

Universidade de Évora

**Influência da idade e do tratamento com isoproterão no  
sistema citocromo P450 e nas actividades enzimáticas  
glutathione S-transferase e glutathione redutase  
do fígado, rins, testículos e timo de ratos machos Wistar**

Tese de Doutoramento

**Rui Manuel Alves Ferreira**

Évora, 1999.

Universidade de Évora

**Influência da idade e do tratamento com isoproturão no sistema citocromo P450 e nas actividades enzimáticas glutationo S-transferase e glutationo redutase do fígado, rins, testículos e timo de ratos machos Wistar**



Tese apresentada à Universidade de Évora para obtenção do grau de Doutor no ramo de Química

169047

nº 243      Tmpha

UNIVERSIDADE DE EVORA
CC / AD / CIÊNCIAS EXACTAS
Entrada: 26 / 09 / 99

U.E. SERVIÇOS ACADÉMICOS	N.º 602
CLASSIFICAÇÃO	SECÇÃO
	29 / 7 / 29

**Rui Manuel Alves Ferreira**

Évora, 1999

U. E.	443
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA	ENTRADA 21 / 7 / 99 TB

À

Isabel e

à

Laurinha

## Agradecimentos

Ao **Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais** do Departamento de Química da Universidade de Évora que incansavelmente me orientou e corrigiu o trabalho, o meu obrigado especial.

À **Mestra Isabel Maria Simão Alves Pereira Ferreira**, do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, minha esposa, pela ajuda incansável que me prestou no domínio do processamento informático do texto e dos resultados, assim como pelo apoio e encorajamento sempre dispensados, a quem também dedico este trabalho.

À **Dra. Maria de Fátima Bastos Candeias** do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela sua colaboração incansável e indispensável na parte experimental do trabalho, assim como pelo apoio na gestão do laboratório, o meu muito obrigado.

À **Dra. Maria do Rosário Caeiro Martins** do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela seu apoio no domínio da cromatografia de elevada eficácia.

À **Dra. Maria Teresa Freitas Ferreira Tinoco** do Departamento de Química da Universidade de Évora, pelo companheirismo e apoio dispensado em vários momentos difíceis que surgiram durante a realização deste trabalho, expresso uma especial palavra de gratidão.

À **D. Maria Jesuina Vieira Mósca e D. Anabela da Conceição Guerra Charrua Cabeça** do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade de Évora, pela ajuda indispensável na conservação e manutenção do biotério e do laboratório, assim como pelo apoio à realização experimental do trabalho.

Aos **meus pais** por todo o apoio e incentivo dispensados desde o início.



Ao **Departamento de Química da Universidade de Évora**, pelas facilidades em espaço, reagentes e equipamento concedidos que tornaram possíveis a realização deste trabalho.

Ao **Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM)** pela utilização da ultracentrífuga e do espectrofluorímetro.

## Abreviaturas e nomenclatura de enzimas referidos no texto

ACO	acil-CoA oxidase (E C 1.3.3.6)
adriamicina	hidrocloreto de (8 <i>S</i> -cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- $\alpha$ -L-lixo-exopiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12 nafetacenodiona
AFB1	aflotoxina B1-8,9-epóxido
Ah	hidrocarboneto aromático policíclico (do inglês <i>aryl hydrocarbon</i> )
AND	aminopirina <i>N</i> -desmetilase (E C 1.14.14.1)
ATP	trifosfato de adenosina
bomba P170	p-glicoproteína de membrana
BPDE	benzo [ $\alpha$ ] pireno-7,8-diol-9,10-epóxido
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CG	Cisteinilglicinase (E C 3.4.13.6)
cGST	glutathione <i>S</i> -transferase do citosol (E C 2.5.1.18)
<i>cis</i> -platina	<i>cis</i> -diaminodicloroplatina
cit b5	citocromo b5
cit P450	citocromo P450
clofibrato	éster etil 2-( <i>p</i> -clorofenoxi)-2-metil propanóico
clorambucilo	ácido de <i>N,N</i> -di-2-cloroetil- $\gamma$ - <i>p</i> -aminofenilbutírico
DAB	<i>N,N</i> , dimetilamino-4-aminoazobenzeno
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-di( <i>p</i> -clorofenil)etano
debrisoquina	3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinecarboximidamida
diazepan	benzodiazepina
DiEt-Hep	( <i>R</i> )-5-etiloxicarbonil-2- $\gamma$ -etiloxicarbonil-( <i>S</i> )-glutamilamino- <i>N</i> -2-heptilpentamida
dietilestilbestrol	3,4-di[ <i>p</i> -hidroxifenil]-3-exeno
diquato	8,10-dihidro-8a,10a-diazoniafenantreno
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECOD	7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase (E C 1.14.14.1)
END	etilmorfina <i>N</i> -desmetilase (E C 1.14.14.1)
EROD	7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase (E C 1.14.14.1)

esparteína	[7 <i>S</i> -(7 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,14 $\alpha$ ,14 $\alpha$ )]-dodecahidro-7,14-metano-2 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -dipirido[1,2- <i>a</i> :1',2'- <i>e</i> ] [1,5] diazocina
éster de ftalato	éster dimetil 1,2-benzodicarboxílico
Et-R-Hep	( <i>R</i> )-5-etiloxicarbonil-2- $\gamma$ -( <i>S</i> )-glutamilamino- <i>N</i> -2-heptilpentamida
FAD	dinucleótido de favina e adenina (forma oxidada)
fenobarbital	feniletilmalonilureia
FMN	mononucleótido de flavina (forma oxidada)
FSH	hormona estimuladora dos folículos
G6PD	glucose-6-P desidrogenase (E C 1.1.1.49)
GH	hormona do crescimento
GnRH	hormona libertadora de gonadotropinas
GP <sub>x</sub>	glutatio peroxidase dependente do Se (E C 1.11.1.9)
GR	glutatio redutase (E C 1.6.4.2)
GSH	glutatio (forma reduzida)
GSSG	glutatio (forma oxidada)
GST	glutatio <i>S</i> -transferase (E C 2.5.1.18)
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -glutamiltranseptidase (E C 2.3.2.2)
hexobarbital	5-(1-ciclohexeno-1-il)-1,5-dimetil-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )pirimidinotriona
HPLC	cromatografia líquida de elevada eficácia
IB	indutores bifuncionais
IM	indutores monofuncionais
IQ	2-amino-3-metilimidazo(4,5- <i>f</i> ) quinolina
ISD	isocitrato desidrogenase (E C 1.1.1.42)
isoproturão	3-(4-isopropil) fenil-1,1-dimetilureia
LH	hormona luteinizante
LHRH	hormona libertadora da hormona luteinizante
MeIQ <sub>x</sub>	2-amino-3,8-dimetilimidazo(4,5- <i>f</i> ) quinoxalina
melfalam	<i>p</i> -di(2-cloroetil)amino- <i>L</i> -fenilalanina
metiraprona	2-metil-1,2-d-3-piridil-1-propanona
mGST	glutatio <i>S</i> -transferase microssomal (E C 2.5.1.18)
MIC	Metilisocianato
mitomicina	[1 <i>aS</i> -(1 $\alpha$ ,8 $\beta$ ,8 $\alpha$ ,8 $\beta$ )]-6-amino-8-[[aminocarbonil]oxi]metil]-1,1 <i>a</i> ,2,8,8 <i>a</i> ,8 <i>b</i> -exahidro-8 <i>a</i> -metoxi-5-metilazirino[2',3':3,4]pirrolo [1,2- <i>a</i> ]indolo-4,7-diona

mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mV	milivolt
NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADH cit b5 red	NADH citocromo b5 redutase (E C 1.6.2.2)
NADP <sup>+</sup>	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADPHred	NADPH (P450) redutase (E C 1.6.2.4)
NAT	<i>N</i> -acetiltransferase (E C 2.3.1.1)
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	radical superóxido
<sup>1</sup> ΔO <sub>2</sub>	oxigénio no estado singlete
<sup>3</sup> ΣgO <sub>2</sub>	oxigénio no estado tripleto
•OH	radical hidroxilo
oltipraz	5-(2-pirazinil) 4-metil-1,2-ditiolo-3-tiona
OT	ocitocina
paraquato	1,1'-dimetil-4,4'-bipiridínio
PB	fenobarbital (ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico)
PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-b) pirimidina
pO <sub>2</sub>	pressão parcial de oxigénio molecular
R-Hep	(R)-5-carboxi-2-γ-(S)-glutamilamino- <i>N</i> -2-heptilpentamida
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	síntese de DNA a partir de uma matiz de RNA, catalisada pelo enzima transcriptase reversa (E C 2.7.7.49), seguida da amplificação do fragmento de cDNA, obtido por uma cadeia de reacções catalisadas por uma DNA polimerase (E C 2.7.7.7)
SMG	<i>S</i> -( <i>N</i> -metilcarbamoil) glutationo
SOD	superóxido dismutase (E C 1.15.1.1)
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno- <i>p</i> -dioxina
11β-T-OH	11β-testosterona hidroxilase (E C 1.14.15.4)
16α-T-OH	16α-testosterona hidroxilase (E C 1.14.15.4)
2α-T-OH	2α-testosterona hidroxilase (E C 1.14.15.4)
6β-T-OH	6β-testosterona hidroxilase (E C 1.14.15.4)
UDPGT	UDP-glucuronosil transferase (E C 2.4.1.17)
VP	Vasopressina



## Resumo

1. As interacções que podem ocorrer entre os xenobióticos e os organismos vivos são complexas e dependem, muitas vezes, de factores como a idade e a disponibilidade de água e de alimentos. No caso dos organismos superiores, dependem ainda do sexo e do seu estado de saúde.

2. Os estudos realizados em mamíferos, procurando determinar e compreender esse tipo de interacções, são habitualmente dirigidos para um único órgão, na maior parte dos casos o fígado, ou, menos frequentemente, os rins, e para um momento pré-definido do desenvolvimento, não contemplando assim a evolução do animal e dos seus subsistemas, em situações de exposição crónica a compostos exógenos. Por esse motivo, a informação que dispomos na literatura sobre a acção dos xenobióticos nos mamíferos é por vezes parcial e escassa.

3. Neste trabalho, procurámos determinar a concentração e as actividades catalíticas de alguns constituintes do sistema citocromo P450, enzimas mGST, cGST e GR do fígado, rins, testículos e timo de ratos machos Wistar com 7 e 12 semanas de idade, tendo em vista caracterizar em diferentes órgãos o perfil de concentração e de actividade catalítica desses enzimas em dois estádios importantes do desenvolvimento animal, a puberdade e adulto jovem.

4. Procurámos igualmente avaliar, nos referidos órgãos e nos mesmos estádios do desenvolvimento animal, o tipo de resposta que alguns constituintes do sistema P450 e os enzimas mGST, cGST e GR deram ao tratamento com isoproturão (composto utilizado como princípio activo de vários herbicidas), administrado intraperitonealmente

de 12 em 12 h, nas doses de 1, 3 e 9 mg/Kg, durante seis dias, tendo em vista determinar os riscos de toxicidade e a capacidade protectora dos diferentes tecidos em duas fases distintas do desenvolvimento.

5. Os perfis de concentração e de actividade enzimática que obtivemos para os constituintes do sistema citocromo P450, enzimas GST e GR de ratos machos Wistar pubertais e adultos, mostram que:

- a resposta ao isoproterurão foi diferente em cada um desses órgãos e dependente do estágio de desenvolvimento em que foi administrado, com excepção da actividade enzimática NADPHred que diminuiu sempre, excepto no timo de ratos maturos, onde aumentou na sequência do tratamento.

6. No fígado observámos que:

- nos ratos que não foram tratados com isoproterurão, a concentração de proteínas microsossomais, de citocromo P450 e de hemo, assim como as actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, END,  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH,  $11\beta$ -T-OH,  $2\alpha$ -T-OH, mGST e cGST aumentaram com a idade, no período etário que considerámos para estudo. Estes resultados sugerem que o tecido hepático de ratos machos maturos possui uma capacidade superior à dos ratos pubertais para a metabolização de xenobióticos e de esteróides endógenos, apesar de a concentração de proteínas do citosol e a actividade enzimática GR não terem sido afectadas pela idade.

- em ratos pubertais, o tratamento com isoproterurão provocou um decréscimo da concentração total de proteínas microsossomais, de citocromo P450, de citocromo b5 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, END,  $16\alpha$ -T-OH, cGST e GR, mas não afectou as actividades catalíticas  $6\beta$ -T-OH,  $11\beta$ -T-OH,  $2\alpha$ -

T-OH, mGST, nem a concentração de proteínas do citosol. Resposta, esta que expõe o tecido hepático a riscos de toxicidade elevados, sobretudo se o isoproturão penetrar no organismo misturado com outros compostos exógenos, uma vez que a inibição das reacções de desalquilação e de conjugação com o glutathione poderá restringir a biotransformação desses compostos no fígado.

- em ratos adultos, o tratamento com isoproturão induziu um aumento da concentração de proteínas microsossomais, de citocromo P450 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas ECOD, EROD, cGST e GR, resposta que poderemos considerar como hepato-protectora, devido ao efeito concertado entre alguns enzimas microsossomais e do citosol, para uma eventual eliminação do composto. No entanto, o isoproturão também provocou um decréscimo da concentração de citocromo b5 e das actividades enzimáticas NADPHred,  $6\beta$ -T-OH,  $11\beta$ -T-OH,  $2\alpha$ -T-OH e mGST, afectando o metabolismo de excreção da testosterona, efeito que poderá ter consequências imprevisíveis.

7. Nos rins, observámos que:

- nos ratos que não foram tratados com isoproturão, a concentração total de citocromo P450, de citocromo b5 e de hemo, assim como as actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, aumentaram com a idade, no período etário que considerámos para estudo. No entanto, contrariamente ao que aconteceu no tecido hepático, as actividades enzimáticas  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH e mGST diminuíram com a idade no mesmo intervalo de tempo, enquanto que as actividades enzimáticas cGST e GR apresentaram valores semelhantes em ratos pubertais e adultos jovens. Estes resultados sugerem, de novo, que a maturação sexual ampliou a capacidade de alguns constituintes do sistema citocromo P450 para a biotransformação de xenobióticos, mas



não reforçou, ou até inibiu, a sua capacidade para biotransformar esteróides endógenos ou para participar em respostas antioxidantes catalisadas por enzimas que participam na segunda fase de biotransformação de xenobióticos.

- o tratamento de ratos pubertais com isotretinona provocou um aumento da concentração total de proteínas microsossomais, de citocromo P450 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas mGST e GR. Contudo, inibiu acentuadamente as actividades catalíticas NADPHred, 6 $\beta$ -T-OH, 16 $\alpha$ -T-OH e, com menor intensidade, as actividades enzimáticas cGST, ECOD e EROD, que no caso da EROD só ocorreu no grupo de ratos tratados com a dose mais elevada (9mg/Kg). A inibição da transferência de equivalentes redutores para os citocromo P450, assim como a inibição das reacções de hidroxilação de esteróides endógenos catalisadas por enzimas microsossomais e das reacções de conjugação com o glutathione catalisadas pelos enzimas cGST, poderão afectar a capacidade de resposta do tecido renal a outros xenobióticos e, por esse motivo ampliar, o risco deste tecido para sofrer efeitos tóxicos pelo isotretinona e seus derivados, ou por outros compostos exógenos que venham a penetrar simultaneamente no organismo.

- o tratamento de ratos adultos com isotretinona provocou um decréscimo da concentração de citocromo P450, citocromo b5 e de hemo, assim como das actividades catalíticas NADPHred, ECOD e EROD microsossomais. No entanto, foram induzidas as actividades enzimáticas 6 $\beta$ -T-OH, 16 $\alpha$ -T-OH, mGST, cGST e GR. Este tipo de resposta pode ser considerada como protectora do tecido renal, pois pode constituir uma via alternativa para a eliminação de esteróides endógenos e de derivados metabólicos que cheguem aos rins provenientes, por exemplo, do tecido hepático.

8. Nos testículos observámos que:

- nos ratos que não foram tratados com isoproturão, a concentração total de proteínas, de citocromo P450, de citocromo b5 e de hemo, assim como as actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, mGST e cGST aumentaram com a idade, no período etário que considerámos para estudo, enquanto que as actividades enzimáticas  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH e GR não sofreram qualquer variação com a idade. Estes resultados sugerem que os testículos de ratos machos sexualmente maduros possuem uma capacidade superior à dos ratos pubertais para a metabolização de xenobióticos e de resposta anti-oxidante, apesar de a actividade enzimática GR não ter sido afectada pela idade.

- o tratamento de ratos pubertais e adultos com isoproturão induziu um aumento da concentração total de citocromo P450 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas ECOD e EROD, mas provocou um decréscimo da concentração de proteínas microssomais e das actividades enzimáticas NADPHred, mGST e cGST, sem afectar a actividade catalítica GR. A indução de reacções de desalquilação de xenobióticos, acompanhada pela inibição das actividades catalíticas mGST e cGST, constitui um perfil de agressividade induzido pelo xenobiótico sobre os testículos com implicações toxicológicas ao nível da espermatogénese.

9. No timo, observámos que:

- nos ratos que não foram tratados com isoproturão, a concentração total de proteínas, de citocromo P450 e de hemo, assim como as actividades enzimáticas ECOD, EROD e mGST aumentaram com a idade no período etário que considerámos para estudo, enquanto que a actividade enzimática cGST diminuiu e as actividades catalíticas NADPHred e GR não sofreram qualquer variação com a maturação sexual. Estes

resultados sugerem que a maturação sexual ampliou a capacidade do sistema P450 para a biotransformação de xenobióticos, mas inibiu as reacções de conjugação com o glutatono, catalisadas pelos enzimas do citosol, um importante sistema de defesa contra os xenobióticos.

-o tratamento de ratos pubertais com o isoproturão induziu um aumento da concentração proteica microsomal, de citocromos P450 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas ECOD, EROD, mGST e GR, mas provocou um decréscimo das actividades enzimáticas NADPHred e cGST, assim como da concentração proteica do citosol. Resposta esta com implicações toxicológicas, uma vez que a indução de reacções de desalquilação não foi acompanhada por uma indução semelhante das reacções de conjugação catalisadas pelos enzimas cGST, o que poderá contribuir para a acumulação de derivados metabolicos tóxicos no tecido.

- o tratamento de ratos adultos com o isoproturão provocou um decréscimo da concentração de proteínas microsomais, de citocromos P450 e de hemo, assim como das actividades catalíticas ECOD e mGST, mas provocou um aumento das actividades enzimáticas NADPHred, EROD, cGST e GR, comportando-se o xenobiótico como um indutor bifuncional das actividades enzimáticas EROD e cGST, que foram assistidas pela actividade NADPHred, uma via timo-protectora que eventualmente participará na eliminação do composto.

10. O risco de toxicidade provocada pelo isoproturão sobre o figado e rins parece-nos ser elevado durante a puberdade, devido à inibição significativa das reacções catalisadas maioritariamente pelos citocromos CYP1A1(rins), CYP1A2(figado), CYP2B1(figado) e CYP2B2(figado), assim como das reacções de conjugação catalisadas pelos enzimas cGST em ambos os tecidos. O risco de toxicidade provocada pelo isoproturão sobre o

timo parece-nos igualmente elevado durante a puberdade, uma vez que a indução das reacções maioritariamente catalisadas por citocromos CYP1A1 e CYP1A2, não foi seguida pela indução dos enzimas cGST.

11. A indução bifuncional dos enzimas cGST, no fígado e timo, e monofuncional, nos rins, de ratos machos Wistar adultos jovens, parece constituir uma resposta protectora desses tecidos, sugerindo que, em ratos adultos, esses órgãos poderão ser capazes de promover a eliminação do isoproturão por perda de um grupo metilo e conjugação desse derivado com o glutationo, ou por conjugação directa do xenobiótico com o tripéptido.

12. O risco de toxicidade provocado pelo isoproturão sobre os testículos, devido a possível indução dos CYP1A1 e CYP1A2 e à inibição dos enzimas mGST e cGST, mostrou-se semelhante em qualquer das idades que estudámos e pareceu ser muito superior ao que inferimos para o fígado, rins e timo.



## Abstract

1. The interactions that could be fall between xenobiotics and life organisms are complexes and, in several cases, depend of factors like health and nutrition state. In higher organisms also depend of gender and age.

2. The studies to evaluate those interactions in mammals are usually directed to only organ as the liver or less frequently to the kidney in a fixed age, without evaluate the development of the animal and his biotransformation systems in chronic exposition to exogenous compounds. Because of this, the knowledge about xenobiotics effects on living organisms are sometimes incomplete and scarce.

3. In this work, we intent to determine the concentration and enzymatic activities profile of cytochrome P450 system and mGST, cGST and GR enzymes of the liver, kidney, testis and thymus of Wistar male rats at puberty (7 weeks old) and young adult age (12 weeks old), two important stage of animal growth.

4. Moreover we also intent to evaluate the response profile of cytochrome P450 system and mGST, cGST and GR enzymes to the treatment with isoproturon (an active compound present in several herbicides), intraperitoneal administrated in doses of 1, 3 e 9 mg/Kg, from 12 to 12h, during six days.

5. The concentration and enzymatic activities' profiles that we obtained to the elements of the cytochrome P450 system, GST and GR enzymes of Wistar male rats, at puberty and young adult stages show that the response to the isoproturon treatment was different in any organ studied and age dependent, except for NADPHred enzymatic activity that

decreases with the isoproturon treatment in all organs studied, except in the thymus of mature animals where occurred the reverse effect.

6. In the liver we observed that:

- in the rats which were not treated with isoproturon, was produced an age-dependent increase of microsomal protein, cytochrome P450 and heme concentration, as well as NADPHred, ECOD, EROD, END,  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH,  $11\beta$ -T-OH,  $2\alpha$ -T-OH, mGST e cGST enzymatic activities, in life period selected for this study. These results suggest that hepatic capacity to xenobiotics and endogenous steroids metabolism was higher in young adult rats than in pubertal animals, though cytosol proteins concentration and GR enzymatic activity are similar in both ages.

- at puberty, the isoproturon treatment caused a decrease of total microsomal protein, cytochrome P450, cytochrome b5 and heme concentration, also NADPHred, ECOD, EROD, END,  $16\alpha$ -T-OH, cGST and GR enzymatic activities, but the cytosol protein concentration and  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH,  $11\beta$ -T-OH,  $2\alpha$ -T-OH, mGST enzymatic activities were not affected. These responses suggest that isoproturon treatment expose the hepatic tissue to more elevated toxicity risks, when it penetrate the organisms, mixed with other xenobiotics, since the inhibition of dealkylation and conjugation reactions could prevent the elimination of these compounds on the liver.

- in adult young rats the isoproturon treatment induced an increase of microsomal protein, cytochrome P450 and heme concentration, as well as, ECOD, EROD, cGST and GR enzymatic activities. We suppose that this response contributes to the liver protection against exogenous attacks due bifunctional induction of several microsomal and cytosol enzymes that could promote the elimination of the compound. However, the

isoproturon treatment caused a decrease of cytochrome b5 concentration and NADPHred, 6 $\beta$ -T-OH, 11 $\beta$ -T-OH, 2 $\alpha$ -T-OH e mGST enzymatic activities, an effect with unexpected consequences because it was affected the electronic transference in cytochrome P450 system and the biotransformation pathway of testosterone.

7. In the kidney we observed that:

- in the rats which were not treated with isoproturon, was produced an age-dependent increase of total concentration of cytochromes P450, cytochromes b5 and heme, as well as, NADPHred, ECOD, EROD enzymatic activities, in life period selected for this study. However, in contrast with the liver, we observed a decrease of 6 $\beta$ -T-OH, 16 $\alpha$ -T-OH and mGST enzymatic activities with age in the same life period, and cGST e GR enzymatic activities have the same values in both growth stages. These results suggest that renal capacity for xenobiotics and endogenous steroids metabolization was higher in mature Wistar male rats than animals at puberty, but the capacity of renal microsomal fraction to participate in endogenous steroids biotransformation or conjugation reactions decrease with age in same group of animals.

