoconazol. (Tsunoda et al., 1999, Gibbs et al., 2000, Desta et al., 2000).

Muitos fármacos benzimidazólicos que contêm enxofre parecem apresentar uma indução do sistema citocromo P450 hepático. Alguns deles com atividade antihelmíntica, como tiabendazol, fenbendazol e o sulfóxido de oxfendazol, induzem a sub-família P4501A em microsomas de coelhos. Em ratos, o ABZ e um agente antiúlcera, o omeprazol, induzem tanto a família P4501A como a 3A6 e 3A4. Estes compostos benzimidazólicos geralmente apresentam uma ação de ativadores da transcrição destes genes (Rey-Grobellet et al., 1996). O uso de omeprazol promove a indução do CYP1A1 em cultura primária de hepatócitos humanos (Curi-Pedrosa et al., 1994). Vários estudos utilizando hepatócitos humanos e de coelho têm mostrado um aumento similar na expressão do CYP1A1 em resposta a derivados benzimidazólicos como lansoprazole e pantoprazole (Curi-Pedrosa et al., 1994; Richard et al., 1995; Masubuchi & Okasaki, 1997), demonstrando a possibilidade dos efeitos tóxicos destas enzimas quando biotransformam fármacos e carcinógenos. O sistema de monooxigenases citocromo P450 consiste em uma família de enzimas responsáveis pela oxidação de xenobióticos. A sub-família 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 compostos estranhos em experimentos animais (Guengerich, 1990). A

utilização de certos fármacos é necessária no tratamento de certas enfermidades; portanto, deve-se conhecer o processo de biotransformação e seus metabólitos ativos, para permitir estabelecer uma correlação com o dano oxidativo e o seu potencial mutagênico e carcinogênico.

As reações da chamada segunda fase (Fase II) utilizam várias enzimas similares para catalisar as reações de conjugação, entre elas as da conjugação da glutatona, com o xenobiótico, já identificada em helmintos (Kerboeuf et al., 1999). Glutathione S-transferases foram encontradas em todas as espécies de helmintos, sendo estudadas principalmente em cestodas (Barret, 1997). Altos níveis de glioxalase, uma enzima necessária para o metabolismo futuro da GSH conjugada foi observado em nematodas (Brophy et al., 1990). A glutathione S-transferase compreende uma família de enzimas capaz de detoxificar uma grande variedade de compostos, catalisando a sua conjugação com a GSH (Sagara et al., 1998). Um aumento da atividade da GST poderia neutralizar os efeitos das ERO produzidas em processos de metabólitos endógenos ou de fontes exógenas. Como a GST tem um papel na neutralização das ERO, os dados aqui obtidos sugerem que a GST foi inibida pelo ABZ, enquanto não foi alterada significativamente pelo MBZ, refletindo uma diminuição da capacidade antioxidante combinada com a alta peroxidação lipídica nos hepatócitos expostos ao ABZ, isto é, acentuando o estresse oxidativo. Classicamente, em vertebrados ou invertebrados, a biotransformação de xenobióticos inclui duas fases. A primeira fase pode ser de oxidação, o que eventualmente pode levar à geração de metabólitos intermediários altamente reativos e particularmente nucleofílicos. Em uma fase subsequente, estes metabólitos se complexam ou se conjugam com moléculas de baixo peso molecular, principalmente a glutatona (Kerboeuf et al., 1995).

Nossos experimentos demonstraram uma clara inibição da GST pelo ABZ, uma enzima de neutralização de compostos nucleofílicos da fase II de biotransformação. Portanto, a exposição ao ABZ, além de causar a indução do CYP1A1 inibe a enzima responsável pela neutralização de eventuais metabólitos reativos oriundos da fase I. Desta forma, haveria duplo risco de ativação de compostos pró-carcinogênicos.