- at puberty, the isoproturon treatment induced an increase of total concentration of proteins, cytochromes P450 and heme, also mGST e GR enzymatic activities. Nevertheless, we observed a strong inhibition of NADPHred, 6 $\beta$ -T-OH and 16 $\alpha$ -T-OH enzymatic activities and a delicate inhibition of cGST, ECOD e EROD enzymatic activities, that in the later case only was significantly in the animals treated with more elevated dose (9 mg/Kg).

The inhibition of electronic transference from NADPH to the cytochromes P450, as well as, the endogenous steroids hydroxylation reactions catalysed by microsomal enzymes and glutathione conjugation reactions, mediate by cGST could affect the renal



biotransformation capacity of others xenobiotics and because of this, to improve the risk of kidney to bear toxic effects by isotreturon, yours metabolic derivates or other exogenous compounds that was penetrate in the organism in same time.

- In young adult rats the isotreturon treatments caused a decrease of total concentration of cytochromes P450, cytochromes b5 and heme, as well as, the NADPHred, ECOD e EROD microsomal enzymatic activities. Moreover, we are observed an increase of  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH, mGST, cGST e GR enzymatic activities. These results could be considered as protection response of renal tissue, because establish an alternative pathway for endogenous and metabolic derivatives elimination that could arrive to the kidneys, by example, from hepatic tissue.

8. In testis we observed that:

- in the rats which were not treated with isotreturon, was produced an age-dependent increase of total concentration of proteins, cytochrome P450, cytochrome b5 and heme, as well as NADPHred, ECOD, EROD, mGST e cGST enzymatic activities, in life period selected to the study, but we did not observe any difference of  $6\beta$ -T-OH,  $16\alpha$ -T-OH and GR enzymatic activity in both ages. These results suggest that testis of young adult Wistar rats have a more high capacity of xenobiotics metabolization and antioxidant response than Wistar rat at puberty, though the results obtained to the GR enzymatic activity was not affected by the age.

- at puberty and young adult stage, the isotreturon treatment induced an increase of total cytochromes P450 and heme concentration, as well as, an increase of ECOD and EROD enzymatic activities, but caused a decrease of microsomal proteins concentration and, NADPHred, mGST e cGST enzymatic activities, without affect the GR catalytic activity. We suspect that the induction of xenobiotics dealkilation reactions as the

inhibition of mGST and cGST catalytic activities correspond to a profile of elevated risk induced by the isoproturon in testis that could be implicated in toxicological effects in spermatogenesis.

9. In the thymus, we observed that:

- in the rats which were not treated with isoproturon, was produced an age-dependent increase of total proteins, cytochrome P450 and heme concentration, also ECOD, EROD and mGST enzymatic activities and, a decrease of cGST enzymatic activity with age, in life period selected to this study, but we did not observe any difference of NADPHred and GR enzymatic activity in both ages. These results suggest that sexual maturation improve the capacity of cytochrome P450 system to the xenobiotics biotransformation, but inhibit the reactions of conjugation with glutathione catalysed by cytosolic enzymes, an important defence system against xenobiotics.

- at puberty de isoproturon treatment induced an increase of microsomal proteins, cytochrome P450 and heme concentration, as well as, ECOD, EROD, mGST and GR enzymatic activities and a decrease of cytosol proteins concentration and NADPHred and cGST enzymatic activities, response with strong toxicological significance, since the induction of dealkylation reactions were not correlated with a similar induction of conjugation reactions catalysed by cGST.

- in young adult male Wistar rats, the isoproturon treatment caused a decrease of microsomal proteins, cytochrome P450 and heme concentration, as well as, ECOD and mGST catalytic activities, but caused an increase of NADPHred, EROD, cGST and GR enzymatic activities, behave as bifunctional inductor of EROD, cGST and NADPHred enzymatic activities, a pathway that could be participates in isoproturon elimination from the thymus and consequently could be considered as protection via of this organ.

10. the toxicological risk in liver and kidney associated to isoproturon treatment seems higher during puberty, owing the inhibition in reactions greatly catalysed by CYP1A1(kidney), CYP1A2 (liver), CYP2B1(liver) and CYP 2B2 (liver) isoenzymes, as well as, conjugation reactions catalysed by cGSTenzymes in both tissues. The toxicological risk in thymus associates to isoproturon treatment seems also elevated during puberty, because we did not observe an induction of cGST enzymes as those occur with reactions greatly catalysed by CYP1A1 and CYP1A2.

11. The bifunctional induction of cGST enzymes in liver and thymus, and the monofunctional induction of these enzymes in the kidneys of young adult Wistar male rats, seems a protection response of these tissues that probably promote the isoproturon elimination, by losing a methyl group and conjugation of the metabolic derived with glutathione, or through direct conjugation of the xenobiotic with the tripeptide.

12. The toxicological risk owing by isoproturon seems to be more elevated in testis than in liver, kidney and thymus, no-dependent of age and is probably associated to CYP1A1 and CYP1A2 induction and mGST and cGST inhibition.

# Índice

	<u>Página</u>
Índice de quadros	xxxiii
Índice de figuras	xxxv
<b>1. Fundamento Teórico</b>	<b>1</b>
1.1. Bioquímica do desenvolvimento animal	3
1.1.1. Introdução	3
1.1.2. Hipóteses clássicas sobre a influência da idade nos seres vivos	6
1.1.2.1. Hipótese da mutação somática	7
1.1.2.2. Hipótese da acumulação de erros durante a síntese proteica	8
1.1.2.3. Hipótese dos radicais livres	9
1.1.2.4. Hipótese imunológica	10
1.1.3. Outras concepções sobre a influência da idade nos seres vivos	11
1.1.3.1. Modelo diferencial	12
1.1.3.2. Sistemas complexos	14
1.2. Biotransformação de xenobióticos	16
1.2.1. Introdução	16
1.2.2. Reacções de biotransformação-Fase I e Fase II	17
1.2.3. Órgãos onde ocorrem as reacções de biotransformação	19
1.2.4. Localização celular dos sistemas de biotransformação em eucariotas	20
1.2.5. Desintoxicação-bioactivação	21
1.2.6. Caracterização da biotransformação	22
1.3. Sistema citocromo P450	23
1.3.1. Perspectiva histórica	23
1.3.2. Papel biológico	25
1.3.3. Órgãos e localização celular em mamíferos	28
1.3.4. Ciclo catalítico	28
1.3.5. Enzimas NADPH (P450) redutase	30
1.3.6. Enzimas citocromo P450	31

1.3.6.1. Caracterização estrutural	31
1.3.6.2. Interacção NADPH (P450) redutase-citocromo P450	33
1.3.6.3. Reacções	35
1.3.6.3.1. Reacções de oxidação	35
1.3.6.3.2. Reacções de peroxidação	37
1.3.6.3.3. Reacções de redução	38
1.3.6.3.3.1. Reacções de redução anaeróbia	41
1.3.6.3.3.2. Reacções de redução aeróbia	44
1.3.6.4. Regulação da expressão dos genes citocromo P450	46
1.3.6.4.1. Receptores “Ah”	47
1.3.6.4.2. Receptores “PPAR”	49
1.3.6.4.3. Receptores “PB” ?	51
1.3.6.4.4. Receptores “SRX” ?	54
1.3.6.5. Classificação	55
1.3.6.5.1. <i>CYP1</i>	56
1.3.6.5.2. <i>CYP2</i>	57
1.3.6.5.3. <i>CYP3</i>	58
1.3.6.5.4. <i>CYP4</i>	58
1.4. Glutathione <i>S</i> -transferase	59
1.4.1. Perspectiva histórica	59
1.4.2. Papel biológico	62
1.4.2.1. Adaptação biológica a compostos electrófilos	63
1.4.2.1.1. Benzo[ <i>a</i> ]pireno, benzo[ <i>a</i> ]antraceno e benzo[ <i>a</i> ]criseno.	64
1.4.2.1.2. Aflotoxina B1-8,9-epóxido	65
1.4.2.1.3. Compostos alquilantes	66
1.4.2.2. Bioactivação de compostos electrófilos	68
1.4.3. Classificação	69
1.4.4. Distribuição e localização celular	70
1.4.5. Reacção	71
1.4.6. Caracterização estrutural	72
1.4.7. Via metabólica de formação de ácidos mercaptúricos	73
1.4.8. Modulação da actividade enzimática	74

1.4.8.1.Regulação da expressão genética	75
1.4.8.2.Inibidores	78
1.5.Glutationo redutase	80
1.5.1.Perspectiva histórica	80
1.5.2.Papel biológico	80
1.5.3.Caracterização estrutural	81
1.5.4.Modulação enzimática exercida pelo NADPH e pelo GSSG	81
1.5.5.Efeitos de alguns xenobióticos	83
1.6.Aspectos da regulação hormonal nos sistemas de biotransformação de xenobióticos e de esteróides endógenos	85
1.6.1.Introdução	85
1.6.2.Interacção hormonas sexuais-hormona do crescimento	86
1.6.3.Influência das hormonas da tiróide	88
1.6.4.Influência da insulina	89
1.6.5.Influência dos glucocorticóides	89
1.6.6.Via neuroendócrina timo-figado	90
1.7.Influência da idade na biotransformação de xenobióticos e de esteróides endógenos	94
1.8.O isoproturão como xenobiótico	99
1.8.1.Introdução	99
1.8.2.Alguns aspectos sobre herbicidas	100
1.8.2.1.Fenilureias	101
1.8.2.2.Isoproturão	102
1.8.2.3.Efeitos provocados pelo isoproturão em mamíferos	103
<b>2.O problema e os objectivos</b>	<b>105</b>
<b>3.Metodologia</b>	<b>112</b>
3.1.Estratégia adopada	114
3.2.Organigrama do trabalho	117
3.3.Procedimento experimental	118
3.3.1.Animais	118

3.3.1.1.Preparação dos animais	118
3.3.1.2.Recolha e determinação do peso húmido dos órgãos	120
3.3.2.Fraccionamento celular dos tecidos	120
3.3.2.1.Preparação dos homogeneizados	120
3.3.2.2.Preparação da fracção microssomal e do citosol	121
3.3.3.Análise quantitativa das fracções subcelulares	122
3.3.3.1.Doseamentos	122
3.3.3.1.1.Determinação da concentração de proteína total	122
3.3.3.1.2.Determinação da concentração de citocromo b5	123
3.3.3.1.3.Determinação da concentração de citocromo P450	124
3.3.3.1.4.Determinação da concentração de hemo	125
3.3.3.2.Determinação das actividades enzimáticas	125
3.3.3.2.1.NADPH (P450) redutase	125
3.3.3.2.2.Etilmorfina <i>N</i> -desmetilase	126
3.3.3.2.3.Etoxicumarina <i>O</i> -desetilase	128
3.3.3.2.4.Etoxicirresorufina <i>O</i> -desetilase	130
3.3.3.2.5.Testosterona hidroxilases	132
3.3.3.2.6. Glutationo <i>S</i> -transferase	134
3.3.3.2.7.Glutationo redutase	136
3.4.Análise estatística	137
3.4.1.Introdução	137
3.4.2.Alguns conceitos de estatística	137
3.4.2.1.População, amostra, dimensão e selecção da amostra	138
3.4.2.2.Valor central e dispersão	139
3.4.2.3.Distribuição gaussiana	159
3.4.2.4.Teorema do limite central	141
3.4.2.5.Desvio-padrão da média	141
3.4.2.6.Graus de liberdade	142
3.4.2.7.Intervalos de confiança	142
3.4.2.8.Distribuição t de "Student"	146
3.4.2.9.Análise de variância simples	147
3.4.2.10.Distribuição F	150

3.4.2.11.Comparação entre médias	151
3.4.2.12.Teste de Duncan	152
3.4.2.13.Erros	154
3.4.3.Metodologia utilizada neste trabalho	154
3.5.Equipamento	157
3.6.Reagentes	158
<b>4.Resultados</b>	<b>161</b>
4.1.Influência da idade e do tratamento com isoproterurão em ratos machos	
Wistar	163
4.1.1.Peso do corpo	163
4.1.2.Quantidade total de alimentos ingeridos	164
4.1.3.Quantidade total de água ingerida	165
4.1.4.Quantidade total de fezes produzidas	165
4.1.5.Quantidade total de urina produzida	166
4.2.Influência da idade e do tratamento com isoproterurão no fígado de ratos	
machos Wistar	167
4.2.1.Orgão intacto	168
4.2.1.1.Peso húmido	168
4.2.1.2.Relação peso húmido do órgão / peso do corpo	168
4.2.2.Fracção microsomal	169
4.2.2.1.Concentração de proteína total	169
4.2.2.2.Concentração de citocromo P450	170
4.2.2.3.Concentração de citocromo b5	171
4.2.2.4.Concentração de hemo	172
4.2.2.5.Actividade enzimática NADPH (P450) redutase	173
4.2.2.6.Actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase	174
4.2.2.7.Actividade enzimática 7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase	175
4.2.2.8.Actividade enzimática etilmorfina <i>N</i> -desmetilase	176
4.2.2.9.Actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase	177
4.2.2.10.Actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase	178
4.2.2.11.Actividade enzimática 11 $\beta$ -testosterona hidroxilase	179



4.2.2.12. Actividade enzimática 2 $\alpha$ -testosterona hidroxilase	180
4.2.2.13. Actividade enzimática glutatio <i>S</i> -transferase	181
4.2.3. Citosol	182
4.2.3.1. Concentração de proteína total	182
4.2.3.2. Actividade enzimática glutatio <i>S</i> -transferase	183
4.2.3.3. Actividade enzimática glutatio redutase	184
4.3. Influência da idade e do tratamento com isoproturão nos rins de ratos machos Wistar	185
4.3.1. Órgão intacto	186
4.3.1.1. Peso húmido	186
4.3.1.2. Relação peso húmido do órgão / peso do corpo	187
4.3.2. Fracção microssomal	188
4.3.2.1. Concentração de proteína total	188
4.3.2.2. Concentração de citocromo P450	189
4.3.2.3. Concentração de citocromo b5	190
4.3.2.4. Concentração de hemo	191
4.3.2.5. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase	192
4.3.2.6. Actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase	193
4.3.2.7. Actividade enzimática 7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase	194
4.3.2.8. Actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase	195
4.3.2.9. Actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase	196
4.3.2.10. Actividade enzimática glutatio <i>S</i> -transferase	197
4.3.3. Citosol	198
4.3.3.1. Concentração de proteína total	198
4.3.3.2. Actividade enzimática glutatio <i>S</i> -transferase	199
4.3.3.3. Actividade enzimática glutatio redutase	200
4.4. Influência da idade e do tratamento com isoproturão nos testículos de ratos machos Wistar	200
4.4.1. Órgão intacto	201
4.4.1.1. Peso húmido	201
4.4.1.2. Relação peso húmido do órgão / peso do corpo	202
4.4.2. Fracção microssomal	203

4.4.2.1. Concentração de proteína total	203
4.4.2.2. Concentração de citocromo P450	204
4.4.2.3. Concentração de hemo	204
4.4.2.4. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase	205
4.4.2.5. Actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase	206
4.4.2.6. Actividade enzimática 7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase	207
4.4.2.7. Actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase	208
4.4.2.8. Actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase	209
4.4.2.9. Actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase	210
4.4.3. Citosol	211
4.4.3.1. Concentração de proteína total	211
4.4.3.2. Actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase	212
4.4.3.3. Actividade enzimática glutathione redutase	213
4.5. Influência da idade e do tratamento com isoproturão no timo de ratos machos Wistar	214
4.5.1. Órgão intacto	215
4.5.1.1. Peso húmido	215
4.5.1.2. Relação peso húmido do órgão / peso do corpo	216
4.5.2. Fracção microssomal	216
4.5.2.1. Concentração de proteína total	216
4.5.2.2. Concentração de citocromo P450	217
4.5.2.3. Concentração de hemo	218
4.5.2.4. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase	219
4.5.2.5. Actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase	220
4.5.2.6. Actividade enzimática 7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase	221
4.5.2.7. Actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase	221
4.5.3. Citosol	222
4.5.3.1. Concentração de proteína total	222
4.5.3.2. Actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase	223
4.5.3.3. Actividade enzimática glutathione redutase	224

<b>5.Discussão</b>	226
5.1.Influência da idade e do tratamento com isoproturão, no animal inteiro, em ratos machos Wistar	228
5.2.Influência da idade e do tratamento com isoproturão no fígado de ratos machos Wistar	230
5.3.Influência da idade e do tratamento com isoproturão nos rins de ratos machos Wistar	248
5.4.Influência da idade e do tratamento com isoproturão nos testículos de ratos machos Wistar	257
5.5.Influência da idade e do tratamento com isoproturão no timo de ratos machos Wistar	265
<b>6.Conclusões</b>	275
<b>7.Referências bibliográficas</b>	284
<b>Apêndices</b>	319
Apêndice A.Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA F”)	321
Apêndice B.Resultados obtidos por cromatografia de elevada eficácia	325
B.1.Alguns cromatogramas	327
B.2.Curvas de calibração	330
Apêndice C.Curva de calibração para a proteína total (método de Lowry)	332

## Índice de quadros

### **Capítulo 3**

<b>Quadro 3.1.</b> Composição da água ingerida pelos ratos	119
<b>Quadro 3.2.</b> Composição da ração ingerida pelos ratos	119

### **Apêndice A**

<b>Quadro I.</b> Pesos do corpo e dos órgãos, relação peso do órgão /peso do corpo em ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isoproteronolol, às 7 e às 12 semanas de idade.	323
<b>Quadro II.</b> Quantidade de ração e de água ingerida, quantidade de urina e fezes produzidas por ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isoproteronolol, às 7 e às 12 semanas de idade.	323
<b>Quadro III.</b> Concentração e actividades enzimáticas da fracção microsomal e do citosol de fígado de ratos machos Wistar, controlo e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isoproteronolol, às 7 e às 12 semanas de idade.	324



## Índice de figuras

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1.</b> Principais eventos do ciclo de vida animal.	4
<b>Figura 1.2.</b> Destinos que um xenobiótico pode seguir depois de penetrar num organismo vivo.	18
<b>Figura 1.3.</b> Ciclo catalítico do sistema citocromo P450.	29
<b>Figura 1.4.</b> Algumas reacções de oxidação em que os citocromo P450 participam.	36
<b>Figura 1.5.</b> Via metabólica de formação de ácidos mercaptúricos.	73
<b>Figura 1.6.</b> Regulação da transcrição dos enzimas citocromo P450 e glutatióno <i>S</i> -transferase por indutores monofuncionais [IM] e bifuncionais [IB].	77
<b>Figura 1.7.</b> Interacção metabólica entre o ciclo de oxidação-redução do glutatióno e os enzimas glutatióno <i>S</i> -transferase e glucose-6-P desidrogenase, um dos geradores de equivalentes redutores de NADPH.	82
<b>Figura 1.8.</b> Via neuroendócrina timo-fígado.	93
<b>Figura 1.9.</b> Isoproturão: 3-(4-isopropil) fenil-1,1-dimetilureia.	102

### Capítulo 3

<b>Figura 3.2.</b> Áreas de densidade de probabilidade de distribuição gaussiana.	144
---	-----

### Capítulo 4

<b>Figura 4.1.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso do corpo de ratos machos Wistar.	163
<b>Figura 4.2.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na quantidade de alimentos ingeridos por ratos machos Wistar.	164
<b>Figura 4.3.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na quantidade de água ingerida por ratos machos Wistar.	165
<b>Figura 4.4.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na quantidade de fezes produzidas por ratos machos Wistar.	166

<b>Figura 4.5.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na quantidade de urina produzida por ratos machos Wistar.	167
<b>Figura 4.6.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão no peso húmido de fígado de ratos machos Wistar.	168
<b>Figura 4.7.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na relação peso do fígado/ peso do corpo de ratos machos Wistar.	169
<b>Figura 4.8.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de proteína total da fracção microssomal de fígado de ratos machos Wistar.	170
<b>Figura 4.9.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de citocromo P450 da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	171
<b>Figura 4.10.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de citocromo b5 da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	172
<b>Figura 4.11.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de hemo da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	173
<b>Figura 4.12.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática NADPH (P450) reductase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	174
<b>Figura 4.13.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	175
<b>Figura 4.14.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-toxirresorufina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	176
<b>Figura 4.15.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática etilmorfina <i>N</i> -desmetilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	177
<b>Figura 4.16.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	178

<b>Figura 4.17.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática $16\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	179
<b>Figura 4.18.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática $11\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	180
<b>Figura 4.19.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática $2\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	181
<b>Figura 4.20.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathiono <i>S</i> -transferase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar.	182
<b>Figura 4.21.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de proteína total do citosol do fígado de ratos machos Wistar.	183
<b>Figura 4.22.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathiono <i>S</i> -transferase do citosol do fígado de ratos machos Wistar.	184
<b>Figura 4.23.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathiono redutase do citosol do fígado de ratos machos Wistar.	185
<b>Figura 4.24.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão no peso húmido dos rins de ratos machos Wistar.	186
<b>Figura 4.25.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na relação peso dos rins/ peso do corpo de ratos machos Wistar.	187
<b>Figura 4.26.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de proteína total da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar.	188
<b>Figura 4.27.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de citocromo P450 da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar.	189
<b>Figura 4.28.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de citocromo b5 da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar.	190



<b>Figura 4.29.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de hemo microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	191
<b>Figura 4.30.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	192
<b>Figura 4.31.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase da fracção microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	193
<b>Figura 4.32.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-etoxirresorufina <i>O</i> -desetilase da fracção microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	194
<b>Figura 4.33.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	195
<b>Figura 4.34.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	196
<b>Figura 4.35.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutatono <i>S</i> -transferase da fracção microsossomal dos rins de ratos machos Wistar.	197
<b>Figura 4.36.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de proteína total do citosol dos rins de ratos machos Wistar.	198
<b>Figura 4.37.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutatono <i>S</i> -transferase do citosol dos rins de ratos machos Wistar.	199
<b>Figura 4.38.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutatono redutase do citosol dos rins de ratos machos Wistar.	200
<b>Figura 4.39.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão no peso húmido de testículos de ratos machos Wistar.	201
<b>Figura 4.40.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na relação peso dos testículos/ peso do animal, em ratos machos Wistar.	202

<b>Figura 4.41.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	203
<b>Figura 4.42.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de citocromo P450 da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	204
<b>Figura 4.43.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de hemo da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	205
<b>Figura 4.44.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	206
<b>Figura 4.45.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	207
<b>Figura 4.46.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 7-etoxirresorfina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	208
<b>Figura 4.47.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar.	209
<b>Figura 4.48.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal de testículos de ratos machos Wistar.	210
<b>Figura 4.49.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase da fracção microssomal de testículos de ratos machos Wistar.	211
<b>Figura 4.50.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total do citosol dos testículos de ratos machos Wistar.	212
<b>Figura 4.51.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase do citosol dos testículos de ratos machos Wistar.	213

<b>Figura 4.52.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathione redutase do citosol dos testículos de ratos machos Wistar.	213
<b>Figura 4.53.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão no peso húmido do timo de ratos machos Wistar.	215
<b>Figura 4.54.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na relação peso de timo / peso do corpo, de ratos machos Wistar.	216
<b>Figura 4.55.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de proteína total da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	217
<b>Figura 4.56.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de citocromo P450 da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	218
<b>Figura 4.57.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de hemo da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	218
<b>Figura 4.58.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	219
<b>Figura 4.59.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-etoxicumarina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	220
<b>Figura 4.60.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-etoxirresorfina <i>O</i> -desetilase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	221
<b>Figura 4.61.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar.	222
<b>Figura 4.62.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de proteína total do citosol do timo de ratos machos Wistar.	223
<b>Figura 4.63.</b> Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathione <i>S</i> -transferase do citosol do timo de ratos machos Wistar.	224

**Figura 4.64.**Influência da idade e do tratamento com isotretinona na actividade enzimática glutatióno redutase do citosol do timo de ratos machos. 225

## Apêndice B

**Figura I.** Cromatograma de uma mistura padrão de  $6\beta$ -T-OH ( $3 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) a,  $16\alpha$ -T-OH ( $1 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) b,  $11\beta$ -T-OH ( $1 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) c,  $2\alpha$ -T-OH ( $1 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) d e testosterona ( $20 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) e. 327

**Figura II.** Cromatograma de uma mistura padrão de  $6\beta$ -T-OH ( $30 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) a,  $16\alpha$ -T-OH ( $10 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) b,  $11\beta$ -T-OH ( $10 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) c,  $2\alpha$ -T-OH ( $10 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) d e testosterona ( $20 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) e. 327

**Figura III.** Cromatograma de uma amostra de fígado de ratos machos Wistar controlo com 7 semanas de idade, onde estão assinalados os picos  $6\beta$ -T-OH (a),  $16\alpha$ -T-OH (b),  $11\beta$ -T-OH (c),  $2\alpha$ -T-OH (d) e testosterona (e). 328

**Figura IV.** Cromatograma de uma amostra de rins de ratos machos Wistar controlo com 7 semanas de idade, onde estão assinalados os picos  $6\beta$ -T-OH (a),  $16\alpha$ -T-OH (b) e testosterona (e). 328

**Figura V.** Cromatograma de uma amostra de testículos de ratos machos Wistar controlo com 7 semanas de idade onde estão assinalados os picos  $6\beta$ -T-OH (a),  $16\alpha$ -T-OH (b) e testosterona (e). 329

**Figura VI.** Cromatograma de uma amostra de timo de ratos machos Wistar controlo com 7 semanas de idade. 329

**Figura VII.** Curva de calibração para  $6\beta$ -T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 1,5; 3,0; 7,5; 15,0; 30,0 e 75,0  $\text{mg.dm}^{-3}$  de  $6\beta$ -hidroxitestosterona. 330

**Figura VIII.** Curva de calibração para  $16\alpha$ -T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0  $\text{mg.dm}^{-3}$  de  $16\alpha$ -hidroxitestosterona. 330

**Figura IX.** Curva de calibração para  $11\beta$ -T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0  $\text{mg.dm}^{-3}$  de  $11\beta$ -hidroxitestosterona. 331

**Figura X.** Curva de calibração para  $2\alpha$ -T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0  $\text{mg.dm}^{-3}$  de  $2\alpha$ -hidroxitesterona.