A catalase, uma enzima responsável pela detoxificação do  $H_2O_2$  do organismo, que assim evita a formação do radical hidroxil via reação de Fenton ou de Haber Weiss, (Ferreira & Matsubara, 1997), foi primeiramente induzida no tratamento com ABZ, provavelmente

causada pelos aumentos endógenos de  $H_2O_2$ , sendo que após 8 dias de tratamento sofreu uma inibição. Nota-se igualmente, que assim como a catalase, a superóxido dismutase, uma enzima que também tem um importante papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido (Ferreira & Matsubara, 1997), foi inibida após 8 dias de tratamento. Semelhantemente, a glutathiona peroxidase, enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH à GSSG (Ferreira & Matsubara, 1997), sofreu igualmente uma leve inibição, embora não significativa, em relação ao controle durante todo o tratamento com ABZ. Todos os protozoários e helmintos estudados até o momento apresentaram atividade de pelo menos uma destas enzimas antioxidantes acima citadas. A importância destas enzimas reside na proteção contra o dano causado pelas ERO, os quais são produzidos durante o processo metabólico celular normal e por certos fármacos antiparasitários, entre outros. A resposta do hospedeiro também constitui uma potente fonte oxidante, podendo causar dano às membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (Callahan et al., 1988). Sanchez-Moreno e colaboradores (1989), purificaram a SOD de cinco espécies de cestodas e incubaram com quatro derivados benzimidazóis com atividade antihelmíntica, entre eles o ABZ e MBZ, e verificaram que estes antihelmínticos produziram um aumento na taxa de inibição da atividade da SOD, sendo que o ABZ foi um dos que promoveu uma maior taxa de inibição, enquanto que o MBZ foi o fármaco que causou uma menor inibição. Em 1987 Sanchez-Moreno e colaboradores, também observaram a atividade da SOD em nematodas, e esta enzima poderia estar associada com a proteção destes parasitas contra a produção do radical superóxido no processo metabólico aeróbico. Derivados benzimidazóis inibem “in vitro” a atividade da SOD em vários parasitas, e este efeito inibitório poderia ocorrer através do bloqueio da fiimmarato redutase, mas tem sido documentada a produção de radical superóxido por estes fármacos. A inibição da SOD poderia favorecer o aumento da concentração endógena de ânion superóxido. Entretanto, apesar de sua reatividade química ser limitada, o ânion superóxido pode reagir com  $H_2O_2$  formando um radical livre altamente tóxico, o radical hidroxil ( $*OH$ ), através da reação de Haber-Weiss. O  $*OH$  pode diretamente atacar qualquer tipo de biomolécula, como carboidratos, lipídios, proteínas e DNA/RNA, além do sistema de transporte de elétrons (Halliwell & Gutteridge, 1998),

Nossos resultados demonstraram claramente que os animais que receberam tratamento com ABZ apresentaram uma condição severa de estresse oxidativo. Esta condição ficou

caracterizada por uma indução nos primeiros dias de tratamento (2° e 4° dias) da catalase e uma subsequente inibição após 8 dias de tratamento e a partir do 4° dia verificou-se uma inibição da atividade da SOD. A glutathione peroxidase e a glutathione reductase mantiveram-se levemente reduzidas durante todo tratamento, levando a uma depleção gradativa nos níveis de glutathione total e glutathione reduzida. Observou-se também que simultaneamente ao aumento nos níveis de TBARS a partir do 4° dia, houve uma depleção acentuada dos constituintes GSH, diminuição das concentrações de glutathione total e aumentos paralelos da glutathione oxidada e dos níveis de TBARS sendo este último parâmetro também um indicador comum de situações de estresse oxidativo. Paralelamente houve uma forte inibição da atividade da GST e um concomitante aumento da atividade EROD, esta última acompanhada pelo aumento da expressão do CYP4501A1. Todos estes fatores poderiam resultar em um aumento da toxicidade deste fármaco promovidos pelas contínuas geração das ERO, tendo como consequência um desequilíbrio na homeostase celular. Apesar do MBZ também apresentar certa toxicidade provocada pelo aumento das ERO, estas parecem ser menos severa. Os animais tratados com MBZ não tiveram alterações nas atividades da catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, o que provavelmente permitiu um menor dano tecidual observado pelo menor aumento dos níveis de TBARS e pela pequena indução da atividade EROD e da menor expressão do CYP4501A1. No conjunto, isto permite afirmar que este último fármaco poderia ser menos tóxico do que o ABZ para o hospedeiro. Portanto, do ponto de vista toxicológico, o MBZ seria o fármaco de primeira escolha para o tratamento das helmintíases, visto que farmacologicamente os dois têm praticamente a mesma indicação terapêutica.