331

### **Apêndice C**

**Figura XI.** Curva de calibração utilizada na determinação da concentração de proteína total, construída com 7 soluções contendo 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200  $\mu\text{g.cm}^{-3}$  de albumina do soro bovino, respectivamente.

334

## **1.Fundamento teórico**



## 1.1. Bioquímica do desenvolvimento animal

### 1.1.1. Introdução

A bioquímica do desenvolvimento animal constitui uma área científica muito lata e complexa (Rothstein, 1986, Jazwinski, 1996, McClearn, 1997). Grande parte dos conceitos que vão ser abordados neste capítulo nem sempre estão explícitos na literatura o que torna necessário fazer-se uma breve sistematização.

Os sistemas vivos distinguem-se dos sistemas inanimados pela forma como contrariam a segunda lei da termodinâmica que não prevê a existência de processos cíclicos na natureza (Blum, 1955, Calow, 1978) e preconiza uma tendência contínua e unidirecional da ordem para a desordem.

A universalidade da tendência entrópica só é válida para sistemas isolados que não trocam matéria e ou energia através das fronteiras que os delimitam. No entanto, o universo, é em regra, considerado como um sistema aberto e os processos naturais como ciclos que envolvem um fluxo entre a ordem e a desordem, a composição e a decomposição (Calow, 1978). Apesar disso, algumas configurações mantêm a sua existência por consideráveis períodos de tempo, graças á sua estabilidade ou à sua repetibilidade.

O aparecimento repetitivo de uma unidade individual pode acontecer devido a substituição fortuita, quando a mesma configuração reaparece com elevada frequência, por possuir probabilidade elevada de formação, ou devido a replicação, quando providencia uma cópia de si própria conservando a sua organização complexa, mesmo que a entidade original seja posteriormente destruída. Uma vez que a replicação permite a formação de um número elevado de cópias, uma unidade com essa capacidade pode

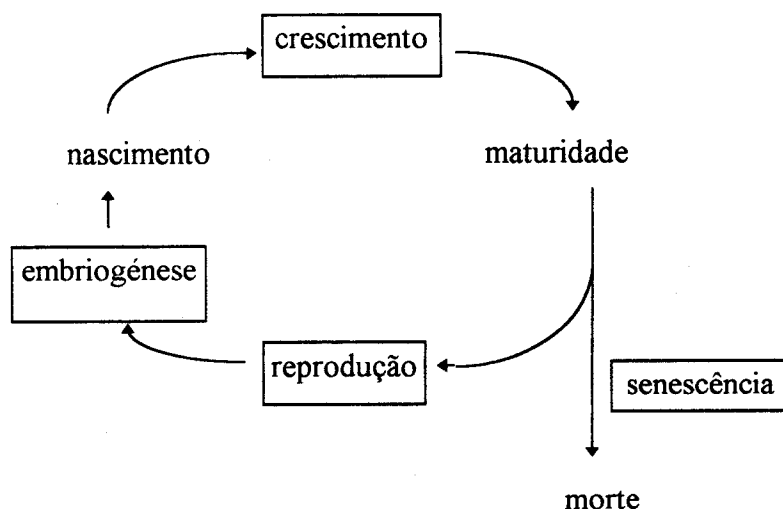


tornar-se vulgar mesmo quando a sua probabilidade de formação é baixa. Este tipo de ocorrência manifesta-se na formação de cristais e na reprodução dos organismos vivos (Calow, 1978, Jazwinski, 1996).

Um sistema só pode perpetuar-se por replicação directa se for estável e inerte. Caso contrário, a replicação obedece forçosamente a um plano, como acontece com os organismos vivos que se replicam de acordo com as regras codificantes do seu material hereditário (Cairns-Smith, 1971, Rothestein, 1986, Lewin, 1994, Jazwinski, 1996).

A evolução dos seres vivos enquanto sistemas individualizados apresenta três aspectos importantes, como sejam: o aumento progressivo de tamanho, a diferenciação celular e o desenvolvimento de sistemas de comunicação entre os seus componentes (Zeuthen, 1947, Calow, 1978, Chauvet, 1986).

Os ciclos da vida, para além de oscilarem entre duas fases distintas de formação e decomposição, exigem um terceiro passo fundamental que é o da replicação. O diagrama da figura 1.1 representa os principais eventos do ciclo de vida animal (Calow, 1978, Hosokawa *et al.*, 1997).



**Figura 1.1** Principais eventos do ciclo de vida animal

O **crescimento** ocorre quando a entrada de nutrientes no organismo é superior ao consumo na compensação das perdas resultantes dos processos dissipativos. O potencial químico disponível para o crescimento é utilizado na produção de novas células, na satisfação das pré-existentes, ou na criação de material extracelular, como por exemplo a acumulação de gordura (Calow, 1978).

O crescimento pode, ao nível molecular, exprimir-se através da replicação do DNA ou da biossíntese de proteínas e, ao nível celular, através da velocidade de multiplicação ou de morte celular ou, ainda, através do aumento de volume de cada célula.

O termo **diferenciação celular** é referido na literatura como o processo em que ocorre um aumento do conteúdo e da diversidade celular que leva à formação de diferentes linhagens de células com organização molecular e propriedades metabólicas diversas, que tornam possível a construção de um organismo multicelular a partir de um único zigoto (Calow, 1978; Hosokawa *et al.*, 1997).

No entanto, a diferenciação celular é mais abrangente do que o conceito atrás exposto, uma vez que não só engloba a histogénese, quando se refere às diferenças celulares progressivas que se manifestam durante a embriogénese ou na transformação de um sistema em desenvolvimento, mas também à regionalização que ocorre em alguns locais dos sistemas vivos nos processos regenerativos e que consiste na formação de estruturas diferentes e essencialmente disjuntas a partir de uma estrutura inicialmente homogénea (Chauvet, 1986).

A vida e a morte estão fortemente interligadas uma vez que todos os seres vivos morrem devido a causas diversas como doenças, acidentes, acção dos predadores ou em resultado de alguns processos degenerativos intrínsecos. Em algumas espécies, o

envelhecimento e a morte, estão fortemente associados com a reprodução, nomeadamente em insectos. Contudo, a maioria dos vertebrados possui tecidos mitoticamente activos que são reciclados durante toda a vida e envelhecem lentamente. As possíveis causas fisico-químicas que determinam este processo poderão estar previamente programadas no seu património hereditário, ou constituírem uma acumulação aleatória de danos no sistema que o inviabilizam progressivamente até à morte (Calow, 1978, Rose, 1991).

O termo **desenvolvimento** apesar de, por vezes, ser utilizado de forma pouco clara e confundido com crescimento, é de índole globalizador e designa o conjunto de variações, estruturais e metabólicas, progressivas ou aleatórias a que um indivíduo está sujeito durante a sua vida (Chauvet, 1986, McClearn, 1997, Hosokawa *et al.*, 1997).

Os modelos que procuram interpretar o desenvolvimento englobam uma ampla variedade de fenómenos e níveis de explicação (McClearn, 1997, Hosokawa *et al.*, 1997). O desenvolvimento é, pois, um processo descontínuo e de difícil previsibilidade, devido à incerteza relacionada com as características próprias e a bifurcações complexas de cada sistema, à magnitude de cada nível em que decorre e também à influência do património genético e do ambiente que diferem hierarquicamente de subsistema para subsistema, e dentro de cada subsistema ao longo da idade cronológica (Jazwinski, 1996, McClearn, 1997).

### 1.1.2. Hipóteses clássicas sobre a influência da idade nos seres vivos

Rose (1991) e Arking (1991) identificaram muitos modelos que procuram interpretar a influência da idade nos organismos vivos com base na identificação de processos biológicos básicos ao nível celular, dos tecidos e dos órgãos. A maior parte

dos modelos descritos podem ser agrupados em quatro hipóteses mais abrangentes: (1) mutação somática (Burnet, 1972, Goldstein, 1978), (2) acumulação de erros durante a síntese proteica (Orgel 1973), (3) radicais livres e formação de ligações cruzadas (Harman, 1972), (4) participação do sistema imunitário (Burnet, 1972, 1974).

#### 1.1.2.1. Hipótese da mutação somática

A hipótese da mutação somática considera que erros na síntese do DNA de células somáticas poderão acumular-se com a idade e levar a uma eventual perda da função biológica normal das células. O modelo fundamenta-se no facto de a frequência de aberrações cromossomais aumentar com a idade e de a irradiação de células com radiação X conduzir a alterações moleculares idênticas, acompanhadas por uma diminuição da esperança de vida celular (Goldstein, 1978).

Todavia, têm surgido algumas inconsistências nesta hipótese. Por exemplo, a correlação entre o tipo de radiação ou a dose aplicada e as aberrações cromossomais ou a diminuição da longevidade nem sempre é muito elevada. Contudo, existe uma relação bem estabelecida entre os erros produzidos no DNA e os erros cromossomais que permitem reconciliar algumas dessas dificuldades (Burnet, 1974).

Por outro lado, os mamíferos possuem mecanismos moleculares capazes de reconhecer e reparar danos no DNA. No entanto, também existem algumas evidências de perda de fidelidade desses mecanismos com a idade (Rothstein, 1986). Por exemplo, Epstein *et al.* (1972) observaram que a taxa de reparação do DNA se apresentava bastante diminuída em experiências realizadas *in vitro* com fibroblastos senescentes de humanos. Alguns autores têm sugerido que a repetição genética protegerá as células destes danos e, conseqüentemente, a esperança de vida de um organismo poderá

dependem da extensão em que as próprias mensagens genéticas se repetem (Medvedev, 1981). Por esse motivo, pode acontecer que a esperança de vida dependa da ocorrência de danos em genes pouco repetidos ou não repetidos.

Outros autores têm proposto que a replicação incompleta dos cromossomas, com perda parcial das suas sequências teloméricas ao longo do desenvolvimento, pode contribuir para a perda gradual do potencial de proliferação celular, uma vez que o encurtamento dos telómeros facilita a degradação e a fusão cromossomal. No entanto, alguns estudos realizados para compreender esse facto, ainda não permitiram determinar os factores responsáveis pela conservação do tamanho dos telómeros durante os processos replicativos, pois parece que a actividade telomerase, por si só, não é suficiente para o fazer, devendo, por esse motivo, existir mecanismos não dependentes da telomerase que participam na estabilização do comprimento dos telómeros (Smith e Pereira-Smith, 1996).

#### 1.1.2.2. Hipótese da acumulação de erros durante a síntese proteica

A hipótese da acumulação de erros durante a síntese proteica formulada por Orgel (1973) sugere que a ocorrência de falhas ao nível da transcrição e/ou tradução, pode autoperpetuar-se e conduzir a uma quebra gradual, mas irreversível, da fidelidade na síntese proteica.

Uma das principais previsões desta teoria é a da população enzimática de um organismo poder variar de tal modo com a idade que venha a impedir um funcionamento óptimo dos processos metabólicos (Cutler, 1975; Rothstein, 1986, Rose, 1991 e Arking, 1991). No entanto, algumas experiências têm mostrado que a incidência de inserção de bases erradas em mRNA a partir de matrizes sintéticas de DNA não varia

quando se comparam preparações de RNA polimerase de ratos envelhecidos com as de ratos jovens. Poderá, pois, defender-se a ocorrência de erros pontuais, mas não uma catástrofe de erros ao longo do desenvolvimento (Rothstein, 1986).

### 1.1.2.3. Hipótese dos radicais livres

A hipótese dos radicais livres descrita por Harman (1972) admite que uma ampla variedade de agentes da natureza, como por exemplo radicais livres e aldeídos, podem desencadear a formação de ligações cruzadas entre grupos de grandes polímeros de localização próxima no organismo que provocam alterações da conformação espacial dessas biomoléculas e inviabilizam o seu papel na célula. Por outro lado, parece que esse efeito depende da idade do organismo (Sohal e Weindruch, 1996, Beckman e Ames, 1998).

De acordo com esta hipótese, poderá ocorrer no meio celular um aumento da produção de radicais livres com a idade ou uma falha nos sistemas de defesa da célula.

As ligações cruzadas podem, também, participar na associação de pequenas moléculas e promover a fixação destas a moléculas de grandes dimensões ou até aos organitos (Harman, 1972, Rothstein, 1986, Beckman e Ames, 1998, Rose, 1991 e Arking, 1991). Por exemplo, a formação de ligações cruzadas no colagénio aumenta com a idade. No entanto, parece que muitas delas ocorrem durante o crescimento e a maturação e não no período designado por senescência (Hall, 1976, Cerami, 1986).

A lipofusceína, o chamado pigmento do envelhecimento, acumula-se com a idade nas células de muitos tecidos (Strehler, 1962). Este pigmento, que resulta da formação de ligações cruzadas entre biomoléculas, parece não produzir danos celulares, excepto quando se acumula em quantidade suficientemente elevada para interferir com a estrutura

e o funcionamento celular adequado (Zeman, 1971). Todavia, a ocorrência de tais materiais sugere que outros produtos menos óbvios, resultantes deste tipo de ligações, se possam acumular levando à destruição dos tecidos. Parece, também, que na cromatina pode ocorrer uma acumulação progressiva de ligações cruzadas entre as cadeias de DNA e as histonas (Cutler, 1975, Beckman e Ames, 1998). Este efeito é evidenciado pelo decréscimo na possibilidade de extracção de proteínas do DNA de células envelhecidas e pelo aumento da sua estabilidade térmica com a idade.

O estabelecimento de uma relação entre tais variações e os processos de senescência ainda não foi conseguido, embora algumas experiências envolvendo dietas ricas em anti-oxidantes pareçam contribuir para a expansão da longevidade de animais de laboratório. Sabe-se que esses agentes inibem a formação de ligações cruzadas por reacções de autooxidação (Harman, 1972, Rothstein, 1986, Beckman e Ames, 1998).

#### 1.1.2.4. Hipótese imunológica

A hipótese imunológica resultou do facto de se ter observado que a perda da capacidade de defesa do sistema imunitário contra células malignas e auto-imunitárias de antigénios reconhecíveis aumentava com a idade (Burnet, 1972, 1974).

A contribuição do timo para a competência imunitária é extremamente elevada durante o período de maturação sexual, atingindo o seu máximo durante a puberdade, a que se segue o período de involução do órgão. O timo parece, pois, assumir um papel importante no desenvolvimento, pois, para além de funcionar como local de diferenciação e proliferação de linfócitos T imunocompetentes, as suas células epiteliais segregam hormonas, como as timosinas e a timopoiétina, que desempenham funções

importantes na própria diferenciação celular dos linfócitos (Hall *et al.*, 1983, Healy, 1983, Geenen *et al.*, 1989, Li, 1993).

A partir da idade adulta, a diferenciação de linfócitos T e, provavelmente, a dos linfócitos B cessa e o sistema imunitário deverá passar a funcionar com clones de células até aí não utilizadas e que se encontrem acumuladas em outros tecidos linfóides periféricos (Miller, 1994, Miller, 1997).

Experiências realizadas com ratos que apresentavam sinais precoces de senescência, devido a disfunções da hipófise, mostraram que a administração de tiroxina e de hormona de crescimento corrigia os efeitos observados para o padrão de desenvolvimento normal desses animais. No entanto, não foi observado um efeito idêntico em ratos timectomizados. Tal facto levou vários autores a inferirem que o desenvolvimento animal poderá ser condicionado por interacções hormonais hipófise/timo (Burnet, 1974, Grossman, 1985, Miller, 1994).

Acredita-se, pois, que a involução do timo, associada ao declínio das hormonas tímicas circulantes, contribua para a perda do vigor imunitário e assuma um papel importante na determinação da longevidade (Burnet, 1974, Grossman, 1985, Li, 1994, Miller, 1994, Miller, 1997).

### 1.1.3. Outras concepções sobre a influência da idade nos seres vivos

As hipóteses clássicas formuladas sobre a influência da idade nos organismos vivos agrupam os factores determinantes do desenvolvimento em dois domínios grosseiros, o domínio ambiental e o domínio genético.

Os factores ambientais podem ser radiações ionizantes, aspectos nutricionais ou, até, sistemas de suporte social.



Os genes podem ser considerados como fontes de programas de envelhecimento específicos de cada espécie ou como influenciadores da longevidade. No entanto, é pouco usual que os factores genéticos e os factores ambientais sejam considerados em simultâneo, uma vez que as ciências biológicas, as ciências do comportamento e as ciências sociais têm alguma tendência para considerar estes dois domínios algo contraditórios e opostos (McClearn, 1997).

### 1.1.3.1. Modelo diferencial

McClearn, em 1997, descreveu uma aproximação ao fenómeno desenvolvimento, explicitando os dois domínios de influência, na qual pressupõe que o fenótipo observado corresponde ao resultado de factores genéticos e ambientais que influenciam a sua própria formação. Nesse modelo, é também assumido que existe um intervalo indefinidamente grande de diferenças ambientais efectivas e de sub-influências intrauterinas que, por interacções de grupo, podem conferir a muitos genes características individuais. Por outro lado, considera-se também que existe um grande número de genes com formas alélicas alternativas que são compatíveis com a vida e que condicionam o fenótipo. O suporte algébrico deste modelo, designado por modelo diferencial, foi desenvolvido no início deste século e tem-se mostrado adequado para interpretar dados empíricos da agricultura e da biologia humana (Falconer, 1989, McClearn, 1997). A relação matemática mais simples que o traduz é dada pela equação:

$$V_P = V_G + V_E$$

onde  $V_P$  representa a variância total do fenótipo,  $V_G$  a componente genética e  $V_E$  a componente ambiental da variância. A componente genética ( $V_G$ ) refere-se a diferenças

entre indivíduos cujo genótipo condiciona um fenótipo particular e abrange uma colectividade de genes que exercem influência individual sobre o fenótipo. Estes comportam-se de forma mendeliana em termos de segregação e variedade, sendo aditivos ou podendo apresentar vários graus de dominância ou recessividade. A componente ambiental ( $V_E$ ) corresponde à variância entre indivíduos resultante de impactes ambientais que se manifestam no fenótipo, mas que não estão localizados no DNA de cada indivíduo.

A partição da variância em componentes genéticos e ambientais exige uma expansão da equação inicial em vários termos, podendo tomar o aspecto:

$$V_p = V_A + V_D + V_I + V_{ES} + V_{ENS} + V_{GXE} + 2COV_{GE} + \dots$$

onde  $V_G$  se subdivide nos componentes  $V_A$  aditivo,  $V_D$  não aditivo e  $V_I$  de interacções entre genes. Para  $V_I$  temos o exemplo clássico de Coleman e Hummel (1975) que, em estudos realizados com ratos relacionados com o gene da diabetes, observaram diferentes patofisiologias dependentes da variedade animal, ou melhor, da vizinhança genética. Por outro lado, o termo ambiente pode ser subdividido em efeitos a curto-prazo e efeitos a longo-prazo ou em componentes familiares partilhados ( $V_{ES}$ ) ou não partilhados ( $V_{ENS}$ ). O termo de interacção covariância ( $COV_{GE}$ ), omitido para facilitar a apresentação inicial, contempla a correlação entre a genética e as influências do ambiente. A expressão anterior consegue, de certa forma, realçar o facto de as respostas simplistas não serem expectáveis para interpretar a influência da genética e do ambiente no desenvolvimento (Falconer, 1989, McClearn, 1997).

A influência de qualquer agente ambiental específico sobre o desenvolvimento dependerá assim de outras circunstâncias ambientais predominantes e do genótipo do

organismo sobre o qual as condições ambientais actuam. Por isso, a caracterização anatómica, bioquímica, fisiológica e imunológica, entre outras, de um dado fenótipo só pode ser considerada uma descrição da idade biológica para cada instante. Alterações neste campo podem pois ser consideradas desenvolvimento (McClearn, 1997).

### 1.1.3.2. Sistemas complexos

A idade de um organismo pode ainda ser considerada como um sistema complexo constituído por subsistemas aproximadamente separados com diferentes idades biológicas. Se tomarmos como verdadeira esta afirmação, a tentativa para caracterizar a idade biológica ou funcional de um indivíduo por uma única aproximação torna-se, de facto, muito limitada, uma vez que as restrições genéticas e ambientais podem variar substancialmente de subsistema para subsistema.

Os sistemas complexos são constituídos por uma rede de vias metabólicas interactivas que dispõem de mecanismos de compensação através dos quais um defeito ou uma menor eficácia de uma determinada via podem ser compensados pela actividade de outra. Tal compensação ocorre por retro-resposta garantindo que a informação libertada por determinado subsistema irá influenciar um subsistema anterior.

Uma resposta deste tipo constitui a base dos mecanismos de homeostase que mantêm importantes constituintes biológicos a um determinado nível “set point” ou dentro de um determinado intervalo.

A noção clássica de homeostase inclui os conceitos de homeorresis (Waddington, 1957) ou reostasis (Mrosovsky, 1990) que consideram os “set point” ou os intervalos como parâmetros que variam com o desenvolvimento e com a resposta a factores ambientais.

Os sistemas em desenvolvimento evoluem por saltos entre patamares funcionais que ocorrem presumivelmente em pontos de bifurcação metabólica.

Um sistema pode ser muito estável entre esses pontos de “bifurcação metabólica”, mas imprevisível nessas bifurcações. Esta concepção é útil e possivelmente necessária para se observar o desenvolvimento como uma sucessão de passos funcionais e não como um processo contínuo. Por esse motivo, alguns investigadores consideram mais correcto conceber o desenvolvimento como uma série de saltos funcionais múltiplos, que podem não ocorrer de forma síncrono em cada um dos “clusters” hierárquicos da idade.

Os pontos de bifurcação ou passos funcionais podem colocar uma limitação fundamental à previsibilidade ao longo da trajectória global da vida.

A estabilidade e a previsibilidade podem ser elevadas em cada patamar, mas podem ser severamente reduzidas nos períodos de transição (Simon, 1973, Warner *et al.*, 1987, Lipsitz, 1992, McClearn, 1997).

As diferenças entre um patamar funcional e o seguinte resultam da contribuição genética e ambiental que condicionam o estado do organismo entre patamares. Embora o intervalo entre patamares e a extensão dos patamares possa variar de indivíduo para indivíduo, é provável que se tornem previsíveis se os parâmetros evoluírem de forma característica ao longo da vida desse indivíduo (Lipsitz, 1992, McClearn, 1997).

Só o tempo e a acumulação empírica de dados tornarão disponíveis modelos diferenciais quantitativos ou teorias de sistemas complexos dirigidos ao desenvolvimento, que possam oferecer boas perspectivas para o esclarecimento das relações entre as várias hipóteses clássicas acerca deste, providenciando uma base para uma perspectiva teórica geral (Yates *et al.*, 1972, McClearn, 1997).

## 1.2. Biotransformação de xenobióticos

### 1.2.1. Introdução

Os seres vivos contactam diariamente com um grande e variado conjunto de moléculas quimicamente diferentes. O processamento de algumas dessas substâncias como, por exemplo, glúcidos, proteínas e lípidos, fontes nutricionais indispensáveis à sua sobrevivência, decorre por vias metabólicas específicas de biotransformação, evolutivamente aferidas ao longo dos tempos (Leader, 1991, Guengerich, 1993).

No entanto, existe outro tipo de compostos de circulação ambiental com os quais um determinado ser vivo contacta esporadicamente na vida, como alguns produtos do metabolismo secundário das plantas (Itio *et al.*, 1993, Zhang e Das, 1993, Chhabra e Rao, 1994, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996), medicamentos (Naitio *et al.*, 1994, Buetler *et al.*, 1995, e produtos industriais potencialmente tóxicos que podem também ser absorvidos (Leader, 1991).

Em geral, os compostos deste tipo, vulgarmente designados por xenobióticos, apresentam carácter lipófilo e podem ser facilmente absorvidos através da pele, pulmões, ou tracto gastro-intestinal e excretados pela urina, bÍlis, fezes, ar expirado ou transpiração.

Embora, em alguns casos, a sua excreção possa ocorrer sem que lhes seja efectuada qualquer modificação química, o mais vulgar é necessitarem de ser previamente biotransformados em compostos mais polares, tendo em conta que o carácter lipófilo que apresentam facilita a sua reabsorção a partir dos fluidos excretórios (Feffrey, 1991).

Por este motivo, os xenobióticos com carácter apolar que não sejam eficazmente reconhecidos e modificados pelos sistemas de biotransformação podem acumular-se nos organismos, uma vez que são facilmente absorvidos e dificilmente excretados (Guengerich, 1993, Meyer, 1996).

Os produtos das reacções de biotransformação são, em geral, compostos quimicamente distintos das moléculas que lhes deram origem, facilmente excretáveis pelas vias urinária, biliar e fecal e de difícil distribuição pelos vários tecidos pois, devido à sua hidrofilicidade, não difundem facilmente através das membranas biológicas (Kyle e Farber, 1991, Sipes e Gandolfi, 1991, Guengerich, 1993, Woodhouse e Wymel, 1992, Meyer, 1996).

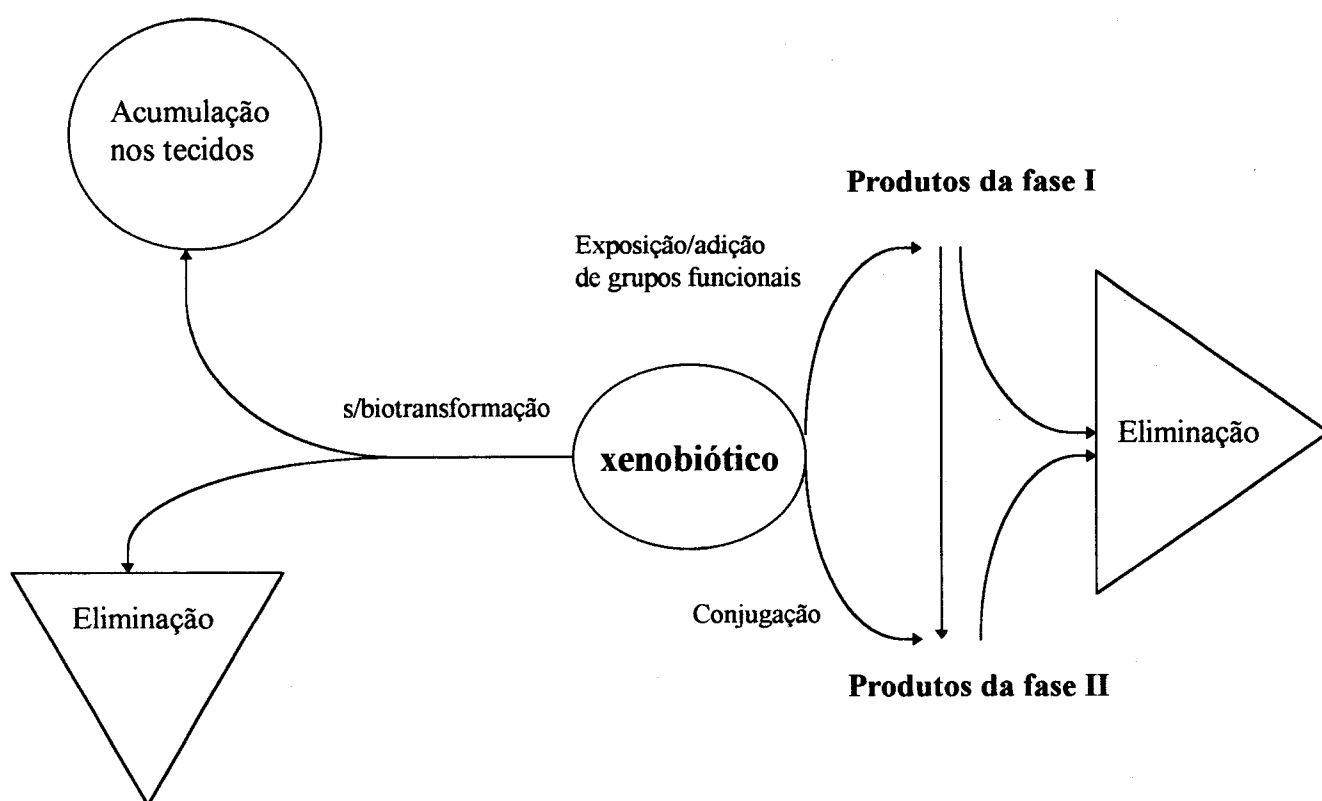
### 1.2.2. Reacções de biotransformação - Fase I e Fase II

A conversão enzimática de compostos lipossolúveis em compostos mais polares pode dar-se através de um conjunto variado de reacções pertencentes a duas etapas reaccionais vulgarmente referidas como primeira e segunda fase de biotransformação (Sipes e Gandolfi, 1991, Smith *et al*, 1996).

A primeira fase de biotransformação ou fase I, compreende um conjunto de reacções de oxidação, de redução e de hidrólise que levam à formação de derivados metabólicos mais polares com grupos funcionais, como o hidroxilo, sulfidriolo, amina e carboxilo, disponíveis para participarem noutros processos metabólicos ou para, eventualmente, serem excretados (Sipes e Gandolfi, 1991, Smith *et al*, 1996, Meyer, 1996).

A segunda fase de biotransformação ou fase II, compreende um conjunto de reacções de conjugação do composto lipossolúvel ou de um seu derivado, produzido na

primeira fase, com um cofactor endógeno. Nestes casos, a molécula endógena, que poderá ser, por exemplo, o ácido glucurónico, o ião sulfato ou o tripéptido glutationo, conferem ao xenobiótico lipófilo ou ao seu derivado metabólico uma elevada solubilidade em água bem como capacidade acrescida para sofrer uma ionização significativa a valores de pH fisiológicos (Sipes e Gandolfi, 1991, Wilce e Parker, 1994, Gulick e Fahl, 1995, Smith, 1996).



**Figura 1.2** Destinos que um xenobiótico pode seguir depois de penetrar num organismo vivo ( adaptado de Sipes e Gandolfi, 1991).

A biotransformação de um xenobiótico é um processo integrado e, por vezes, complexo. O destino metabólico de um composto em particular é, obviamente

condicionado por factores como as suas propriedades físico-químicas, a dose de exposição ou a via de penetração no organismo vivo (Leader, 1991 Sipes e Gandolfi, 1991).

Na figura 1.2, pretendemos representar de forma sucinta alguns dos destinos possíveis que um composto lipossolúvel exógeno pode tomar quando penetra num organismo vivo.

Assim, o percurso aparentemente mais simples corresponde à eliminação ou à acumulação do composto sem que este tenha sofrido qualquer modificação química. Por vezes, esta situação ocorre com compostos orgânicos voláteis que podem ser eliminados pelos pulmões sem sofrerem qualquer biotransformação (Sipes e Gandolfi, 1991).

No entanto, os xenobióticos são, na maior parte dos casos, quimicamente modificados podendo então passar pelas duas fases de biotransformação ou só por uma delas, como é o caso de serem directamente conjugados com o cofactor endógeno sem passarem pela primeira fase.

Tendo em conta tão elevada complexidade e as diferenças existentes entre as reacções da primeira fase e as reacções da segunda fase de biotransformação, é possível que pequenos desvios metabólicos relacionados, por exemplo, com a dose ou o estágio do desenvolvimento do ser vivo possam desencadear danos químicos neste com importância elevada sob o ponto de vista toxicológico (Kyle e Farber, 1991, Woodhouse e Wyne, 1992, Smith *et al.*, 1996).

### 1.2.3. Órgãos onde ocorrem as reacções de biotransformação

Os sistemas enzimáticos que participam na biotransformação de xenobióticos estão, como seria de esperar, maioritariamente localizados no fígado, uma vez que a



principal função deste órgão é receber e processar os compostos químicos absorvidos pelo tracto intestinal antes que sejam distribuídos pelos outros tecidos.

Outros órgãos como os pulmões, rins, testículos e intestinos também apresentam capacidade para metabolizar compostos lipófilos exógenos, mas com especificidade e valores de actividade enzimática inferiores à do fígado (Jeffrey, 1991, Sipes e Gandolfi, 1991). Por esse motivo, a contribuição dos tecidos extra-hepáticos para a biotransformação global de xenobióticos é limitada. No entanto, a biotransformação de um composto químico num tecido extra-hepático pode assumir um papel específico e importante do ponto de vista toxicológico.

#### 1.2.4. Localização celular dos sistemas de biotransformação em eucariotas

Os enzimas que participam na primeira fase de biotransformação estão localizados maioritariamente no retículo endoplasmático, sendo por esse motivo designados por enzimas de membrana (Guengerich, 1995, Meyer, 1996).

A localização enzimática na matriz lipoproteica do retículo constitui um factor extremamente importante para o desencadear desse tipo de reacções, uma vez que os substratos lipófilos distribuem-se parcialmente pelas membranas lipídicas (Jeffrey, 1991, Guengerich, 1995, Meyer, 1996).

A obtenção da fracção celular rica neste tipo de enzimas passa pela preparação de um homogeneizado do tecido com o rompimento do retículo endoplasmático e formação, a partir dos fragmentos lipoproteicos, de microvesículas designadas na literatura por microssomas ou fracção microssomal.

A fracção microsomal pode ser posteriormente obtida a partir do homogeneizado por centrifugação diferencial. Uma primeira centrifugação a 10000 g sedimenta núcleos, mitocôndrios, lisossomas, células não rebentadas e outro tipo de fragmentos celulares, enquanto que posterior centrifugação do sobrenadante remanescente a 105000 g leva à obtenção de um sedimento muito rico em fracção microsomal.

O sobrenadante resultante deste último passo de centrifugação, vulgarmente designado por citosol, possui a maior parte dos enzimas da segunda fase de biotransformação (Dannenber *et al*, 1993, Sipes e Gendolfi, 1991).

#### 1.2.5. Desintoxicação-bioactivação

Os sistemas enzimáticos que participam na fase I e na fase II de biotransformação têm sido considerados como enzimas de desintoxicação uma vez que na maior parte dos casos, convertem os xenobióticos em compostos facilmente excretáveis.

Todavia, a biotransformação nem sempre pode ser intrinsecamente relacionada com processos de desintoxicação, pois existem exemplos de produtos resultantes da biotransformação que são mais tóxicos do que os compostos que lhes deram origem, como acontece com alguns compostos pró-cancerígenos, como as aflotoxinas B1, os etilcarbamatos e as arilaminas do fumo do tabaco que exercem os seus efeitos genotóxicos ou iniciam processos de cancerização nos órgãos alvo (Guengerich *et al.*, 1994, Gulick e Fahl, 1995, Douton, 1995).

Em alguns dos casos estudados, já se conseguiram isolar e identificar os derivados metabólicos responsáveis pela agressão celular, mas noutras situações formam-se intermediários reaccionais extremamente agressivos e com um tempo de

meia-vida muito curto que não permite o seu isolamento (Gulick e Fahl, 1995, Meyer e Zangar, 1997).

O termo intoxicação ou bioativação é muitas vezes utilizado para designar a formação desses intermediários reactivos que são capazes de desencadear agressões moleculares que levam à morte celular, ou de induzir quimicamente o cancro, a teratogénese e outros processos de toxicidade (Sipes e Gendolfi, 1991, Guengerich *et al*, 1994, Gulick e Fahl, 1995, Douton, 1995).

#### 1.2.6. Caracterização da biotransformação

A descrição dos processos de biotransformação torna-se mais fácil quando caracterizamos os sistemas de biotransformação separadamente. Por esse motivo, nas secções 1.3, 1.4 e 1.5 serão discutidos com maior pormenor aspectos fundamentais de alguns desses sistemas, como sejam a natureza e o mecanismo geral da reacção, os cofactores envolvidos, a localização subcelular e a importância de alguns enzimas nos processos de desintoxicação/bioativação.

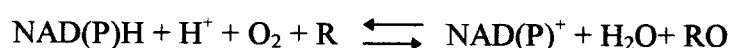
Contudo, convém ter sempre presente que a biotransformação de um determinado xenobiótico por um determinado organismo decorre com a participação de uma grande variedade de enzimas e num determinado instante da sua vida. Como tal, a sua interpretação constitui sempre uma aproximação integrada do problema.

Por outro lado, existem vários factores que afectam os sistemas de biotransformação como por exemplo, os estados nutricionais (Murray *et al*, 1987, Toskulkao *et al*, 1994) e de saúde do organismo (Biro-Sauveur *et al*, 1994, Paitaud *et al*, 1996) o sexo (Kato, 1986, Li *et al*, 1993, Zarida, 1993) ou o estágio de desenvolvimento (Yu, 1996).

## 1.3. Sistema citocromo P450

### 1.3.1. Perspectiva histórica

O sistema citocromo P450 foi descoberto na primeira metade do século XX, quando se estudavam reacções pouco conhecidas que utilizavam o oxigénio molecular como substrato. Foi observado, então, que durante o processo um dos átomos do oxigénio molecular se combinava com dois átomos de hidrogénio provenientes de duas moléculas de NAD(P)H para formar água, enquanto que o segundo átomo de oxigénio era incorporado num substrato orgânico denotado por “R”, a molécula sobre a qual o enzima actuava, de acordo com a estequiometria:



Estas reacções designadas na época por “monooxigenases de função mista” participavam activamente no metabolismo de compostos químicos como drogas, esteróides e fitofármacos (Gonzalez, 1989, Guengerich, 1991).

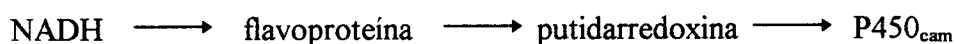
Reacções deste tipo foram detectadas em pequenas vesículas derivadas do retículo endoplásmico liso do fígado, obtidas após rebenamento celular por homogeneização e sucessivos passos de centrifugação, que apresentavam uma grande multiplicidade dessas reacções “de função mista”, facto este que permitiu atribuir aos hepatócitos um papel crucial neste processo metabólico (Ortiz de Montellano, 1986, Guengerich, 1993).

O primeiro passo de identificação dos componentes microssomais do sistema coincidiu com a descoberta de uma hemoproteína capaz de se ligar ao monóxido de

carbono e formar um cromóforo cujo espectro de absorção apresentava um máximo característico a 450 nm (Omura e Sato, 1964a).

Sato, na Universidade de Osaka, e Estabrook, na Universidade da Pensilvânia, descobriram que esta proteína se comportava como um constituinte terminal de uma cadeia de transporte de electrões que catalisava a oxidação de vários substratos. Sato, tendo em conta as propriedades espectrais desta proteína, denominou-a citocromo P450 (Omura e Sato, 1964a,b; Estabrook, 1963).

Grunsalus, da Universidade do Illinois, descobriu que a bactéria *Pseudomonas putida* era capaz de crescer num meio cuja única fonte de carbono era a cânfora devido ao facto de apresentar níveis elevados de oxidases de função mista e que a adição do grupo hidroxilo à molécula de cânfora, passo inicial da sua biotransformação, exigia a participação de uma flavoproteína, de uma proteína contendo fenol e enxofre, designada por putidarredoxina, e de um citocromo P450 que designou por P450<sub>cam</sub>. Este investigador também descobriu que essas proteínas faziam parte de uma cadeia de transporte de electrões que iniciava na forma reduzida do NADH, passava pela flavoproteína e pela putidarredoxina e terminava no citocromo P450, de acordo com a sequência de passos (Sligar e Murray, 1986; Fulco, 1991):



Na mesma época, Minor, Coon e Lu, da Universidade do Michigan, só conseguiram identificar na fracção microssomal de fígado de coelho dois tipos de proteínas envolvidas na cadeia de transporte de electrões das oxidases de função mista.

Observaram, então, que a manifestação dessas actividades enzimáticas requeria a presença de fosfolípidos e que a cadeia de transporte de electrões iniciava no NADPH, passava por uma flavoproteína e terminava num citocromo P450, de acordo com a sequência de passos:



Estudos posteriores realizados com *mitocondria* de eucariotas demonstraram a existência de uma via semelhante à que ocorre na bactéria *Pseudomonas putida* em que a adenorredoxina, uma proteína com ferro e enxofre, substitui a putidarredoxina no seu papel (Vermillion e Coon, 1978, Guengerich, 1993).

Nebert *et al.* (1989) propuseram pela primeira vez uma classificação sistemática dos citocromo P450 agrupando-os por famílias e subfamílias homólogas, de acordo com a análise sequencial dos respectivos cDNA. Esse sistema de classificação constituiu a base para o desenvolvimento de uma nomenclatura consensual que foi revista e actualizada por Nebert, *et al.* em 1991 e por Nelson *et al.* em 1993 e em 1996.

### 1.3.2. Papel biológico

Existem duas correntes de opinião acerca do papel biológico desempenhado pelo sistema citocromo P450, uma que admite o seu envolvimento no metabolismo de compostos endógenos e outra que lhe atribui como principal função a remoção de xenobióticos do organismo participando no amplo conjunto de reacções da primeira fase de biotransformação. Em alguns casos, parece que o mesmo papel depende de um único tipo de isoenzima. No entanto, na maior parte dos casos, parece existir especificidade



funcional para cada isoenzima P450 do sistema (Sipes e Gandolfi, 1991; Nelson, 1993 Yamazaki *et al.*, 1996, Kroetz, *et al.*, 1997).

A resposta a um xenobiótico depende da quantidade e do tipo de citocromos P450 activos no organismo.

Alguns seres vivos da mesma espécie não expressam um determinado tipo de isoenzimas ou fazem-no em pequena quantidade. Por esse motivo, não conseguem eliminar a substância acumulando-a com consequências gravosas para a sua sobrevivência (Mahgoub *et al.*, 1977, Eichelbaum *et al.*, 1979, Daly, 1994).

A descoberta do isoenzima CYP2D6, por Robert Smith no St. Mary's Hospital Medical School, em Londres, ocorreu quando este investigador, ao participar como voluntário num ensaio sobre a acção do fármaco hipotensor debrisoquina, ficou gravemente doente devido ao efeito exagerado produzido pelo medicamento (Mahgoub *et al.* 1977).

Na mesma época, um ensaio realizado em Bona com o anti-histamínico esparteína produziu um efeito toxicológico idêntico (Eichelbaum *et al.*, 1979). Estudos efectuados posteriormente sobre o metabolismo dos fármacos debrisoquina e esparteína demonstraram que o isoenzima CYP2D6 estava fortemente envolvido na sua metabolização e eliminação, e que as pessoas nas quais a toxicidade ocorreu não o tinham expresso. Hoje sabe-se que cerca de 7% da população caucasiana não o possui (Krolmer e Eichelbaum, 1995, Griese *et al.*, 1998).

O sistema citocromo P450 pode também participar activamente no processamento de compostos procancerígenos, uma vez que o aparecimento de tumores depende, muitas vezes, da presença ou da ausência de um determinado isoenzima.

As carnes grelhadas e o fumo do tabaco, por exemplo, possuem compostos aminados heterocíclicos derivados de glúcidos e de resíduos de aminoácidos endógenos que podem manifestar propriedades cancerígenas quando activados pelo CYP1A2 humano que, ao torná-los mais electrófilos ou quimicamente mais reactivos, facilita a sua ligação covalente ao DNA e a ocorrência de mutações (Nelson *et al.*, 1993, Daly *et al.*, 1994, Rannio *et al.*, 1995, Yamazaki *et al.*, 1996).

Para além da modificação química dos xenobióticos, o sistema citocromo P450 participa ainda na hidroxilação de esteróides (Kato *et al.*, 1986, Shimada *et al.*, 1987, Sugimoto, *et al.*, 1990; Kroetz, *et al.*, 1997; Bylund *et al.*, 1998), ácidos biliares, algumas vitaminas e seus derivados, biossíntese de alcalóides endógenos, como a codeína e a morfina (Sipes, e Gandolfi, 1991), biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidónico (Zeldin *et al.*, 1996, Kroetz, *et al.*, 1997) e biossíntese do óxido nítrico (Masters *et al.*, 1996).

A biossíntese dos eicosanóides, como as prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclínas, decorre por um mecanismo diferente daquele que se observa nas usuais reacções oxidativas de função mista, uma vez que não requerem a transferência de equivalentes redutores nem o oxigénio molecular como co-substrato, ocorrendo somente rearranjos internos de precursores das prostaglandinas (Guengerich, 1993).

No entanto, a biossíntese de outros eicosanóides menos conhecidos como os epoxieicosatrienos, que actuam ao nível da bomba sódio-potássio, da absorção de água e do mecanismo de vasoconstrição no rim, ou da produção do óxido nítrico, gás que actua como neurotransmissor na regulação da pressão sanguínea no tecido cerebral e como toxina contra agentes patogénicos nos macrófagos, decorre pela reacção de oxidação comum do sistema citocromo P450 (Guengerich, 1993, Masters *et al.*, 1996).



### 1.3.3.Orgãos e localização celular em mamíferos

Os enzimas que constituem o sistema citocromo P450 estão localizados maioritariamente no retículo endoplásmico (Jeffrey, 1991, Guengerich, 1995, Meyer, 1996).