No entanto, existe a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a toxicidade e o papel das ERO nas defesas antioxidantes e estabelecimento de estresse oxidativo no hospedeiro. Principalmente em que se refere a outras vias de administração dos fármacos períodos de tratamento menores e doses inferiores às utilizadas no presente trabalho, focalizando notadamente o período de tratamento em torno de 4 dias, onde aparentemente transcorre um série de alterações toxicológicas relativas ao estresse oxidativo no fígado do hospedeiro.

## 6 CONCLUSÕES

1. A avaliação dos dados do presente estudo permitiram concluir que os antihelmínticos ABZ e MBZ são capazes de causar um estresse oxidativo no hospedeiro. Durante todo período experimental o ABZ mostrou ser em geral mais potente do que o MBZ na geração de ERO.
2. Além disso, o ABZ mostrou ser um potente indutor das enzimas de biotransformação da fase I, enquanto o MBZ mostrou ter um efeito menor neste particular.
3. O tratamento dos animais com ABZ provocou um dano celular crescente (níveis de TBARS) durante todo o tratamento, enquanto o MBZ provocou um dano menor que se manteve constante durante o tratamento. Apesar destes fármacos possuírem uma estrutura química semelhante aparentemente exercem uma toxicidade diferenciada, sendo que o ABZ parece apresentar um maior dano tecidual.
4. A respeito das defesas antioxidantes enzimáticas, verificou-se que o tratamento com ABZ provocou em geral, maior inibição nas enzimas antioxidantes do que o MBZ, as atividades da CAT e SOD foram induzidas nos primeiros dias e decaíram no final do período de tratamento.
5. A concentração das glutationas também foi alterada pelo tratamento a partir do 4º com estes antihelmínticos. Mediante o tratamento com ABZ a concentração de glutatona total originalmente elevada diminuiu concomitantemente com a concentração de GSH e aumentos da GSSG. Desta forma levando a uma diminuição da sua eliminação do organismo, com a depleção da concentração hepática de GSH, deve ocorrer uma diminuição na conjugação dos fármacos, proporcionando um aumento da sua toxicidade.

6. A análise da atividade EROD e a avaliação por Western Blot do CYP4501A1 demonstrou que o ABZ é um forte indutor do citocromo P450, enquanto que o MBZ parece não alterar a atividade EROD. O ABZ parece induzir a atividade EROD de maneira tempo e dose-dependente, refletindo um aumento na geração de ERO por este sistema de biotransformação, de modo aparentemente linear com os níveis de TBARS.
7. A atividade da GST foi fortemente inibida no tratamento com ABZ enquanto que o tratamento com MBZ não houve alteração na sua atividade. Isto refletiria uma diminuição da capacidade antioxidante e uma menor possibilidade de eliminação do ABZ pelo organismo.
8. A avaliação conjunta dos dados obtidos no presente estudo permitem inferir que o ABZ promove um maior dano celular no hospedeiro, provavelmente através da geração de ERO. Por outro lado devido à sua alta capacidade em expressar e induzir o CYP4501A1, potencializaria a capacidade de promover a biotransformação de compostos mutagênicos e carcinogênicos, no hospedeiro. O MBZ aparentemente promove um estresse e toxicidade menores, e por apresentar a mesma efetividade contra os parasitas helmintos e caracterizar-se como um composto menos tóxico ao hospedeiro, seria o fármaco de primeira escolha no tratamento de helmintíases.