O fígado é o órgão onde os citocromo P450 são expressos em maior quantidade e diversidade. No entanto, estas enzimas expressam-se também noutros tecidos como os rins, testículos, ovários e glândulas supra-renais onde desempenham, por vezes, funções especializadas. (Jeffrey, 1991, Sipes, 1991, Meyer, 1996).

### 1.3.4.Ciclo catalítico

O mecanismo das reacções catalisadas pelo sistema citocromo P450 foi parcialmente esclarecido a partir de estudos de caracterização estrutural de isoenzimas particulares.

Os trabalhos desenvolvidos com o sistema P450 de eucariotas têm sido pouco frutuosos uma vez que as propriedades agregativas que são conferidas aos citocromo P450, pelo carácter hidrófobo das membranas do retículo endoplásmico, impedem a formação de cristais distintos dessas proteínas (Sipes e Gandolfi, 1991).

Como nas bactérias, alguns citocromo P450 não se encontram ligados a membranas, a sua cristalização pode ser conseguida em maior quantidade e com maior facilidade.

A cristalização do citocromo P450 CI bacteriano, vulgarmente designado por P450cam, conseguida por Poulos, da Universidade da Califórnia, facilitou a aquisição de

conhecimentos importantes acerca do sistema citocromo P450 e do mecanismo da reacção em que participa (Poulos, 1988).

O passo inicial do ciclo reaccional envolve a ligação do substrato RH ao átomo férrico do hemo, com a formação de um complexo substrato-citocromo P450 (1), e redução do ferro ao estado ferroso, por transferência de um electrão do cofactor NADPH mediada pelo enzima NADPH P450 reductase (2) (Mckee e Mckee, 1996, Lohr *et al.*, 1998).

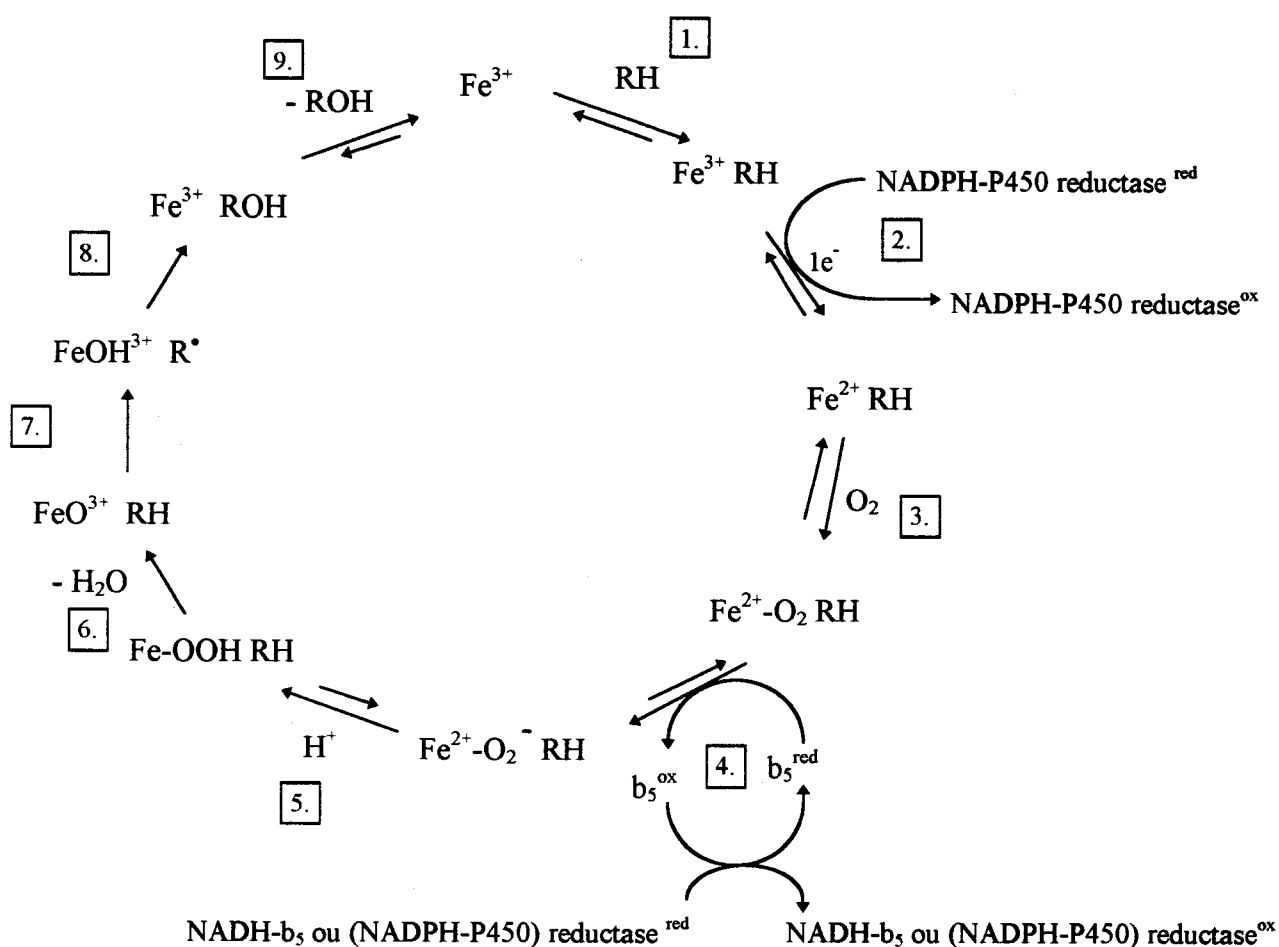


Figura 1.3 Ciclo catalítico do sistema citocromo P450 (Sipes e Gandolfi, 1991 e Yamazaki, 1996)

A forma ferrosa do citocromo P450 combina-se então com o oxigénio molecular (3), que aceita um segundo electrão e um protão provenientes do cofactor NADPH, via

NADPH (P450) redutase e citocromo b<sub>5</sub>, ou do cofactor NADH via NADH b<sub>5</sub> redutase e citocromo b<sub>5</sub> (4, 5) (Sipes e Gandolfi, 1991, Shen e Kasper, 1996, Yamazaki *et al.*, 1996, Bridges *et al.*, 1998).

Posteriormente dá-se a transferência dos dois electrões para o oxigénio por uma série de passos pouco conhecidos. Um dos átomos de oxigénio é libertado sob a forma de água e o outro é incorporado no substrato com a formação do complexo (FeO)<sup>3+</sup> (6).

Após a oxidação directa do substrato pelo complexo (FeO)<sup>3+</sup> o produto formado desliga-se do citocromo P450 (7, 8), deixando-o regenerado na sua forma oxidada (9).

O monóxido de carbono constitui um forte inibidor das reacções catalisadas pelos citocromo P450 pois compete com o oxigénio molecular na ligação à forma enzimática reduzida. (Sipes *et al.*, 1991, Mckee e Mckee, 1996, Lohr *et al.*, 1998).

### 1.3.5. Enzimas NADPH (P450) redutase

As reacções catalisadas pelos citocromo P450 microsossomais exigem a transferência de electrões do NADPH para os citocromo P450 mediada pelos enzimas NADPH (P450) redutase (Taniguchi *et al.*, 1984, Shen, e Kasper, 1995, Okita e Masters, 1997; Lohr *et al.*, 1998).

Os enzimas NADPH (P450) redutase é uma flavoproteína com massa molecular de aproximadamente 78 kDa, 1 mol de FAD e 1 mol de FMN por mol de proteína, onde o dinucleótido de flavina funciona como aceitador de electrões e o mononucleótido de flavina como doador de electrões (Vermillion e Coon, 1978, Gum e Strobel, 1979, Wang *et al.*, 1997). A proteína possui um domínio catalítico polar e um domínio hidrófobo ligado à membrana pelo aminoácido terminal. O domínio ligado à membrana corresponde aos primeiros 55-60 aminoácidos da região N-terminal (Gum e Strobel, 1981).

Black *et al.* (1979, 1982) observaram que o enzima perdia a sua capacidade para reduzir os citocromo P450 quando lhe era removido o domínio hidrófobo, apesar de conservar essa capacidade para o citocromo c ou para o ferricianeto, o que levou os autores a suporem um papel importante desempenhado por esse domínio na interacção citocromo P450-NADPH (P450) redutase.

É provável que o enzima NADPH (P450) redutase também seja capaz de estabelecer interacções electrostáticas com os P450 por emparelhamento de resíduos de aminoácidos com carga oposta. No entanto, esta opinião não é unânime entre todos os investigadores, pois Voznesenski e Schenkman (1992) observaram que os grupos carregados do enzima NADPH (P450) redutase e dos citocromo P450 podiam contribuir para a perda de estabilidade do complexo de transferência de electrões devido a repulsão de cargas.

### 1.3.6. Enzimas citocromo P450

#### 1.3.6.1. Caracterização estrutural

Os citocromo P450 são hemotiolatoproteínas constituídas por um meio hemoprotoporfirínico IX ligado a uma única cadeia polipeptídica de massa molecular entre 45 e 55 kDa (Guengerich, 1993, Nelson *et al.* 1993).

O átomo de ferro do grupo prostético hemo está localizado no centro do anel protoporfirínico onde se estabelecem ligações de coordenação entre o átomo de ferro e o anel porfirínico.

A quinta ligação de coordenação, axial, é ocupada pelo anião tiolato do resíduo cisteínil da apoproteína que estabelece a ligação entre o grupo prostético e a cadeia polipeptídica.

A sexta posição de coordenação poderá estar ocupada por um grupo hidroxilo de um resíduo de aminoácido ou um ambiente com força de campo similar, tal como o que pode ser gerado pela presença de uma molécula de água (Guengerich e Martin, 1980).

No citocromo P450, o átomo de ferro pode existir em dois estados de spin diferentes, o estado  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{LS}}$  com um valor líquido de spin igual a 1/2, onde os cinco electrões das orbitais 3d se apresentam com emparelhamento máximo, e o estado  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{HS}}$ , com um valor líquido de spin igual a 5/2, onde os cinco electrões das orbitais 3d se encontram totalmente desemparelhados.

A interacção do substrato com o P450 pode induzir um desvio do equilíbrio de spin, que pode ser acompanhado espectrofotometricamente, uma vez que, os dois estados de spin possuem máximos de absorção diferentes (Shenkman *et al*, 1982).

Por exemplo, um desvio  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{LS}} \longrightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{HS}}$  designado por interacção do tipo I, corresponde a uma interacção entre o substrato hidrófobo e a apoproteína, enquanto que um desvio  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{HS}} \longrightarrow \text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{LS}}$  é designado por interacção do tipo II (Shenkman *et al*, 1982).

O ferro no estado fundamental encontra-se predominantemente como  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{LS}}$  e possui provavelmente uma molécula de água a actuar como sexto ligando de coordenação.

Como a maioria dos substratos dos citocromo P450 possuem carácter hidrófobo, a sua ligação à proteína desloca a água e expõe o ferro férrico para fora do plano do anel porfirínico, o que implica uma redistribuição electrónica nos orbitais 3d do átomo de

ferro que favorece a forma  $\text{Fe}^{3+}$  P450<sub>HS</sub> (Shenkman *et al*, 1982; Lewis *et al*, 1989; Williams, 1992). Em qualquer dos complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -P450<sub>LS</sub> e  $\text{Fe}^{3+}$  P450<sub>HS</sub>, o ligando proximal tiolato permanece ligado ao átomo de ferro férrico.

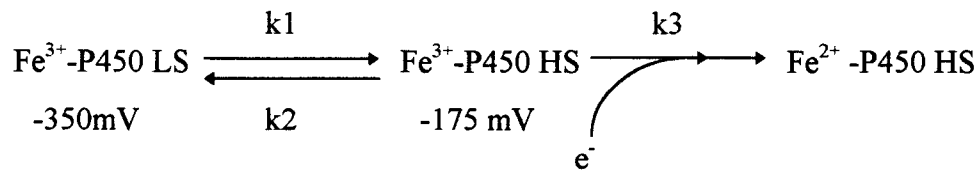
A maior parte dos actuais conhecimentos acerca da estrutura dos citocromo P450 foram obtidos a partir de estudos realizados com enzimas bacterianos como, por exemplo, o PCI (P450<sub>cam</sub> ou P450 101) de algumas estirpes de *Pseudomonas putida*.

A estrutura cristalina obtida por difracção de raio X demonstrou que a proteína P450 CI possui um domínio pobre em hélices  $\alpha$  constituído por estruturas  $\beta$  antiparalelas,  $\beta_1$  e  $\beta_5$ , e um domínio rico em hélices  $\alpha$  que compreende cerca de metade dos resíduos de aminoácidos divididos por 13 segmentos de hélices diferentes (de A a C9) A estrutura cristalina do P450 CI revelou, ainda, que o hemo está embebido na apoproteína entre as hélices I e C e as cadeias  $\beta_3$ . A hélice L situa-se por abaixo do plano do hemo e contém a cisteína (Cys357) e o ligando tiolato (Poulos, 1988).

#### 1.3.6.2. Interacção NADPH (P450) redutase-citocromo P450

Alguns investigadores têm procurado compreender o mecanismo de transferência de electrões do NADPH para os citocromo P450 mediado pelo enzima NADPH (P450) redutase, assim como o tipo de interacção funcional que as proteínas envolvidas no processo podem estabelecer, tendo em conta a proporção estequiométrica (20:1) de citocromo P450 relativamente a NADPH citocromo P450 redutase determinada em microsomas hepáticos (Shepard *et al*, 1983).

A redução bifásica das hemoproteínas P450 parece ser regulada pelo equilíbrio entre o estado de baixo spin  $\text{Fe}^{3+}$ -P450<sub>LS</sub> e o estado de spin elevado  $\text{Fe}^{3+}$ -P450<sub>HS</sub> do grupo prostético que pode ser traduzido pela  $K_{eq} = k_1/k_2$  da representação:



De acordo com este modelo, a transferência de electrões do NADPH com um potencial redox de -365 mV para a configuração de spin elevado  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{HS}}$  com um potencial redox de -175 mV é termodinamicamente mais favorável do que para a configuração de baixo spin  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{LS}}$  cujo potencial redox é de aproximadamente -350 mV (Schenkman e Gibson, 1981; Tamburini *et al.*, 1984, Backes *et al.*, 1982, 1985, Goeptar, 1995).

Os substratos com capacidade para desviar o equilíbrio de spin para a configuração HS, designados por substratos do tipo I, podem aumentar a taxa inicial e a extensão do fluxo de electrões para o P450 (Schenkman e Gibson, 1981).

Vários modelos foram propostos para explicar a interacção NADPH citocromo (P450) redutase-citocromo P450.

Franklin e Estabrook (1971) defenderam um arranjo rígido entre o enzima NADPH (P450) redutase e um “cluster” de vários citocromo P450. No entanto, Yang (1975) optou por admitir a ocorrência de colisões aleatórias entre o enzima NADPH (P450) redutase e os citocromo P450.

Peterson *et al.* (1976) defenderam a existência de um “cluster” de citocromo P450 agrupado em torno da molécula de NADPH P450 redutase mas circundado por P450 satélites onde ocorreriam duas fases de transferência de electrões, a rápida, correspondente à redução do “cluster” de citocromo P450, e a lenta, correspondente à redução dos citocromo P450 satélites.

Gut *et al* (1983) defenderam a existência de um complexo monomolecular NADPH (P450) redutase-citocromo P450, considerando que estudos cinéticos de redução de P450 e de hidroxilação de substratos por eles realizados em sistemas reconstituídos com quantidades equimolares de NADPH (P450) redutase e de citocromo P450 mostraram que a proteína com actividade NADPH (P450) redutase apresentava mobilidade rotacional.

Backes e Eyer (1989) propuseram, entretanto, outro modelo para o mecanismo cinético de redução dos citocromo P450 pelo enzima NADPH (P450) redutase onde, neste caso o CYP2B4, pode apresentar dois arranjos conformacionais relativamente ao enzima NADPH (P450) redutase. No complexo competente, os electrões são facilmente transferidos do enzima NADPH (P450) redutase para o P450, mas no outro arranjo conformacional, apesar de o citocromo P450 não perder a sua capacidade para se ligar ao NADPH (P450) redutase, a transferência de electrões é mais lenta.

A ligação do substrato ao P450 pode, no entanto, aumentar a taxa de associação e a afinidade do complexo NADPH (P450) redutase-citocromo P450 e, conseqüentemente, a eficiência do fluxo de electrões. Este aspecto foi confirmado posteriormente para os CYP2B1 e CYP2B2 (Eyer e Backes, 1992, Goepfert, 1995).

### 1.3.6.3. Reacções

#### 1.3.6.3.1. Reacções de oxidação

O metabolismo oxidativo em que os citocromo P450 participam é, em geral, bem conhecido. A figura 1.4 resume algumas reacções importantes como a hidroxilação alifática (a) e aromática (b), a epoxidação de alcenos (c), as reacções de *N*-, *O*- ou *S*-



desalquilação (d), de desaminação (e), de oxidação do azoto (f) e do enxofre (g), de dessulfuração (h) e de desalogenação (i) (Sipes e Gandolfi, 1991, Mckee e Mckee, 1996, Okita, e Masters, 1997, Lohr *et al.*, 1998).

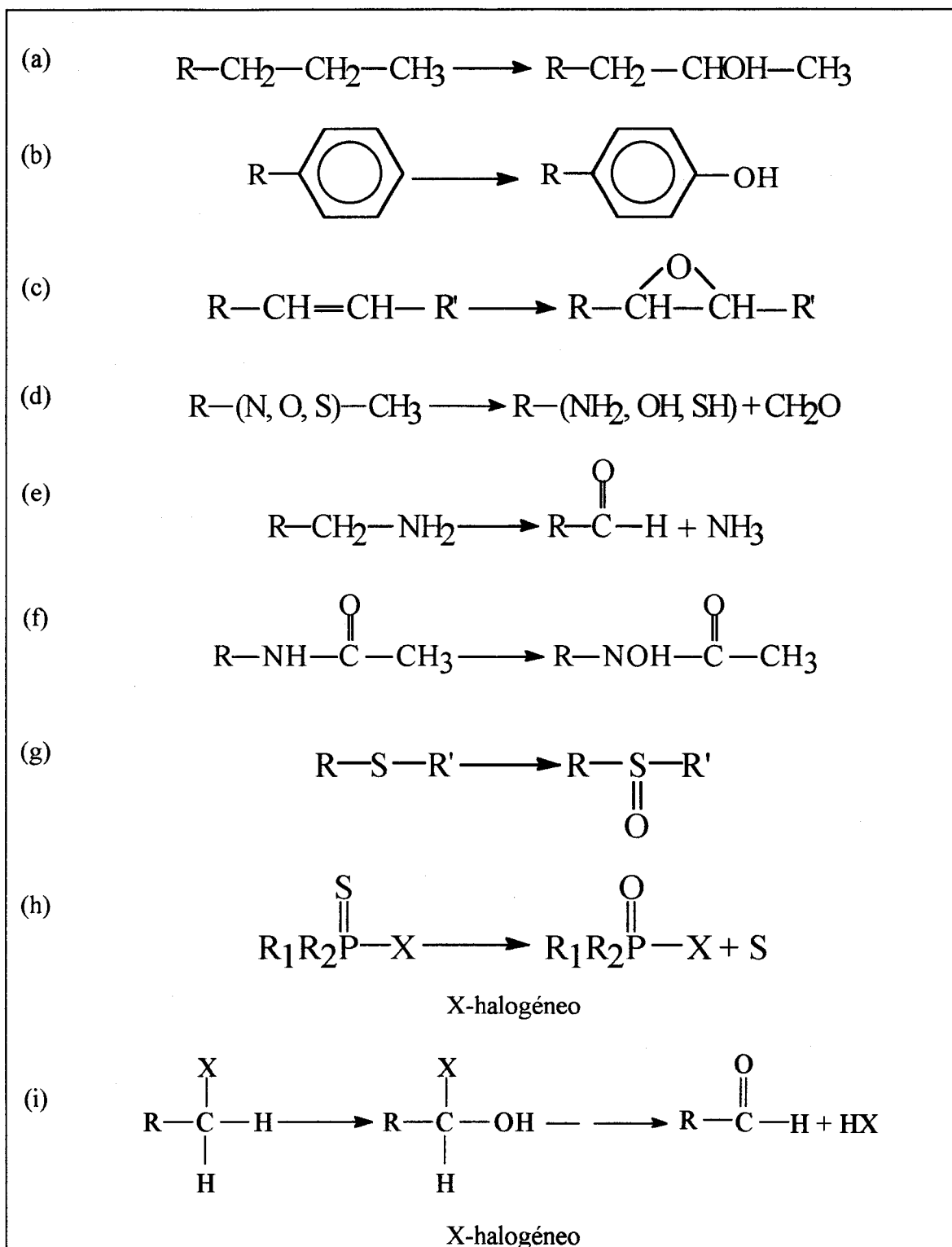


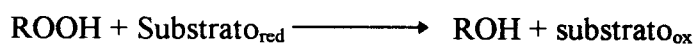
Figura 1.4 Algumas reacções de oxidação em que os citocromo P450 participam.

### 1.3.6.3.2. Reacções de peroxidação

Os citocromo P450 são capazes de utilizar peróxidos e perácidos, como o hidroperóxido de cumeno e o *t*-butil-hidroperóxido, para suportar reacções de hidroxilação alifática, de *N*- e *O*-desalquilação e de epoxidação de alcenos (Kadlubar, 1973, Rahimtula e O'Brien, 1974, White e Coon, 1980).

Embora a maior parte das reacções de biotransformação necessitem de cofactores como o NADPH e ou o NADH, a co-oxidação de substratos acoplada à redução do peróxido de hidrogénio e de hidroperóxidos lipídicos constitui uma excepção importante.

Parece que este tipo de reacções exige disponibilidade celular de hidroperóxidos, e ocorre em tecidos capazes de manter um ambiente oxidante com actividade peroxidase elevada. Por exemplo, a bexiga (a), a medula renal interna (b) e a pele (c), assim como o epitélio da glândula mamária (d) e os leucócitos (e), possuem enzimas com actividade prostaglandina sintetase-hidroperoxidase (PGS) (a,b,c), lactoperoxidase (d) e mieloperoxidase (e) que catalisam uma reacção comum onde a redução de um hidroperóxido está acoplada à oxidação de um co-substrato e que pode ser descrita pela equação:



O mecanismo de reacção idêntico de cada uma das actividades peroxidase atrás referidas passa pela redução de um hidroperóxido com a formação de um composto intermediário oxidado que reage com substratos, radicalares ou não, para formar dois outros produtos oxidados. Esta via secundária de redução sequencial do O<sub>2</sub> é, muitas vezes, referida como desvio peróxido, pois estudos realizados com <sup>18</sup>O mostraram, de facto, que o átomo de oxigénio incorporado nos substratos deriva de um peróxido.

A ruptura da ligação O-O depende da capacidade da ligação cisteína-hemo para doar densidade electrónica ao sistema peroxoférrico (Groves e Watanabe, 1988).

O intermediário oxidado também é capaz de catalisar reacções de *N*-desmetilação por uma oxidação monoelectrónica inicial de um azoto amina de um radical catiónico aminium (Rahimtula e O'Brien, 1974).

A desprotonação subsequente do radical catiónico aminium seguida da recombinação com o radical hidroxilo ligado ao ferro do hemo dá uma carbinolamida instável, que se decompõe em metanal e numa amina secundária (Groves e Watanabe, 1988).

#### 1.3.6.3.3 Reacções de redução

Embora os citocromo P450 microsossomais sejam classificados como oxigenases, algumas reacções de biotransformação de xenobióticos seguem um mecanismo de redução. As primeiras publicações acerca desse tipo de reacções referem-se à sua ocorrência em condições de baixa pressão parcial de oxigénio. De facto, nesses casos, o substrato em vez de aceitar o oxigénio molecular torna-se o aceitador dos equivalentes redutores dos citocromo P450 ficando reduzido. Os casos mais bem documentados de reacções de redução mediadas pelos citocromo P450 em condições anaeróbias envolvem a participação de alcanos halogenados. No entanto, em condições aeróbias, os citocromo P450 também podem comportar-se como mediadores de reacções de redução monoelectrónicas do O<sub>2</sub> manifestando uma actividade designada por oxigeno-redutase.

A formação espontânea de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> na presença de xenobióticos devido à actividade oxigeno-redutase dos citocromo P450 é atribuída à capacidade do complexo [Fe<sup>3+</sup>-P450][O<sub>2</sub>] para se auto-oxidar. Quando a taxa de redução do sistema citocromo P450 é

superior ao “turnover” de oxigenação do xenobiótico, o complexo  $[\text{Fe}^{3+}\text{-P450}][\text{O}_2]$  poderá acumular-se durante o metabolismo do estado estacionário e, conseqüentemente, levar à formação de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Os enzimas CYP2B e CYP2E1 apresentam uma elevada actividade oxigeno-redutase. Devido á formação de espécies radiculares de oxigénio como subprodutos deste tipo de reacções, alguns investigadores admitem que os CYP2E1 desempenham um papel importante na patogénese de algumas desordens hepáticas, em particular nas doenças de fígado alcoólico (Koop, 1992).

A acetona e outras cetonas comportam-se como indutores potentes dos CYP2E1 e contribuem, pelo menos, para o aumento do nível destas proteínas em ratos após a sua ingestão (Hong *et al.*, 1987).

Os compostos que sofrem redução pelos P450 possuem poucas semelhanças estruturais. O mecanismo molecular preciso que descreve as interacções que desencadeiam a actividade redutase dos P450 ainda estão pouco esclarecidos, devido à estrutura tridimensional dos citocromos P450 de eucariotas não ser conhecida (Koymans *et al.*, 1993).

Os inibidores clássicos dos citocromo P450 são também inibidores destas reacções de redução, uma vez que competem com o substrato na ligação ao centro activo ou complexam com o ferro do grupo hemo e bloqueiam o fluxo de electrões.

Os grupos funcionais nitro ou azo também podem sofrer redução química ou enzimática uma vez que ao aceitarem equivalentes redutores, por um lado, diminuem o estado de oxidação do azoto e, por outro, o grupo nitro, por uma série de passos sequenciais converte-se numa nitrona, depois numa hidroxilamina, e, por fim, numa amina (Goeptar, 1995).

A dupla ligação azoto-azoto dos compostos azo é progressivamente reduzida até o composto se decompor em dois derivados aminados. Para além da redução dos compostos nitro e azo, sabe-se que outros grupos funcionais podem ser reduzidos por este sistema, tais como os óxidos de arenos, os *N*-óxidos e haletos de alquilo. Estes processos exigem a participação simultânea do enzima NADPH (P450) redutase e de citocromo P450 oxidase terminais. O baixo potencial redox amplifica a especificidade do substrato e uma forte coesão dos constituintes do sistema P450 permite a transferência de electrões para o xenobiótico, privilegiando a via redutora relativamente à via oxidativa predominante (Martin e Kennely, 1981).

Esta via de biotransformação pode ser considerada um processo de desintoxicação, mas na maior parte dos casos o produto ou os intermediários reaccionais que se formam são mais tóxicos do que os compostos que lhes deram origem. Por exemplo, muitos compostos azotados sofrem redução a derivados aminados, que podem então ser oxidados a derivados *N*-hidroxilados. Os alcanos polialogenados aceitam electrões e convertem-se em aniões radicalares que se fragmentam em radicais livres que rompem a ligação carbono-halogéneo.

O tetracloreto de carbono e o haloetano ( $\text{CF}_3\text{CHBrCl}$ ) são dois exemplos clássicos de compostos que sofrem reacções de bioactivação redutora a intermediários radicalares mediadas pelo sistema citocromo P450 (Martovich, 1984, Testai e Vitozzi, 1986, Manno *et al*, 1992).

A microflora intestinal é também capaz de mediar a redução de vários compostos e, em particular, dos que pertencem aos grupos azo e nitro. Estes microrganismos possuem maquinaria enzimática idêntica à do sistema P450 de mamíferos e, por esse motivo, podem provocar efeitos importantes na biotransformação de xenobióticos *in*

*vivo* em condições anaeróbias e de elevada concentração desses compostos, devido a ingestão exagerada ou à excreção biliar. Os referidos microrganismos podem também modificar derivados metabólicos de xenobióticos produzidos pelos citocromos P450 hepáticos. Em alguns casos, o derivado metabólico produzido pode ser reabsorvido e, posteriormente, processado pelos enzimas hepáticos (Goeptar *et al*, 1995).

#### 1.3.6.3.3.1. Reacções de redução anaeróbia

Alguns xenobióticos em condições de anaerobiose são capazes de aceitar electrões directamente do complexo  $[\text{Fe}^{2+}\text{-P450}]$  pela denominada actividade xenobiótico redutase do P450, que pode ser inibida pelo  $\text{O}_2$ . Os inibidores clássicos dos citocromo P450 também são potenciais inibidores desse tipo de reacções, quer por ligação ao centro catalítico dos citocromo P450, nas interacções do tipo I, quer por ligação directa ao átomo de ferro do grupo hemo, nas interacção do tipo II, o que inibe o fluxo de electrões para os xenobióticos.

As causas que condicionam os citocromo P450 a optar por este desvio metabólico não estão ainda totalmente esclarecidas (Goeptar, *et al*, 1992a, 1992b).

O desvio do estado de baixo spin  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{LS}}$  para o estado de spin elevado  $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{HS}}$  induzido por substratos como os haloalcanos leva a que o complexo  $[\text{substrato-Fe}^{3+}\text{-P450}]$  sofra uma redução monoelectrónica pelo enzima NADPH (P450) redutase que o transforma no complexo  $[\text{substrato-Fe}^{2+}\text{-P450}]$ . Em aerobiose, seguir-se-ia o ciclo monoxigenase oxidativo dos citocromos P450 com a ligação, neste estágio, do  $\text{O}_2$  ao complexo  $[\text{substrato-Fe}^{2+}\text{-P450}]$ , que levaria à formação do intermediário reaccional  $[\text{substrato-Fe}^{2+}\text{-P450}][\text{O}_2]$ . Todavia, na ausência do  $\text{O}_2$ , o complexo

[substrato-Fe<sup>2+</sup>-P450] doa, directamente ao substrato, um electrão com a regeneração do Fe<sup>3+</sup>-P450 e formação de um substrato radicalar livre (Luke *et al*, 1987).

A toxicidade dos alcanos halogenados tem muitas vezes sido atribuída a esta actividade que se manifesta em anaerobiose (Nastainczyk e Ullrich, 1978, De Groot e Noll, 1986).

A necrose hepática centrilobular constitui uma lesão característica induzida por alcanos halogenados devido aos citocromo P450 por eles induzidos no lóbulo hepático se localizarem predominantemente na área centrilobular onde a pO<sub>2</sub> é baixa (Gooding *et al.*, 1978, Oinonen e Lindros, 1998).

Entre os xenobióticos que podem sofrer este tipo de reacção, destacam-se os haloalcanos (Ekstrom e Ingelmann-Sundberg, 1989) e as quinonas (Vromans *et al*, 1990; Goeptar *et al*, 1992a, 1992b, 1993).

O composto poli-halogenado haloetano, CF<sub>3</sub>CHClBr, um anestésico, constitui um bom exemplo de xenobiótico que pode ser bioactivado por redução mediada pelos citocromo P450. O metabolismo oxidativo do haloetano leva à formação do ácido trifluoroacético (Stier, 1964) enquanto que o metabolismo redutor o converte em radicais livres como o [CF<sub>3</sub>CHCl]<sup>•</sup> (Tomasi, 1983), e produtos estáveis, como o F<sub>2</sub>CHCl e CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Cl (Mukai *et al*, 1977).

Em condições anaeróbias, o CF<sub>3</sub>CHClBr liga-se ao Fe<sup>2+</sup>-P450 presumivelmente no centro catalítico, mas não directamente ao ferro do hemo (Goldblum e Low, 1980). Após redução monoelectrónica do complexo [Fe<sup>2+</sup>-P450- CF<sub>3</sub>CHClBr] seguida da eliminação do Br<sup>-</sup>, forma-se [CF<sub>3</sub>CHCl]<sup>•</sup> que pode interactivar com o centro activo do P450 ou induzir o metabolismo redutor (Luke, 1987). Uma segunda redução monoelectrónica do complexo [Fe<sup>2+</sup>-P450-CF<sub>3</sub>CHCl] leva à formação do complexo

$[\text{Fe}^{2+}\text{-P450-CF}_3\text{CHCl}]^-$  que, após eliminação do  $\text{F}^-$ , converte-se em  $[\text{Fe}^{2+}\text{-P450-CF}_2\text{CHCl}]$  que se dissocia em  $\text{CF}_2\text{CHCl}$  e  $\text{Fe}^{2+}\text{-P450}$  (Luke, 1987). Acrescente-se, ainda, que a protonação do complexo ( $\text{Fe}^{2+}\text{-P450-CF}_3\text{CHCl}$ ) e posterior dissociação do produto podem levar à formação de  $[\text{CF}_3\text{CHCl}]^*$  (Goldblum e Lowe, 1980).

Alguns autores têm observado que o  $[\text{CF}_3\text{CHCl}]^*$  tem efeitos destrutivos sobre os citocromo P450 hepáticos de rato uma vez que destrói o seu grupo prostético (Manno *et al.*, 1991, 1992).

A mitomicina, uma p-benzoquinona substituída é um composto com propriedades antitumorais utilizado no tratamento de uma grande variedade de cânceros humanos (Powis, 1989, Sinha, 1989). Este composto requer bioativação redutora antes de manifestar a sua actividade citotóxica e antitumoral. A mitomicina pode ser bioactivada por redução monoelectrónica, levando à formação do respectivo radical livre hemiquinona, ou sofrer redução dielectrónica, com a formação das respectivas hidroquinonas (Traver, *et al.*, 1992, Odom, *et al.*, 1992).

A redução dielectrónica parece exigir a participação de enzimas como o NADPH (P450) redutase e NADH b5 redutase (Kalyanaraman *et al.*, 1980; Powis, 1987). No entanto, estudos realizados por Kennedy *et al.* (1982) e Vromans *et al.* (1990) demonstraram que os citocromo P450 induzíveis pelo fenobarbital também estão directamente envolvidos na redução monoelectrónica da mitomicina. Os autores observaram que esta quinona liga-se com elevada afinidade ao centro catalítico dos citocromo P450 microsossomais hepáticos de rato induzíveis pelo fenobarbital e que o mecanismo de redução monoelectrónica pelos citocromo P450, apesar de ainda não estar completamente esclarecido e ser fortemente inibido pelos inibidores SK, F525-A, pela metiraprona e por anticorpos de CYP2B em condições anaeróbias (Goepfert *et al.*, 1992b,



1993), leva à formação de  $H_2O_2$ , um produto da actividade oxigeno-redutase (Alvares *et al*, 1967, Vromans *et al*, 1990, Goepfar *et al*, 1993).

Gustafsson *et al*. propuseram em 1991 um mecanismo que tenta explicar a redução monoelectrónica de quinonas pelos citocromo P450. Os autores formularam a hipótese de a mitomicina ao ligar-se com elevada afinidade aos citocromo P450 do fígado de rato induzir uma alteração conformacional do próprio citocromo P450 que facilita o fluxo electrónico desde o enzima NADPH (P450) redutase até ao complexo  $[Fe^{3+}\text{-P450-quinona}]$  pré-formado que aumenta a extensão da redução directa da mitomicina pelos citocromo P450. Esta via de redução monoelectrónica é particularmente sensível ao oxigénio devido a reoxidação do radical hemiquinona na presença de  $O_2$  e consequente formação de  $O_2^{\bullet-}$  (Bachur *et al*, 1979, Powis *et al*, 1987, 1989).

A dismutação enzimática ou espontânea do  $O_2^{\bullet-}$  pode produzir  $H_2O_2$  (Nakamura *et al*, 1989), na presença de quantidades vestigiais de alguns iões metálicos, como iões férricos, por exemplo, e formar espécies radicalares de oxigénio, como  $\bullet OH$ , capazes de provocar a ruptura da cadeia e alterações antigénicas no DNA (Rumyantseva *et al*, 1989, Blount *et al*., 1989, Fischer *et al*, 1990) ou, ainda, outros danos celulares resultantes da peroxidação lipídica (Doroshov, 1986, Rumyantseva e Wertner, 1988, Mimnaugh *et al*., 1986, Chatterjee, 1988).

#### 1.3.6.3.3.2. Reacções de redução aeróbia

O mecanismo reponsável pelo desacoplamento do ciclo monoxigenase do sistema citocromo P450 microsossomal ainda não está esclarecido e algumas hipóteses até agora formuladas permanecem sujeitas a discussão.

O desvio do estado de baixo spin  $\text{Fe}^{3+}$ -P450<sub>LS</sub> para o estado de spin elevado  $\text{Fe}^{3+}$ -P450<sub>HS</sub> dos citocromo P450 microssomais favorece a redução do  $\text{Fe}^{3+}$ -P450 a  $\text{Fe}^{2+}$ -P450 e subsequente ligação do  $\text{O}_2$  ao  $\text{Fe}^{2+}$ -P450 (Guengerich *et al.*, 1976).

Lewis *et al.* (1989) sugeriram que a ligação  $\text{Fe}^{2+}$ -P450 ( $^3\Sigma \text{gO}_2$ ) só ocorre se o  $\text{Fe}^{2+}$ -P450 se encontrar no estado de spin elevado HS uma vez que o  $\text{O}_2$  no estado fundamental se encontra no estado tripleto com dois electrões desemparelhados.

O estabelecimento dessa ligação leva, então, a um emparelhamento de spin com consequente conversão do  $\text{O}_2$  na espécie singlete ( $^1\Delta\text{g}$ ) e retorno do  $\text{Fe}^{2+}$ -P450 ao estado de baixo spin LS. A posterior reoxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ -P450<sub>LS</sub> com a transferência de um electrão para  $^1\Delta\text{g} \text{O}_2$  leva ao aparecimento de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Saito, *et al.*, 1989). Esta hipótese parece ser viável se considerarmos que a transferência de electrões da forma  $\text{Fe}^{2+}$ -P450<sub>LS</sub>, com potencial redox de +50mV, é mais favorável se o  $\text{O}_2$  se encontrar no estado  $^1\Delta\text{g}$ , em que apresenta potencial redox de +650 mv, do que se estiver no estado  $^3\Sigma \text{gO}_2$  em que possui potencial redox de -160 mV (Lewis *et al.*, 1989, Koppenol *et al.*, 1976).

O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  libertado do complexo  $[\text{Fe}^{2+}\text{-P450}] [\text{O}_2^-]$  em combinação com o ferro pode levar à formação de  $^{\bullet}\text{OH}$ , um potente iniciador da peroxidação lipídica (Ekstrom e Ingelman-Sundberg, 1986).

A actividade oxigeno-redutase dos citocromo P450 pode ser induzida por compostos como o 1,1,1-tricloroetano, o hexobarbital ou o 2-bromo-4'-nitroacetofenona que se comportam respectivamente como falsos substratos, desacopladores parciais ou reagentes alquilantes (Goeptar, 1995).

Os compostos que actuam como falsos substratos ligam-se aos citocromo P450 e induzem a actividade oxigeno-redutase destas enzimas inibindo a monoxigenação,

aumentando a taxa de consumo de  $O_2$  e a consequente produção de  $H_2O_2$  (Goepfert, 1995).

O hexobarbital um desacoplador parcial do ciclo monooxigenase dos citocromos P450 é provavelmente o indutor da actividade oxigenoreductase melhor conhecido (Schenkman *et al.*, 1967).

Durante o ciclo monooxigenase do P450, o hexobarbital sofre uma hidroxilação na posição 3' do anel ciclo-hexinil (Bush e Weller, 1973) e uma epoxidação nas posições 1'e 2' (van der Graaf e Vermeulen, 1988).

No entanto, a formação do 3'-hidroxi-hexobarbital com a redução do  $O_2$  a  $H_2O_2$  por microsomas do fígado de diferentes animais provoca um aumento da taxa de formação  $H_2O_2$  em todas as espécies testadas (Heinmeyer e Hildbrandt, 1980), facto esse que foi atribuído à actividade oxigeno-redutase dos citocromo P450 (Hidbrandt *et al.*, 1973, Estabrook *et al.*, 1977, 1979).

#### 1.3.6.4. Regulação da expressão dos genes citocromo P450

A regulação da expressão dos genes citocromo P450 ocorre essencialmente ao nível da transcrição e da degradação do mRNA ou do próprio enzima (Sipes e Gandolfi, 1991; Denison, 1995; Okita e Masters, 1997).

Embora a transcrição dos genes *CYP* ou *cyp* dependa de processos fisiológicos naturais como, por exemplo, a regulação por hormonas sexuais e, consequentemente, do estágio do desenvolvimento animal em que decorre, pode em muitos casos, ser induzida por xenobióticos (Li, 1993, Prough *et al.*, 1996, Miller, Oinonen e Lindros, 1998, Ricci *et al.*, 1999).

Como, muitas vezes, o indutor se comporta como substrato do enzima que foi induzido, as actividades enzimáticas dependentes dos citocromo P450 só permanecem elevadas quando existe xenobiótico para biodegradar.

Os enzimas citocromo P450 que podem ser induzidos por xenobióticos representam sistemas experimentais muito úteis para análise dos mecanismos pelos quais pequenas moléculas aumentam a taxa de transcrição de genes específicos. Por esse motivo passaremos a descrever de forma sucinta alguns mecanismos de indução da expressão dos genes *CYP* ou *cyp*.

#### 1.3.6.4.1. Receptores “Ah”

A regulação da expressão do *CYP1A1* tem recebido particular atenção, pois os indivíduos onde esta família enzimática é fortemente expressa apresentam maior predisposição para a formação de tumores (Chen e Tukey, 1996, Walsh *et al.*, 1996, Vaziri e Faller, 1997).

A sequência de passos que levam à indução dos genes *CYP1A1* constitui um bom exemplo destes sistemas reguladores. A descoberta do mecanismo desta indução ocorreu quando se observou que a dioxina, um promotor muito forte de tumores em murganhos, era um indutor potente do citocromo CYP1A1.

A sua eficácia como promotor de tumores depende da presença de uma fosfoproteína, o receptor funcional “Ah”, de “aryl hidrocarbon”, que reconhece a dioxina como ligando (Swanson *et al.*, 1993 Guengerich, 1993, Elferink e Whitlock, 1994, Li *et al.*, 1994, Denison, 1995, Schmidt, e Bradfield, 1996, Chen e Tukey, 1996, Vaziri e Faller, 1997).

Poland, da Universidade de Wisconsin, Fuji-Kuriyama, da Universidade de Tohoku e Funae, da Universidade de Osaka, descobriram que o receptor “Ah”, que se encontra normalmente ligado à “heat shock protein”, hsp 90, do citosol, era fundamental para garantir o desenvolvimento tumoral (Guengerich, 1993).

O reconhecimento da dioxina pelo receptor “Ah” provoca a ruptura da ligação receptor-hsp90 e a formação do complexo ligando-receptor que, após transporte para o núcleo, liga-se ao receptor nuclear “ARNT”, de “aryl hydrocarbon translocator”, para formar um heterodímero com elevada afinidade de ligação para o DNA (Guengerich, 1993, Chan *et al.*, 1994, Mason *et al.*, 1994, Denison, 1995, McGuire *et al.*, 1996, Walsh *et al.*, 1996, Holmes e Pollenz, 1997).

O complexo dimérico então formado interage com uma região reguladora específica do gene *CYP1A1*, conhecida como “E box”. A alteração conformacional da cromatina provocada por essa ligação facilita o acesso de outras proteínas nucleares à região promotora do gene, por um processo que ainda não se encontra completamente esclarecido e que leva à indução da síntese do mRNA matriz do citocromo CYP1A1 (Guengerich, 1993, McGuire *et al.*, 1996, Oinonen e Lindros, 1998).

Por vezes, o complexo receptor Ah-ligando pode inibir a transcrição de alguns genes ao interagir com regiões “XRE”, de “xenobiotic-response elements”, sobrepondo sequências reguladoras positivas (Vaziri *et al.*, 1996).

O receptor “Ah” está estruturalmente relacionado com o seu companheiro de dimerização “ARNT” e com os factores de transcrição Sim e Per de *Drosophila*.

A dedução da estrutura a partir da análise dos respectivos cDNA revelou que as quatro proteínas possuem um domínio homólogo “PAS de Per-Arnt-Sim” que contém as

sequências necessárias para o reconhecimento do ligando, dimerização e interacção com uma “heat-shock protein” de 90 kDa.

Os mesmos estudos mostraram ainda que as três primeiras proteínas possuem ainda um segundo domínio básico do tipo “helix-loop-helix”, designado “bHLH”, de basic helix-loop-helix”, localizado na região *N*-terminal, que contém a sequência de ligação ao DNA (Swanson e Bradfield, 1993, Reisz-Porszasz *et al.*, 1994, Jain *et al.*, 1994, Denison e Whitlock, 1995, McGuire *et al.*, 1996).

Alguns investigadores admitem que o receptor “Ah” desempenha um papel importante na embriogénese e no crescimento animal, tendo como base o perfil de expressão do receptor obtido em diferentes fases do desenvolvimento.

Embora deva existir um ligando fisiológico para os receptores “Ah”, ainda não foi identificada uma molécula com essas características.

A activação dos receptores “Ah” induz igualmente a proliferação de células do parênquima e dos epitélios dos tractos urinários e intestinal e da epiderme interfolicular, pelo que uma desregulação desta via de sinal, induzida por hidrocarbonetos aromáticos ou outros xenobióticos, poderá interferir com o desenvolvimento animal, em particular em períodos como a embriogénese e o crescimento (Vaziri *et al.*, 1996, Schmidt e Bradfield, 1996).

#### 1.3.6.4.2. Receptores “PPAR”

Um amplo conjunto de compostos estruturalmente diferentes, como o fármaco hipolipidémico clofibrato, o plastificante éster de ftalato ou solventes aromáticos halogenados, induzem a proliferação de peroxissomas no fígado dos mamíferos e podem

inclusivamente ser responsáveis pela cancerigénese hepática de roedores (Rao e Redy, 1987, Moody *et al.*, 1991, Palmer *et al.*, 1998).

A proliferação dos peroxissomas em rato é acompanhada pela indução da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos peroxissomal, pelo aumento do conteúdo intracelular em peróxidos e dos danos consequentes sobre o DNA e pela indução da actividade microsomal ácido laurico  $\omega$ -hidroxilase, catalisada pelos citocromos CYP4A1 de rato, desempenhando um papel importante na regulação da homeostase dos lípidos (Sharma *et al.*, 1988, Redy e Rao, 1989, Tugwood *et al.*, 1992, Gearing *et al.*, 1994, Denison e Whitlock, 1995, Desvergne e Whali, 1996).

A indução da transcrição dos genes *CYP4A1/6* precede a indução da transcrição do gene *ACO*, de “acyl-CoA oxidase”, pois, estudos realizados com hepatócitos de rato e inibidores do citocromo CYP4A1 permitiram observar uma inibição da indução do gene *ACO* sem o mesmo acontecer para o gene *CYP4A1*. Por outro lado, foi também observado que o ácido hexadecanóico, um ácido gordo de cadeia longa e produto da reacção do citocromo CYP4A1, comporta-se como indutor do gene *ACO* (Bell e Elcombe, 1991, Denison e Whitlock, 1995).