## 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.
- ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Cytogenetic effects of mebendazole on *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. **Rev. Brasil. Genet.** v. 17, n.3, p.273-276, 1994.
- BACHUR, N. R.; GORDON, S.L.; GEE, M.V. A General mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agent to free radicals. **Câncer Res.** v.38, p. 1745-1750, 1978.
- BANKS, D.; SOLIMAN, M., R. Protective effects of antioxidants against benomyl-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in rats. **Toxicol.** v. 116, p. 177-181, 1997.
- BARRET, J. Helminth detoxification mechanisms. **J. Helminthol.** v.71, p.85-89, 1997.
- 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.3985-3990, 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.
- BEYER, R.E. The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. **Biochem. Cell Biol.** v.70, p.390-403, 1992.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H., Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. **Meth. Enzymol.** v. 90, p. 105-110, 1984.
- BLAAUBER, B. M. Biotransformation; detoxication and bioactivation. In: NIESINK, R. J. M., URIES, J., HOLLINGER, H. A. **Toxicology-Principles and Applications.** CRC Press, p. 41-65, 1996.
- BOGAN, J. H.; MARRINER, S. E. Analysis of benzimidazole in body fluids by high performance liquid chromatography. **J. Pharm. Science** v.69, p.422-423, 1980.
- BORS, W.; HELLE, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants; determination of radical scavenging efficiencies. **Meth. Enzymol.** v. 186, p.343-354, 1990.

- BOVERIS, A.; FRAGA, C. G.; VARSAVSKY, A. L.; 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. B., MAS SARO, D. J. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function.** v. 105, p. 1-25, 1997.
- BROPHY, P.,M.; CROWLEY, P.; BARRET, J., Relative distribution of glutathione transferase, glyoxalase I and glyoxalase II in helminths. **J. Parasitol.** v.20, p.259-261, 1990.
- BURTON, GW.; INGOLD, K.U. Autooxidant of biological molecules. I-the antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. **J. Amer. Chem. Soc.** v. 103, p.6472-6477, 1981.
- BURTON, GW.; INGOLD, K.U. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. **Ann. New York Acad. Science** v.570, p.7-22, 1989.
- CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase from rat liver. **Meth. Enzymol.** v.113, p.484-490, 1985.
- CALLAHAN, H. L.; CROUCH, R. K; JAMES, E. R. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? **Parasitol. Today** v.4, n.8, p.218-225, 1988.
- CHAE, H.Z.; KANG, S.W.; RHEE, S.G. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. **Meth. Enzymol.** v.300, p.219-226, 1999.
- COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Biol. Interact.**v.72, p. 1-56, 1989.
- COSTA, A.M.H. In: NEVES, P.D., MELO, L.A., GENARO, O., LINARDI, M. P. **Parasitología Humana.** 9<sup>ª</sup> edição. Editora Atheneu, 1995.
- CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Towards Prolongation of the Healthy Life Span.** v.854, p.435-443. 1998.
- CHRISTOPHERSEN, B.O. Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase. **Biocim. Biophys. Acta.** v. 176, p.463-467, 1969.
- CRISTOFOL, C.; CARRETERO, A.; FERNANDEZ, M.; NAVARRO, N.; SAUTET, J.; RUBERTE, I; ARBOIX, M. Transplacental transport of netobimin metabolites in ewes. **Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin.** v. 20, p. 167-171, 1995.
- 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. Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects. p.910, **Pergamon, Oxford**, 1991.
- DE GROOT, H.; ANUNDI, L.; SIES, H. Cytochrome P450 and lipid peroxidation. In: RUCKPAUL, K.; REIN, H., eds. **Membrane Organization and Phospholipid Interaction of Cytochrome P-450**. p. 184-205, Akademie Verlag, Berlin, 1991.
- DELATOUR, P.; PARISH, R. Benzimidazole anthelmintics and related compounds: toxicity and evaluation of residues. In: RICO, A.G. **Drug. Residues in Animals**. Ed., p. 175-203. Academic Press. New York, 1986.
- DENISON, M. S; WHITLOCK, J. P. Jr. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. **J. Biol. Chem.** v.270, p.18175-18178, 1995.
- DESTA, Z.; SOUKHOVA, N.; MAHAL, S.K.; FLOCKHART, D. A. Interaction of cisapride with the human cytochrome P450 system: metabolism and inhibition studies. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**.v.28, p.789-800, 2000.
- DIAZ-CAMACHO, S.; CANDIL-RUIZ, A.; URIBE-BELTRAN, A.; WILLMS, K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in México. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.84, p.563-566, 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.1103-1123, 1989.
- Di MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** v.274, p.532-538, 1989.
- Di MASCIO, P.; DESAGAYAM, T.; KAISER, S.; SIES, H. Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. **Biochem. Soc. Trans.** v. 18, p. 1054-1056, 1990.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymology** 3 ed.; Longman Group, 1979.
- DOCAMPO R.; MORENO S.N.J. Free-radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. **Free Radic, in Biol.**, 1984.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. **Fed. Proc.** v.45, p.2471-2476, 1986.
- DOCAMPO R. Sensitivity of Parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem. Biol. Interac.** The Rockefeller University, New York, 1989.
- 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.

- ERZURUMLU, K.; ÖZDEMİR, M.; MIHMANLI, M.; ÇEVDCBAS, U. The effect of intraoperative mebendazole-albendazole applications on the hepatobiliary system. **Eur. Surg. Res.** v. 27, p.340-345, 1995.
- ERZURUMLU, K.; SAHIN, M.; SELÇUK, M., B.; YILDIZ, C.; KESIM, M. Intracystic application of mebendazole solution in the treatment of liver hydatid disease. **Eur. Surg. Res.** v.28, p.466-470, 1996.
- ERZURUMLU, K.; HOKELEK, M.; BARIS, S.; SAHIN, M.; BIRICINI, A.; AMANVERMEZ, R.; TAC, K. Effect of albendazole sulfoxide solution on the scolices and the hepatobiliary system. **Eur. Surg. Res.** v.30, p.433-438, 1998.
- FABRE, J.M.; BERTHELOT, X.; FERNEY, J. Embryotoxicité des antiparasitaires chez les ovins: Observation clinique. **Rev. Med. Vet.** v. 140, p. 1089-1095, 1989.
- FARBER, J.L.; KYLE, M.E.; COLEMAN, J.B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab. Invest.** v. 62, p.670-678, 1990.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L., S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Méd. Brasil** v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.**,v. 105, p. 114-121, 1984.
- FLOHÉ, L.; HECHT, H. J.; STEENERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Radic. Biol. Medic.** v.27, p.966-984, 1999.
- FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease; Free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.** v.47, p.412-426, 1982.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. **Adv. Enzymol.** v.58, p.62-97, 1986.
- GARCIA-RUIZ, M. A.; MONTEOLIVA, M.; SANCHEZ-MORENO, M. Algunas aportaciones a la caracterización de la enzima SOD en *Moniezia expansa* (Cestoda). **Rev. Ib. Parasitol.** v. 45, p.384-386. 1986.
- GROBS, M. A.; KUZE, K. L.; HOWALD, W. N.; THUMMEL, K. E. Effect of inhibitor depletion on inhibitory potency: tight binding inhibition of CYP3A by Clotrimazole. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v.27, p.596-599, 1999.
- GIBBS, M. A.; BAILLIE, M. T.; SHEN, D.D.; KUNZE, K. L.; THUMMEL, K. E. Persistent inhibition of CYP3A4 by ketoconazole in modified Caco-2 cells. **Pharm. Res.** v. 17, p.299-305, 2000. "
- GILLES, M.H. In; COOK, G. C. **Manson's Tropical Diseases.** Twentieth edition, Saunders, 1996.