A indução dos genes que codificam a actividade acil-CoA oxidase de rato e  $\omega$ -hidroxilase do CYP4A6 de coelho, por proliferadores de peroxissomas é regulada por factores de transcrição conhecidos como “PPAR $\alpha$ ”, de “Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ”, pertencentes à família de receptores nucleares de hormonas esteróides (Ram e Waxman, 1994, Palmer *et al.*, 1994, 1998), fortemente conservados ao longo do processo evolutivo em organismos tão afastados como o murganho e a rã (Issemann e Green, 1990, Dreyer *et al.*, 1992).

A indução da transcrição inicia-se após dimerização dos receptores “PPAR $\alpha$ ” com o receptor RXR, de “retinoid X receptor”.

O heterodímero “PPAR\*RXR” então formado liga-se a sequências de repetição TGACCT e TGTCCT, do DNA, designadas “PPREs”, de “peroxisome proliferator-activated receptor”, para desencadear a resposta (Tugwood *et al.*, 1992, Denison e Whitlock, 1995, Palmer *et al.*, 1994, 1998).

#### 1.3.6.4.3. Receptores “PB” ?

A indução do citocromo P450 por compostos como o fenobarbital, o 1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano (DDT) ou compostos difenílicos policlorados traduz-se num perfil característico de actividades enzimáticas referido na literatura por “PB-like” ou só “PB”. No fígado de rato o fenobarbital induz a transcrição dos genes *CYP2B1* e *CYP2B2* por uma série de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais que ainda não se encontram totalmente esclarecidos (Ortiz de Montellano, 1986, Gonzalez, 1989, Waxman, 1992, Denison, 1995).

Embora a indução de citocromo P450 pelo fenobarbital seja observada em bactérias, aves e mamíferos, parece que o mecanismo indutivo não foi fortemente conservado ao longo do processo evolutivo, uma vez que, ensaios com hepatócitos de rato mostraram que a indução dos genes *CYP2B1* e *CYP2B2* pelo fenobarbital dá-se por um mecanismo diferente daquele que foi observado para o gene *CYP3A* (Okey, 1990, Waxman, 1992).

Por outro lado, ainda não foi identificado um receptor comum a todos os indutores “PB-like”, facto que pode eventualmente ser devido à diversidade estrutural que apresentam (Okey, 1990, Waxman, 1992).



A região reguladora do gene CYP102 (BM-3) induzível pelos barbituratos em *Bacillus megaterium* contém uma sequência de 17 pb designada por “Barbie box” que tem sido associada à resposta ao fenobarbital nesta estirpe bacteriana (Fulco, 1991, He, 1991, Liang, 1995). Experiências de transfecção génica com hepatócitos primários mostraram que a sequência “Barbie box” tornava genes heterólogos mutantes, com sequência de *consensus* inactiva, induzíveis pelo fenobarbital (Fournier, 1994).

A sequência “Barbie box” (*consensus* 5'-ATCAAAGCTGGAGG) situa-se a montante dos genes *CYP102* e *CYP106* (BM-1) bacterianos, *CYP2B1*, *CYP2B2* e *CYP3A2*, de rato e de outros genes de mamíferos que respondem ao fenobarbital (He, 1991, Liang, 1995). Como essas sequências de *consensus* se ligam *in vitro* a proteínas bacterianas e proteínas do núcleo de hepatócitos de rato, vários autores tem admitido a existência de um receptor para o fenobarbital com capacidade para ligar-se ao DNA nessa região promotora dos genes codificantes dos citocromo P450, mas que ainda não foi identificado (Fulco, 1991, He, 1991, Fournier, 1994, Shepard, 1994, Liang, 1995, Park *et al.*, 1996).

Contudo, Shaw *et al.* (1993) identificaram uma região a montante dos genes *CYP2B1* e *CYP2B2*, que era influenciada por glucocorticóides, o que levou estes autores a admitirem que o fenobarbital poderia actuar indirectamente, induzindo a acumulação de um esteróide endógeno, em vez de o fazer pelo mecanismo descrito no parágrafo anterior.

Entretanto, estudos realizados por Waxman (1992) e Park *et al.* (1996), com culturas primárias de hepatócitos de galinha, permitiram detectar uma sequência “enhancer”, localizada numa região entre -5,9 -1,1 Kpb a montante do local de iniciação

da transcrição do gene *CYP2H1*, que apresentava capacidade para regular a resposta de um promotor heterólogo ao fenobarbital.

Ramsden *et al.* (1993) detectaram igualmente uma sequência reguladora localizada entre -0,8 e -19 kpb a montante do local de iniciação da transcrição do gene *CYP2B2* de rato, apresentando a mesma propriedade.

No entanto, em 1996, Honkakoski *et al.* conseguiram identificar sequências de resposta ao fenobarbital na região distal do terminal 5' do gene *cyp2b10*. Tal facto, levou os referidos investigadores a questionar o papel preponderante da “Barbie Box” no processo e a admitir que as sequências de resposta ao referido xenobiótico estariam localizados na região distal do gene.

Shaw *et al.* (1998) confirmaram parcialmente estes resultados num estudo efectuado com *Bacillus megaterium* em que utilizaram um “gene reporter” com a região promotora do *CYP P450B<sub>M-1</sub>* e observaram que a deleção da sequência “Barbie box” dessa região não afectava acentuadamente a indução pelo fenobarbital.

Em 1998, Stoltz *et al.* conseguiram, ainda, identificar, por ensaios de transfecção génica, em hepatócitos primários de rato uma sequência “enhancer” de 163 pb, denominada Sau3AI, na região 5' do gene *CYP2B2* que era capaz de responder ao fenobarbital, promovendo a indução de um gene “CAT reporter” fundido com a região promotora do gene *CYP2B2*. Os mesmos autores observaram ainda que o fragmento Sau3AI é constituído por uma região central, “core”, e por sequências acessórias na vizinhança que participam na resposta ao fenobarbital, como a denominada AF1, por eles identificada no referido trabalho.

Stoltz *et al.* (1998), utilizando mutagénese dirigida mostraram ainda que a resposta do *CYP2B2* ao fenobarbital, também depende de um factor nuclear 1 e de um

receptor hexâmero nuclear a ele associado, ou seja, requer interações entre proteínas reguladoras e elementos *cis*-actuantes que constituem uma unidade de resposta.

Honkakoski *et al.* (1998) identificaram, posteriormente, no citocromo *cyp2b10*, um módulo “enhancer” de resposta ao fenobarbital denominado “PBREM”, de “phenobarbital-responsive enhancer module”, com dois potenciais centros de ligação a receptores nucleares NR1 e NR2. Os resultados obtidos por Honkakoski *et al.* (1998) mostraram ainda que um heterodímero constituído pelos receptores nucleares RXR, de “anti-retinoid X receptor” e CAR o “nuclear orphan receptor” constitui um factor *trans*-actuante do gene *cyp2b10* que participa na resposta ao fenobarbital.

Recentemente, Dogra *et al.* (1999) identificaram a montante do gene *CYP2H1* de galinha um domínio “enhancer” (5900-1100 pb) que responde ao fenobarbital. Análises deste domínio por deleção e com enzimas de restrição permitiram, igualmente, identificar duas subregiões “enhancer” separadas que respondem ao fenobarbital (de 5900- 4550 pb e de 1956-1400 pb), embora as proteínas que a elas se ligam pareçam ser diferentes das descritas para os domínios “enhancer” dos genes *CYP2* de roedores.

#### 1.3.6.4.4. Receptores “SRX” ?

Compostos como a pregnenolona-16 $\alpha$ -carbonitrilo (PCN) ou a dexametazona são indutores conhecidos dos *CYP3A*, família enzimática que metaboliza uma ampla variedade de esteróides, incluindo a testosterona (Gonzalez, F.J., 1989, Okey, A.B., 1990). Embora Burger *et al.* (1992) tenham identificado uma sequência de DNA localizada entre -220 e -56 pb a montante do gene *CYP3A1*, que responde à pregnenolona-16 $\alpha$ -carbonitrilo e à dexametazona, não conseguiram determinar o elemento *cis*-actuante responsável por essa resposta.

Estudos efectuados com uma variedade de hormonas esteróides estruturalmente semelhantes mostraram que a indução dos *CYP3A*, *CYP2B1*, *CYP2B2* e *CYP2C6* não envolvia um receptor de esteróides conhecido (Okey, 1990, Burger, 1992, Kocarek, 1994). Blumberg *et al.* (1998) isolaram um receptor nuclear denominado SXR, de “steroid and xenobiotic receptor”, que forma com o receptor nuclear RXR, de “anti-retinoid X receptor”, um complexo dimérico SXR\*RXR capaz de interagir com a região do DNA que participa na indução dos citocromo P450 por esteróides. Segundo os autores, o receptor SXR representa um novo tipo de receptores nucleares de baixa especificidade que é capaz de reconhecer vários esteróides endógenos e exógenos como ligandos (Blumberg *et al.*, 1998).

#### 1.3.6.5. Classificação

Os avanços na tecnologia de recombinação do DNA permitiram a identificação de mais de 481 genes e 22 pseudogenes que codificam os citocromo P450 em diversos organismos vivos. Estes genes distribuem-se por 85 espécies de eucariotas, incluindo vertebrados, invertebrados, fungos e plantas e por 20 espécies de procariotas.

A análise sequencial desses genes e/ou dos correspondentes cDNA tornou possível o desenvolvimento de um sistema de classificação para os citocromo P450 que passamos a descrever.

Os citocromo P450 foram agrupados em famílias cujos membros apresentam, entre si, pelo menos 40% de homologia sequencial. Algumas dessas famílias de genes estão ainda subdivididas em subfamílias cujos membros apresentam > 60% de sequências homólogas (Nelson *et al.*, 1993, 1996). Cada enzima ou mRNA que o codifica é identificado pelo prefixo CYP seguido por um número e por uma letra que o relaciona

com a família e a subfamília a que pertence. Por exemplo, o citocromo CYP1A2 pertence à família 1 e à subfamília A. Infelizmente, ainda hoje persiste alguma ambiguidade na atribuição do último dígito, uma vez que em alguns casos distingue proteínas de espécies diferentes e noutros casos proteínas diferentes da mesma espécie. Foi também proposto atribuir o prefixo *cyp*, para designar em murganhos e em *Drosophila*, e *CYP*, para designar nas outras espécies, os genes que codificam cada isoenzima citocromo P450 (Nebert, *et al.*, 1989, 1991, Nelson *et al.*, 1993, 1996).

Das 74 famílias de genes referidas em Nelson *et al.* (1996), 14 existem em todos os mamíferos examinados. Estas 14 famílias subdividem-se em 26 subfamílias, das quais 15 foram identificados no genoma de rato e 20 no genoma humano.

Das catorze famílias identificadas em mamíferos iremos caracterizar de forma mais pormenorizada as famílias de genes 1, 2, 3, e 4, que agrupam os citocromo P450 hepáticos e extra-hepáticos que participam nas reacções da primeira fase de biotransformação de xenobióticos e ou da testosterona. Outras famílias de genes como, por exemplo, a 11, 17, 19 e 21 não serão referidas neste texto uma vez que são citocromo P450 extrahepáticos especializados na biossíntese das hormonas esteróides e não constituíram objecto de estudo neste trabalho. (Nebert *et al.*, 1991, Nelson *et al.*, 1993, 1996).

#### 1.3.6.5.1. CYP1

Os membros mais importantes da família de genes *CYP1* de ratos, murganhos, coelhos e humanos são os designados por *CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP1B1*. Esses genes codificam proteínas induzidas por hidrocarbonetos aromáticos, sendo muitas vezes referidos na literatura mais antiga como P-448.

A subfamília *CYP1A1* associada à actividade benzopireno hidrolase não é constitutivamente expressa no fígado de rato, mas é também fortemente induzida por hidrocarbonetos planares policíclicos. A indução do *CYP1A1* é mediada por receptores “Ah” (Sipes e Gandolfi, 1991, Oinonen e Lindros, 1998).

A subfamília *CYP1A2*, associada ao metabolismo das arilaminas e de pró-mutagénicos da dieta, como as nitrosaminas e as aflotoxinas, expressa-se constitutivamente no fígado de rato e pode também ser induzida por hidrocarbonetos aromáticos. A indução ou a expressão constitutiva em murganhos, é também regulada por receptores “Ah”.

A subfamília *CYP1B1* é constitutivamente expressa nas supra-renais e ovários de ratos e murganhos e regulada hormonalmente. Esta subfamília é induzida em alguns órgãos, incluindo o fígado, pela TCDD e hidrocarbonetos planares policíclicos (Oinonen e Lindros, 1998).

#### 1.3.6.5.2. CYP2

A família *CYP2* é constituída por cinco subfamílias principais (Nelson *et al.*, 1996, Oinonen e Lindros, 1998).

As subfamílias *CYP2A*, *CYP2C* e *CYP2D* codificam isoenzimas constitutivamente expressos no tecido hepático que participam no metabolismo da testosterona, das aflotoxinas e das nitrosaminas (*2A*), na biossíntese dos ácidos biliares e na hidroxilação de androgénicos (*2C*) e na desalquilação de xenobióticos (*2D*).

As subfamílias *CYP2B* codificam os principais citocromos induzidos em várias espécies pelo fenobarbital enquanto que a subfamília *CYP2E* codifica as principais formas induzidas pelo etanol.

Devido ao acentuado número de genes pertencentes à família *CYP2*, comparativamente com a família *CYP1*, tem sido difícil identificar ortólogos nas diferentes espécies (Sipes e Gandolfi, 1991, Oinonen e Lindros, 1998).

#### 1.3.6.5.3. CYP3

Os membros melhor estudados da família de genes *CYP3* pertencem às subfamílias *CYP3A1* e *CYP3A2*.

A expressão do *CYP3A1* no fígado de rato é fraca e a do *CYP3A2* somente ocorre em ratos machos (Oinonen e Lindros, 1998).

Os membros desta família de citocromo P450 podem ser induzidos por esteróides e pelo fenobarbital e participam na hidroxilação de esteróides e no metabolismo dos antibióticos macrólidos (Sipes e Gandolfi, 1991, Okita e Masters, 1997, Oinonen e Lindros, 1998).

#### 1.3.6.5.4. CYP4

Os membros da família de genes *CYP4* são transcripcionalmente activados por indutores da proliferação de peroxissomas como o clorfibrato e solventes aromáticos halogenados. A função característica destes enzimas é a  $\omega$ -hidroxilação de ácidos gordos e prostaglandinas (Nelson *et al.*, 1993, 1996).

O mediador da activação transcripcional parece ser o receptor específico de esteróides designado por PPAR de “peroxisome proliferator activated receptor” (Oinonen e Lindros, 1998).

## 1.4. Glutathione S-transferase

### 1.4.1. Perspectiva histórica

A actividade enzimática glutathione *S*-transferase foi observada pela primeira vez em 1961, por Joan Booth, Eric Boyland e Peter Sims, do Instituto Chester Beatty para a Investigação do Cancro, em South Kensington, a instituição que sintetizou e isolou pela primeira vez o benzo [*a*] pireno, um cancerígeno químico, desenvolveu fármacos derivados azotados da mostarda, como o clorambucil e o mefalan, utilizados na terapia do cancro, e descobriu o papel importante que os aductos do DNA desempenham na carcinogénese química (Brooks e Lawley, 1964, Brunning and Dukes, 1965, Sims e Grover, 1974).

As tentativas iniciais de purificação do(s) enzima(s) que manifestava(m) a actividade glutathione *S*-transferase não foram muito bem sucedidas devido, por um lado, à multiplicidade destes enzimas e, por outro, à especificidade sobreponível que apresentam para diferentes substratos (Boyland e Chasseaud, 1969).

Nessa época, a comunidade científica não aceitava pacificamente que a formação de aductos entre compostos cancerígenos e o DNA, desempenhasse um papel importante na carcinogénese química. Alguns investigadores conceituados argumentavam que a reacção de compostos cancerígenos com as proteínas era mais importante, admitindo que os processos celulares resultavam de reacções em cadeia, nas quais as proteínas constituíam os principais guias participativos do processo. Foi, então, postulado que os danos provocados em proteínas repressoras de determinados genes, responsáveis pela manutenção do crescimento e diferenciação celular, podiam ser responsabilizados pelo desenvolvimento de cancro (Pitot e Heidelberg, 1963, Miller e Miller, 1966). Contudo,



esta hipótese não tinha sido comprovada e para o fazer tornou-se necessário o isolamento de proteínas ligadas a produtos cancerígenos.

Foi com base neste pressuposto que alguns estudos, como os de Abell e Heidelberg (1962) e Ketterer *et al.* (1967, 1980), por exemplo, levaram à descoberta de proteínas com capacidade para se ligarem a compostos cancerígenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e os corantes aminoazo.

Ketterer *et al.* (1967, 1971) tiveram algum sucesso na purificação de proteínas como a “ligandina” que participava na formação de conjugados do glutatióno com corantes aminoazo cancerígenos.

Na sequência desses trabalhos, Ketterer e Boyland dedicaram-se à descoberta de novos substratos reconhecíveis pela “ligandina” para a actividade catalítica glutatióno *S*-transferase. No entanto, foram Habig *et al.* (1974) os primeiros a demonstrarem que a conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com o glutatióno podia ser mediada por essa proteína.

Ao longo do tempo, foi sendo demonstrado por processos semelhantes ao descrito anteriormente que a “ligandina” também manifestava a actividade glutatióno peroxidase não dependente do selénio (Prochaska e Ganther, 1976),  $\Delta^5$ -androsteno-3,17-diona isomerase (Benson *et al.*, 1978) e participava em reacções de biossíntese e de desintoxicação do metabolismo das prostaglandinas, constatando-se então que a “ligandina” representava uma família de isoenzimas, hoje designada por glutatióno *S*-transferase, que tinha como função principal proteger os centros nucleófilos do DNA e das proteínas de modificações induzidas por compostos electrófilos, uma propriedade anti-cancerígena que contraria o que fora suposto inicialmente.

Em 1984, Ketterer, Burchell e Jakoby, após a primeira conferência sobre os enzimas glutatióno *S*-transferase, em Dundee, delinearam as primeiras regras de nomenclatura para seis subunidades de glutatióno *S*-transferase de rato entretanto purificadas e que foram expandidas para catorze, em 1994 (Ketterer e Christodoulides, 1994) e para vinte, em 1995 (Hayes e Pulford, 1995)

O estudo dos enzimas glutatióno *S*-transferase tem prosseguido segundo outras abordagens como a pesquisa de substratos com interesse biológico, por exemplo que, naturalmente, começou pelo corante cancerígeno *N,N*,dimetilamino-4-aminoazobenzeno (DAB) utilizado na descoberta da “ligandina”, passou pelo cancerígeno aflotoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e pelo oltripaz, o composto responsável pela quimioprotecção da cancerigénese induzida pelo AFB<sub>1</sub> (Ketterer e Chritodoulides, 1994), e expandiu-se até aos *N*-hidroxi ésteres de pirolisatos alimentares cancerígenos, tais como IQ (2-amino-3-metilimidazo (4,5-*f*)quinolina, MeIQ<sub>x</sub> (2-amino-3,8-dimetilimidazo(4,5-*f*) quinoxalina) e PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo(4,5-*b*)piridina) (Lin *et al.*, 1994).

Outra abordagem do problema passou pela tentativa de purificar novas isoenzimas glutatióno *S*-transferase do fígado e de outros tecidos (Ketterer e Chritodoulides, 1994) e pela caracterização do centro activo, utilizando estudos cinéticos de inibição com compostos derivados do glutatióno (Adang *et al.*, 1988), avaliando os efeitos sobre a actividade enzimática provocados pela modificação química de resíduos específicos (Keterer e Christodoulides, 1994) e utilizando marcadores de fotoafinidade (Cooke *et al.*, 1994).

Outra estratégia passou pelo clonagem de c-DNA de algumas subunidades purificadas de glutatióno *S*-transferase de rato (Taylor *et al.*, 1984, Pemble *et al.*, 1986; Thier *et al.*, 1993) e de humanos (Pemble *et al.*, 1994), que permitiram a identificação

de enzimas congéneres em bibliotecas genómicas de humanos (Cowell *et al.*, 1988). Simultaneamente e associado à sequenciação de algumas subunidades de enzimas glutatióno *S*-transferase, foi possível, ainda, descobrir uma nova família designada por  $\theta$  (Pemble *et al.*, 1994), a qual possui uma distribuição mais universal do que a dos enzimas pertencentes às outras classes de glutatióno *S*-transferase, pois, para além de fungos e animais, tem sido detectada em plantas e bactérias.

#### 1.4.2. Papel biológico

O termo glutatióno *S*-transferase designa uma família de enzimas multifuncionais que participam em processos de desintoxicação celular e na excreção de substâncias fisiológicas e de xenobióticos (Sipes, e Gandolfi, 1991, Mannervik *et al.*, 1992, Monicha, *et al.*, 1997, Ouwerkerk-Mahadevan, 1997, Lohr *et al.*, 1998). Estes enzimas catalisam a conjugação do grupo tiol do tripéptido  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina com centros electrófilos de uma ampla variedade de compostos orgânicos estruturalmente diferentes (Ketterer e Mulder, 1990, Waxman, 1990, Commandeur *et al.*, 1995).

Em muitos casos, estes enzimas reagem com derivados metabólicos produzidos pelo sistema citocromo P450, como acontece na biotransformação do bromobenzeno, clorofórmio e acetoaminofeno, evitando que essas espécies químicas com elevada reactividade estabeleçam ligações covalentes com macromoléculas celulares. (Hesse *et al.*, 1982; Ho e Fahl, 1984a, Sipes, e Gandolfi, 1991, Lohr *et al.*, 1998).

Alguns investigadores também tem atribuído aos enzimas glutatióno *S*-transferase a função de transportadores intracelulares de vários compostos hidrófobos como a bilirrubina, o hemo, esteróides, hormonas da tiróide, sais biliares e neurotransmissores,

função esta que em muitos casos se torna inibidora da actividade catalítica (Mannervik, 1985, Abramovitz *et al.*, 1988, Otieno *et al.*, 1997).

Para além das reacções de conjugação com o glutatono, esta família de enzimas pode, em algumas situações, ainda, catalisar reacções de isomerização de esteróides e de peroxidação de hidroperóxidos orgânicos, não dependentes do selénio (Mosialou, *et al.*, 1993, Wilce e Parker, 1994, Otieno *et al.*, 1997).

#### 1.4.2.1. Adaptação biológica a compostos electrófilos

Alguns autores atribuem aos enzimas glutatono *S*-transferase um papel fulcral no desenvolvimento da resistência celular a pesticidas, herbicidas, antibióticos e outros agentes electrófilos de circulação ambiental observada em vários organismos vivos (Mannervik e Danielson, 1988, Armstrong, 1991, Hayes e Pulford, 1995, Ouwerkerk-Mahadevan *et al.*, 1997).

Outros autores, consideram ainda que a sua sobreexpressão em células tumorais constitui o factor determinante no desenvolvimento de resistência a compostos electófilos de circulação ambiental como o benzo [*a*] pireno, o benzo [*a*] antraceno e o benzo [*a*] criseno, cancerígenos como a aflotoxina B1-8,9-epóxido e compostos alquilantes, exemplos que iremos descrever nas secções 1.4.2.1.1., 1.4.2.1.2. e 1.4.2.1.3. (Jernstrom *et al* 1982, Hesse *et al.*, 1982, Ho e Fahl, 1984a , 1984b, Robertson e Jernstrom, 1986, Batist *et al.*, 1986, Manoharan *et al.*, 1987, Kensler *et al.*, 1987, Lewis *et al.*, 1988, Pulchalsky e Fhal, 1990, Schecter *et al.*, 1991, Hayes *et al.*, 1991, Buetler *et al.*, 1992, Morel *et al.*, 1993, Bolton *et al.*, 1993b, Eaton e Gallagher, 1994, Clapper *et al.*, 1994, Gulick e Fahl, 1995, McLean e Douton, 1995).