- GLEIZES, C.; EECKHOUTTE, C.; PINEAU, T.; ALVINERIE, M.; GALTIER, P. Inducing effect of oxfendazole on cytochrome P450IA2 in rabbit liver. Consequences on cytochrome P450 dependent monooxygenases. **Biochem. Pharmacol.** v.41, n.12, p.1813-1820, 1991.
- GOODMAN A G.; LIMBIRD LEE E. In: **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Capítulo 42, p. 1009, ed. International Edition. Rio de Janeiro - RJ, 1996.
- GUENGERICH, F. P. Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. **Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.** V.25, p.97-153, 1990.
- HALLIWELL, H. Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms. The key role superoxide dismutase. **Cell Biol. Int. Rep.** v.2, p. 113-128, 1978.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology Medicine** 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.
- HAUGAARD, N. Cellular mechanisms of oxygen toxicity. **Physiol Rev.** v.48, p.311-373, 1968.
- HEATH, A. G. Uptake, accumulation, biotransformation, and excretion of xenobiotics. In: HEATH, A. G., ed. **Water Pollution and Fish Physiology**. p.61-94, CRC Press, Boca Raton, 1987.
- 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. Appieton & Lange, Norwalk, 1994.
- HODGSON, E. Chemical and environmental factors affecting metabolism of xenobiotics. In: HODGSON, E. & LEVI, P. E. Eds., **Introduction to Biochemical Toxicology**. 2ed., p. 154-175, Appieton & Lange, Norwalk, 1994.
- KAHL, R.; FRIEDERICI, D. E.; KAHL, G. F.; RITTER, W.; KREBS, R. Clotrimazole as an inhibitor of benzo[a]pyrene metabolite-DNA adduct formation in vitro and of microsomal mono-oxygenase activity. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.8, p. 191-196, 1980.
- KAPPUS, H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Arch. Toxicol.** v.60, p. 144-149, 1987.
- KEELING, 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.3243-3249, 1982.
- 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.

- KERBOEUF, D.; SOUBIEUX, D.; GUILLUY, R; BRAZIER, JL.; RIVIÉRE, JL. In vivo metabolism of aminopyrine by the larvae of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. **Parasitol Res.** v.81, p.302-304, 1995.
- KERBOEUF, D.; AYCARDI, J. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintics by modulation of glutathione activity. **Parasitol Res.** v.85, p.713-718, 1999.
- KLAASSEN, C.; ROZMAN. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In: AMDUR, M.O., DOULL, J. & KLAASSEN, C. D., eds. **Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.** 4 ed. p.50-87, Pergamon Press, New York, 1991.
- KOROLKOVAS A. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** Ed. 1997/1998, editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro - RJ, 1997.
- KOSOWER N. S.; KOSOWER E. M. The glutathione status of cells. **Int. Ver. Cytol.** v.54, p. 109-60, 1978.
- KOTZE, A., C. Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). **Int. J. Parasitol** v.27, p.33-40, 1997.
- KRINSKY, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radie. Biol. Med.** v.7, p.617-635, 1989.
- LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. **Parasitol. Today**, v.6, p. 112-115, 1990.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227 p.680-685, 1970.
- LAVRIJSEN, K.; VAN HOUTT, J.; TFFIJS, 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.
- 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 peroxide substrate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.31, p. 145-150, 1968.
- LOWRY, O H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A L. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p.265-275, 1951.
- MAIORINO, M.; ROCHE, C.; KOENIG, K.; GAWLIK, D.; MATTHES, M.; NALDINI, E.; PDERCE, R.; FLOHÉ, L. A selenium-containing phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Biochem.** v.238, p.828-844, 1996.

- MABRIONO, M.; PEERCE R.; FLOHÉ, L. Product of the *Schistosoma soni* glutathione peroxidase gene is a selenium containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) sharing molecular weight and substrate specificity with its mammalian counterpart. **Biomed. Environ Science** v. 10, p.209-213, 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.
- McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase; an enzymatic function for erythrocyte (hemocyanin). **J. Biol. Chem.** v.244, p.6049-6055, 1969.
- MELLORS, A.; TAPPEL, A.L. Quinones and quinols as inhibitors of lipid peroxidation. **Lipids**. V.1, p.282-284, 1996.
- MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**, v.220, p.445-7, 1983.
- 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.188-192, 1972.
- MOCAMJ, M.M.; STEARE, S.E.; EVANS, M.C.; NUGENT, J.H.; YELLON, D.M. Heat stress attenuates free radical release in the isolated perfused rat heart. **Free Radic. Biol. Med.** V.15, p.459-463, 1993.
- NAVARRO, M. Efectos embriotoxicos del Netobimín en la Oveja, la Rata y el Pólo. **Doctoral Thesis**, Publications UAB, Barcelona, 1996.
- NERBET, D. W.; GONZALEZ, F. J. P450 genes; structure, evolution, and regulation. **Ann. Rev. Biochem.** v.56, p.945-1043, 1987.
- PARKE, D. Activation mechanisms to chemical toxicity. **Arch. Toxicol.** v.60, p.5-15, 1987.
- PAUL, J. M.; BARRETT, J. Peroxide metabolism in the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. **Intern. J. Parasitol.**, v. 10, p. 121-124. 1980.
- 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.
- PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J. Free radicals. Cap.1, p.1. **A functional Approach IRL Press, Oxford, 1996.**
- RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J.M. **Farmacologia** Capítulo 41, p.619. 3 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ, 1997.
- REED, D.J. Regulation of reductive processes by glutathione. **Biochem. Pharmacol.** v.35, p.7-13, 1986.

- REY-GROBELLET, X.; FERRE, N.; EECKHOUTTE, C.; LARRIEU, G.; PINEAU, T.; GALTIER, P. Structural requirements for the induction of cytochromes P450 by benzimidazole anthelmintic derivatives in cultured rabbit hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.220, p.789-794, 1996.
- RHOADS, M. C. *Trichinella spiralis*: Identification and purification of superoxide dismutase. **Experimental Parasitol.** v.56, p.41-54, 1983.
- 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.410-418, 1995.
- SAGARA, Y.; DARGUSCH, R.; CHAMBERS, D.; DAVIS, I; SCHUBERT, D.; AHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, V.24, p. 1375-89, 1998.
- SANCHEZ-MORENO, M.; LEON, P.; GARCIA-RUIZ, M.A.; MONTEOLIVA, M. Superoxide dismutase activity in nematodes. **J. Helminthol.** v.61, p.229-232, 1987.
- SANCHEZ-MORENO, M.; GARCIA-RUIZ, M.A.; GARCIA-REJÓN, L.; VALERO, A.; LEON, P. Superoxide dismutase in Cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by a series of benzimidazoles and pyrimidine derivatives of recent synthesis. **Arzneim-Forsch/Drug.Res.**, v.39, n.7, p.759-761, 1989.
- SANCHEZ-MORENO, M.; ENTRALA, E.; JANSSEN, D.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; SALAS-PEREGRIN, M. J.; OSUNA, A. Inhibition of superoxide dismutase *from Ascaris suum* by Benzimidazoles and synthesized pyrimidine and glycine derivatives. **Pharmacol.** V.52, p.61-68, 1996.
- SCANDALIOS, J. G. Introduction to free Radicals. **Free Radic. Biol. Med.** v.23, n.3, p.471-472. 1997.
- SCHENKMAN, J. B.; CINTI, D. L. Preparation of microsomes with calcium. **Meth. Enzymol.** v.52, p.83-8, 1978.
- SCOTT, P.; JAMES, S.; SHER, A. **Eur. J. Immunol.** v. 15, p.553-558, 1985.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.** v.215, p.213-219, 1993.
- SILVA de N.; GUYATT, H.; BUNDY, D. Anthelmintics. A Comparative Review of Their Clinical Pharmacology. **Drugs.** v.53 (5), p.769-788, 1997.
- SILVA, N. R.; SIRISENA, J.L.G.J.; GUNASEKERA, D. P.S.; ISMAIL, M.M.; SILVA, H.J. Effect of mebendazole therapy during pregnancy on birth outcome. **The Lancet.** v.353, p. 1145-1149, 1999.
- SMITH, N.C.; BRYANT, C. **Int. J. Parasitol.** v. 16, p.617-662, 1986.

- 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. Applied Pharmacol.** v.92, p. 141-149, 1988.
- SOUTHGATE, V. R. In: COOK, G. C. **Manson's Tropical Diseases**. Twentieth edition, Saunders, 1996.
- STOCKER, R.; McDONAGH, A.F.; GLAZER, A.N.; AMES, B.N. Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. **Meth. Enzymol.** v. 186, p.301-309, 1990.
- STOKOL, T.; RANDOLPH, J.F.; NACHBAR, S.; RODI, C.; BARR, S. C. Development of bone marrow toxicosis after albendazole administration in a dog and cat. **JAVMA.** v.210, n.12, p.1753-1756, 1997.
- TANAKA, E. Clinically important pharmacokinetic drug-drug interactions; role of cytochrome P450 enzymes. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v.23, p.403-16, 1998.
- TANG, C.; CHIBA, M.; MSHIME, J.; HOCHMAN, J. H.; CHEN, I.; WILLIAMS, T. M.; LIN, J. H. Comparison of imidazole- and 2-methylimidazole-containing farnesyl-protein transferase inhibitors: interaction with and metabolism by rat hepatic cytochrome P450s. **Drug Metab. Dispos.** v.28, p.680-686, 2000.
- TIMBRELL, J.A. In: TIMBRELL, J.A. **Principles of Biochemical Toxicology** ed., TAYLOR & FRANCIS, Londres, 1991.
- 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. 12419-12425, 1982.
- TOWBIN, H.; STAECHELI, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** v.455, p.68-78, 1979.
- TSUNODA, S. M.; VELEZ, R. L.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of Ketoconazole. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 66, p.461-471, 1999.
- 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. F.; VON SONNTAG, C., eds. **Oxygen Radicals in Biology and Medicine**, p.501-507. Plenum Publishing, New York, 1989.
- VIDELA, L.A.; GUERRI, C. Glutathione and alcohol. In: VINA, J., ed., **Metabolism and Physiological Functions**. p.57-67, CRC Press, Boca Raton, 1990.
- WARD R.F.; TIMOTHY, F.P. **Free radicals**, 1997.
- WASSOM, D.L.; GLEICH, G.J. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.28, p.860-863, 1979.

WAXMAN, D.J. **Arch. Biochem. Biophys.** v.369; p. 11-23, 1999.

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. **Physiological and Biochemical Fishes of the Amazon**, Manaus;INPA, p.299-312, 1996.

WILHELM FILHO, D.; MARCON, J. L.; TORRES, A. M; BOVERIS, A. Antioxidant defenses in vertebrates; a comparative approach. **Trends in Comparative Biochemistry in Physiology**. India;Poojapura *{in press}*.

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.920-923, 2000.

WEISS, D.J. Leukocyte response to toxic injury. **Toxicol. Pathol.** v.21, p. 135-140, 1993.

XIE, W. et al, **Nature.** v.406, p.435-439, 2000.