#### 1.4.2.1.1. Benzo [a] pireno, benzo [a] antraceno e benzo [a] criseno.

O benzo [a] pireno pode ser biotransformado em benzo [a] pireno-7,8-diol pelo enzima epóxido hidrolase, a partir de um intermediário epóxido gerado pelos enzimas citocromo P450. Uma segunda reacção catalisada por outros citocromos P450 pode ainda oxidar o diol a benzo [a] pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE), um composto que não é reconhecido como substrato pelo enzima epóxido hidrolase, mas que pode sofrer conjugação com o glutatióno, uma reacção que facilita a sua excreção e que é catalisada pelos enzimas glutatióno *S*-transferase (Hesse *et al.*, 1982, Ho e Fahl, 1984a).

A descoberta da reacção de conjugação do glutatióno com o BPDE deu-se no seguimento do trabalho de Jernstrom *et al.* (1982) quando os autores observaram a formação de um conjugado duplamente marcado do glutatióno com o BPDE, após incubação de hepatócitos de rato num meio em que estava presente <sup>3</sup>H-GSH e <sup>14</sup>C-BPDE, Ho e Fahl (1984b).

Posteriormente, um estudo realizado com cultura de células C3H/10T1/2 de murganhos mostrou que a diminuição do conteúdo intracelular em glutatióno provocava um aumento da sensibilidade das referidas células ao BPDE, acompanhado por um aumento da formação de aductos com o DNA (Manoharan *et al.*, 1987).

Outros estudos realizados posteriormente demonstraram, ainda, que a expressão do glutatióno *S*-transferase 1-1 recombinante de rato, em células COS ou CH3/10T1/2 de murganho, conferia-lhes resistência elevada ao BPDE (Manoharan *et al.*, 1987).

Robertson e Jernstrom também observaram, em 1986, que o isoenzima glutatióno *S*-transferase 4-4 de rato era capaz de catalisar a conjugação do glutatióno com derivados diois-epóxidos do benzo [a] antraceno e do benzo [a] criseno.

#### 1.4.2.1.2. Aflotoxina B1-8,9-epóxido

A aflotoxina B1-8,9-epóxido, um derivado metabólico activo de um composto produzido pelo fungo *Aspergillus flavus*, tem sido reconhecida como substrato dos enzimas glutationo *S*-transferase (Hayes *et al.*, 1991, Eaton e Gallagher, 1994, McLean, M. e Douton, M.F., 1995). O composto é um contaminante dos grãos de gramíneas de algumas regiões da Ásia e de África e parece estar relacionado com a elevada incidência de cancro no fígado humano nas populações que os ingerem.

Buetler *et al* (1992) demonstraram que a resposta ao tóxico dependia da capacidade dos enzimas glutationo *S*-transferase de cada animal para metabolizar a aflotoxina B1-8,9-óxido, tendo constatado, por exemplo, que os enzimas da classes  $\alpha$  de fígado de rato e de murganho apresentavam valores semelhantes de actividade para o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e para o hidroperóxido de cumeno, mas diferentes para a aflotoxina B1-8,9-óxido. Os autores concluíram, ainda, que o valor superior obtido com murganhos justificava a maior resistência destes animais ao tóxico. Foi, igualmente, demonstrado que indutores transcripcionais específicos de isoenzimas da classe  $\alpha$  exerciam um efeito protector contra a hepatocancerigénese induzida pela aflotoxina B1, uma vez que os ratos submetidos a uma dieta enriquecida com o oltipraz 5-(2-pirazinil) 4-metil-1,2-ditiolo-3-tiona (Kensler *et al.*, 1987, Bolton *et al.*, 1993b), antes ou durante a exposição à aflotoxina B1, eram mais resistentes ao composto, apresentando menor incidência de aductos com o DNA e de focos de preneoplasia hepática. Estudos realizados posteriormente por Morel *et al* (1993) com culturas de células hepáticas humanas e por Clapper *et al* (1994) com fígado de murganhos demonstraram que o oltipraz conseguia induzir mRNAs de glutationo *S*-transferase da classe  $\alpha$ .

### 1.4.2.1.3. Compostos alquilantes

Outra classe de electrófilos reconhecidos como substratos dos enzimas glutathione *S*-transferase é o grupo de compostos alquilantes utilizados no tratamento de neoplasias. O aparecimento de células tumorais resistentes aos compostos anticancerígenos constitui uma dificuldade frequente na quimioterapia do cancro. Este fenómeno pode estar relacionado com o aumento da expressão de uma proteína de membrana, uma *p*-glicoproteína, designada por bomba P170, responsável pela excreção de grandes quantidades de compostos hidrófobos potencialmente tóxicos. (Gottesman e Pastan, 1988, Saxena e Henderson, 1995). Contudo, em muitos casos, a bomba P170 pode não ser suficiente para justificar as diferenças observadas entre as células sensíveis à droga e as células resistentes, como iremos mostrar através de alguns exemplos que passamos a descrever (Kessel e Wilberding, 1985, Batist *et al.*, 1986, Lewis *et al.*, 1988, Pulchalsky e Fhal, 1990, Schechter *et al.*, 1991).

Batist *et al.* (1986) observaram que a população de células MCF-7 de cancro da mama resistentes à adriamicina possuíam a actividade total glutathione *S*-transferase muito superior à das células MCF-7 parentais. Esse facto foi atribuído à expressão do isoenzima P1-1 nas células resistentes.

Schechter *et al* (1991) observaram um resultado idêntico com células de carcinoma mamário expostas ao melfalan, onde os níveis de expressão do isoenzima glutathione *S*-transferase 2-2 na população de células sobreviventes era superior ao observado nas células que lhes deram origem.

Tal como nos ensaios *in vitro*, o aumento da expressão dos enzimas glutathione *S*-transferase tem também sido observado em diversos casos clínicos. Por exemplo, Lewis

*et al.* (1988) compararam uma linhagem de células de adenocarcinoma ovárico extraídas antes do tratamento da paciente com cisplatina, clorambucilo e 5-fluoruracilo, com uma linhagem de células resistentes derivadas da mesma paciente após tratamento com os referidos compostos. Na linhagem de células resistentes, a actividade glutathione *S*-transferase correspondia ao triplo da que fora determinada na linhagem de células tumorais originárias.

Pulchalsky e Fhal (1990) demonstraram, posteriormente, que um aumento da actividade glutathione *S*-transferase podia, por si só, conferir resistência a medicamentos antineoplásicos. Estes autores conseguiram obter a expressão dos isoenzimas 1-1 e 3-3 de rato e P1-1 de humanos em células eucariotas COS por transfecção de c-DNA, conferindo às células modificadas um aumento específico de actividade glutathione *S*-transferase. A selecção das populações de células que expressavam o isoenzima glutathione *S*-transferase recombinante foi realizada após incubação das culturas celulares com monoclorobimano, um composto que emite fluorescência após conjugação com o glutathione, o que permitiu discriminar as células activadas, fluorescentes, das restantes. As células modificadas mostraram elevada resistência a compostos alquilantes, tendo voltado a apresentar o fenótipo de sensibilidade após perda gradual do plasmídeo codificante. Contudo, os ensaios de transfecção génica nem sempre têm conduzido a resultados inequívocos e coerentes. Por exemplo, a expressão, em células MCF-7, do gene que codifica o isoenzima glutathione *S*-transferase P1-1 humano, fortemente expresso nas linhagens de células de cancro de mama resistentes à adriamicina, não lhes conferiu resistência, apesar de aumentar a concentração isoenzimática intracelular (Batist *et al.*, 1986, Moscow *et al.*, 1989). Outros factores podem, pois, condicionar esta discrepância de resultados.



#### 1.4.2.2. Bioactivação de compostos electrófilos

Conforme foi descrito anteriormente, alguns compostos reagem espontaneamente ou por acção dos enzimas glutatióno *S*-transferase, com tióis e convertem-se em espécies químicas muito reactivas que se ligam ao DNA. Como os tecidos tumorais apresentam em geral níveis elevados de enzimas glutatióno *S*-transferase (Sato, 1989), o tratamento de pacientes de cancro passa, muitas vezes, pela utilização desses enzimas na conversão de fármacos em compostos tiol-activados de toxicidade elevada para as células tumorais (Koga *et al* , 1986, Simula *et al.*, 1993, Shyam *et al.*, 1993, Lyttle *et al.*,1994).

Por exemplo, os enzimas glutatióno *S*-transferase participam na conjugação do glutatióno com etanos di-halogenados, como o 1,2-dibromoetano e o 1,2-dicloroetano que levam à formação de compostos de bromo ou de cloro que reagem com o DNA para formar, por exemplo, o aducto S-(2-(N'-guanil) etil-glutatióno (Koga *et al* , 1986). Este efeito pode estar correlacionado com a inviabilização das células tumorais devido ao aumento da taxa de mutações provocado pelo tratamento com etanos di-halogenados. Por exemplo, Simula *et al* (1993) observaram que a expressão recombinante do gene GST A1-1 em *salmonella typhimurim* estava correlacionada com o aumento das mutações provocadas pelo tratamento com 1,2-dibromoetano. Nesse mesmo ano, Shyam *et al.*, identificaram um segundo grupo de compostos que se tornam mutagénicos ao reagirem com o glutatióno, como as 1-(2-cloroetil)-1,2,2-tris (metilsulfonil)-hidrazinas, instáveis e pouco hidrossolúveis que, por hidrólise de um dos grupos metilsulfonilo, formam espontaneamente espécies químicas alquilantes, como as 1-acilo-1,2-di (metilsulfonil)-2-(2-cloroetil)-hidrazinas. Lyttle *et al.* (1994) descobriram que a conjugação do glutatióno com um fosforodiamidato de mostarda catalisada por enzimas

glutathione *S*-transferase levava à formação do conjugado  $\gamma$ -glutamil- $\alpha$ -amino- $\beta$ -[[2-etil-N,N,N',N'-tetraquis (2-cloroetil) fosfordiamidato] sulfonil] propionilglicina, um outro tipo de composto alquilante fortemente reactivo.

### 1.4.3. Classificação

A classificação dos enzimas glutathione *S*-transferase foi, originalmente realizada de acordo com as propriedades físicas e catalíticas dos respectivos isoenzimas e, posteriormente, confirmada pela clonagem de cDNAs de diferentes isoenzimas (Mannervik e Danielson, 1988, Meyera *et al.* e Meyerb, 1991). Observou-se, então, que em geral para os isoenzimas da mesma classe a sua homologia sequencial era superior a 70%, enquanto que entre as diferentes classes de isoenzimas citosólicos a homologia sequencial era de aproximadamente 40% (Armstrong, 1991, Gulick e Fahl, 1995).

Actualmente, os enzimas glutathione *S*-transferase de mamíferos podem ser agrupados em, pelo menos, cinco classes evolutivas designadas por  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\nu$  e  $\theta$  no citosol e uma classe evolutiva na fracção microsomal. Todas elas são definidas de acordo com o tipo de substratos e inibidores específicos, com o tipo de reactividade cruzada com anticorpos e pela análise sequencial da sua estrutura primária (Mannervik *et al.*, 1985, Morgentern e DePierre, 1988, Meyer *et al.*, 1991, Mannervik, *et al.*, 1992, Awasthi *et al.*, 1994, Gulick e Fahl, 1995, Hayes e Pulford, 1995, Jakobson *et al.*, 1997, Ouwerkerk-Mahadevan *et al.*, 1997, Lohr, *et al.*, 1998). Cada classe subdivide-se em duas ou três subfamílias representadas por diferentes tipos de subunidades (Hayes e Pulford, 1995, Jakobson *et al.*, 1997, Ouwerkerk-Mahadevan *et al.*, 1997, Lohr, *et al.*, 1998).

#### 1.4.4. Distribuição e localização celular

A distribuição dos enzimas glutathione *S*-transferase, em mamíferos, é muito ampla, podendo ser detectada em órgãos que participam activamente na biotransformação e excreção de xenobióticos, e de electrófilos endógenos, como o fígado, os rins, os intestinos e os pulmões, ou em órgãos do sistema neuro-endócrino, como o pâncreas, o cérebro, a tiróide, as supra-renais, os ovários, os testículos e o timo (Spearman e Leibman, 1984, Nicoll-Griffith, 1995, Gandy *et al.*, 1996, Otieno *et al.*, 1997, Rowe *et al.*, 1998, Jakobsson *et al.*, 1998, Vargas *et al.*, 1998, Lawrence *et al.*, 1998).

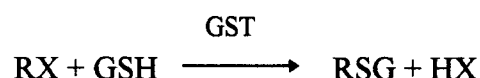
O nível de expressão dos diferentes isoenzimas glutathione *S*-transferase é específico de cada tecido e do tipo de compartimentação celular que o mesmo possui (Hayes e Pulford, 1995, Gandy *et al.*, 1996, Rowe *et al.*, 1998, Lawrence, 1998).

Hayes e Pulford (1995) observaram que, nos seres humanos, os isoenzimas da classe  $\alpha$  são mais abundantes no fígado e rins, enquanto que os da classe  $\pi$  predominam na placenta, mamas, pulmões, próstata e eritrócitos. Gandy *et al.* (1996) observaram também que as formas isomorfas presentes nos túbulos seminíferos dos testículos de rato são diferentes das encontradas nas células de Leydig do interstício.

Os enzimas da família glutathione *S*-transferase dos mamíferos encontram-se preferencialmente localizados no citoplasma (Spearman e Leibman, 1984, Sipes e Gandolfi, 1991, Nicoll-Griffith *et al.*, 1995) e no retículo endoplasmático (Sipes e Gandolfi, 1991, Jakobsson *et al.*, 1997, Otieno *et al.*, 1997) observando-se, em regra, valores mais elevados para as actividades enzimáticas determinadas no citosol (Sipes e Gandolfi, 1991). No tecido hepático, cerca de 55% das proteínas do citosol de ratos e murganhos pertencem à família glutathione *S*-transferase (Wilce e Parker, 1994).

### 1.4.5. Reacção

As reacções de conjugação mediadas pelos enzimas glutathione *S*-transferase envolvem a formação de uma ligação tioéster entre o glutathione e um composto electrófilo e podem ser representadas pela equação geral:



onde RX representa o composto electrófilo, GSH o glutathione na forma tiólica e RSG o conjugado resultante do processo.

Os substratos hidrófobos dos enzimas glutathione *S*-transferase possuem, em geral, um átomo de carbono electrófilo e reagem não enzimaticamente com o glutathione a uma taxa razoavelmente mensurável. O seu tamanho molecular varia desde pequenas moléculas como o diclorometano (Meyer, *et al.*, 1991) até hidrocarbonetos aromáticos de grandes dimensões como o benzo [*a*] pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BPDE) (Jernstrom *et al.*, 1982, Ho e Fahl, 1984a). Entre os exemplos conhecidos destacam-se os haletos de alquilo e de arilo, as lactonas, os epóxidos, as quinonas e os ésteres e alcenos activados (Mannervik e Danielson, 1988 Wilce e Parker, 1994, Gulick e Fahl, 1995, Dafré *et al.*, 1996).

Usualmente, o ataque nucleófilo dos enzimas glutathione *S*-transferase dá-se a átomos de carbono electrófilos do substrato. No entanto, os átomos de azoto electrófilos dos ésteres azotados, os átomos de enxofre dos tiocianatos orgânicos e dissulfuretos e os átomos de oxigénio dos hidroperóxidos orgânicos também podem servir como alvos alternativos (Jakoby e Ziegler, 1990; Ouwerkerk-Mahadevan, 1997, Lohr *et al.*, 1998).

#### 1.4.6. Caracterização estrutural

A eluição cromatográfica de fracções ricas em enzimas glutathione *S*-transferase do citosol hepático revelaram a existência de uma ampla variedade de isoenzimas diméricos que diferem entre si consoante a composição das respectivas subunidades (Gulick e Fahl, 1995, Lohr *et al.*, 1998). Estes enzimas são, em regra, constituídos por duas subunidades com dois centros activos por dímero.

Cada centro activo é constituído por, pelo menos, duas regiões, uma que reconhece o glutathione e outra que reconhece o substrato electrófilo. Esta última é menos específica e confere a estes enzimas a capacidade para reagir com uma ampla variedade de compostos (Mannervik e Danielson, 1988, Gulick e Fahl, 1995, Lohr *et al.*, 1998). Do ponto de vista estrutural, os membros de qualquer das classes atrás referidas, são constituídos por duas subunidades com homologia sequencial entre 60% e 80%, massa molecular na ordem dos 24-28 kDa, especificidade sobreponível para diferentes substratos e funcionamento autónomo.

Os enzimas glutathione *S*-transferase do citosol podem existir como homo ou heterodímeros, por serem codificados por genes múltiplos, ou devido à hibridação dos próprios monómeros. Nos seres humanos, por exemplo, os enzimas das classes  $\alpha$ ,  $\mu$ , e  $\pi$  são o produto de pelo menos seis *loci* de genes: A1, A2 para a classe  $\alpha$ , M1, M2, M3, M4, M5 para a classe  $\mu$  e P1 para a classe  $\pi$ . É provável que todos os enzimas glutathione *S*-transferase sejam codificados a partir de um gene comum, com excepção, talvez, da família microsomal que não apresenta homologia sequencial elevada com os enzimas citosólicos. Não foram identificados heterodímeros entre as moléculas das diferentes classes. Por vezes, a heterogeneidade observada entre os enzimas glutathione *S*-

transferase resulta de modificações covalentes pós-transcricionais de que são exemplo as reacções de glicosilação das subunidades enzimáticas (Wilce e Parker, 1994).

#### 1.4.7. Via metabólica de formação de ácidos mercaptúricos

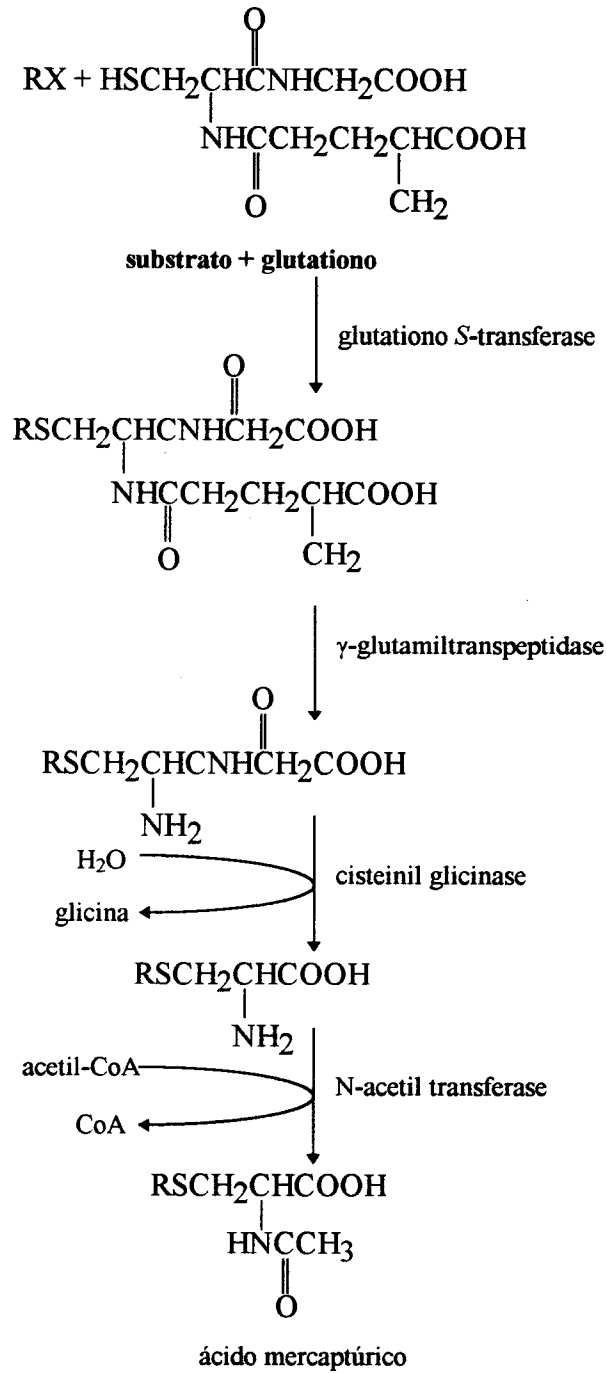


Fig 1.5 Via metabólica de formação de ácidos mercaptúricos

A formação da ligação tioéster entre o átomo de carbono electrófilo de um determinado composto químico e o grupo sulfidrilo do glutationo mediada pelos enzimas glutationo *S*-transferase constitui um dos primeiros passos da via que leva à formação de ácidos mercaptúricos, pela qual compostos hidrófobos podem ser inactivados e eliminados do organismo, ao serem convertidos em derivados mais polares facilmente excretáveis (Armstrong, 1991, Gulick e Fahl, 1995).

As etapas reaccionais posteriores envolvem a remoção dos resíduos ácido glutâmico e glicina, mediadas pelos respectivos enzimas  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase e cisteinil glicinase, e a acetilação do grupo amina da cisteína com a formação de conjugados *N*-acetilados deste aminoácido, vulgarmente designados por ácidos mercaptúricos. Esta última reacção é mediada pelo enzima *N*-acetiltransferase que utiliza como cofactor o acetil-CoA (Sipes e Gandolfi, 1991, Lohr, *et al*, 1998).

Esta via de excreção é complementada por um sistema excretor transmembranar de conjugados do glutationo dependente do ATP (Wilce e Parker, 1994).

#### 1.4.8. Modulação da actividade enzimática

O papel desempenhado pelos enzimas glutationo *S*-transferase na metabolização de substratos electrófilos potencialmente tóxicos torna premente discutir a regulação deste sistema de defesa molecular. Um tema fortemente estudado está relacionado com o envolvimento dos enzimas glutationo *S*-transferase nos processos de resistência celular a medicamentos utilizados no tratamento de neoplasias. Este efeito pode ser ultrapassado impedindo a expressão elevada destes enzimas em populações tumorais resistentes ao fármaco utilizando inibidores específicos ou destruindo as células tumorais resistentes por administração de pró-drogas tiol-activadas (Gulick e Fahl, 1995). Resultados

experimentais sugerem que o nível de expressão dos enzimas glutathione *S*-transferase é um factor crucial na determinação da sensibilidade celular a um espectro amplo de compostos químicos. O controlo biológico da expressão das diferentes famílias é complexo e, como veremos nas secções 1.6 e 1.7, depende do sexo, da idade, do tecido, da espécie, e/ou do modelo de expressão característico de um determinado tumor. Por outro lado, os enzimas glutathione *S*-transferase podem ser regulados pós-transcricionalmente por vários xenobióticos obtidos por síntese química ou que existem como constituintes não-nutritivos dos vegetais e dos citrinos (Hayes e Pulford, 1995, Lash *et al.*, 1998). Nas secções 1.4.8.1. e 1.4.8.2 iremos descrever alguns aspectos da regulação da expressão genética dos enzimas glutathione *S*-transferase e caracterizar alguns dos seus inibidores.

#### 1.4.8.1. Regulação da expressão genética

Os estudos efectuados na última década para o esclarecimento do mecanismo de indução da expressão dos genes codificantes dos enzimas glutathione *S*-transferase sugerem a participação de dois tipos de indutores: os bi e os monofuncionais (Prochaska e Talalay, 1988, Fernandes *et al.*, 1996).

Os indutores bifuncionais são, em geral, compostos planares, aromáticos, policíclicos, reconhecidos por receptores do tipo “Ah” como ligandos. Consequentemente, os compostos deste tipo comportam-se igualmente como indutores de algumas famílias de citocromos P450. Em contrapartida, os indutores monofuncionais não apresentam um arranjo estrutural comum nem exercem um efeito significativo sobre isoenzimas do sistema P450 cuja indução dependa do receptor “Ah”.



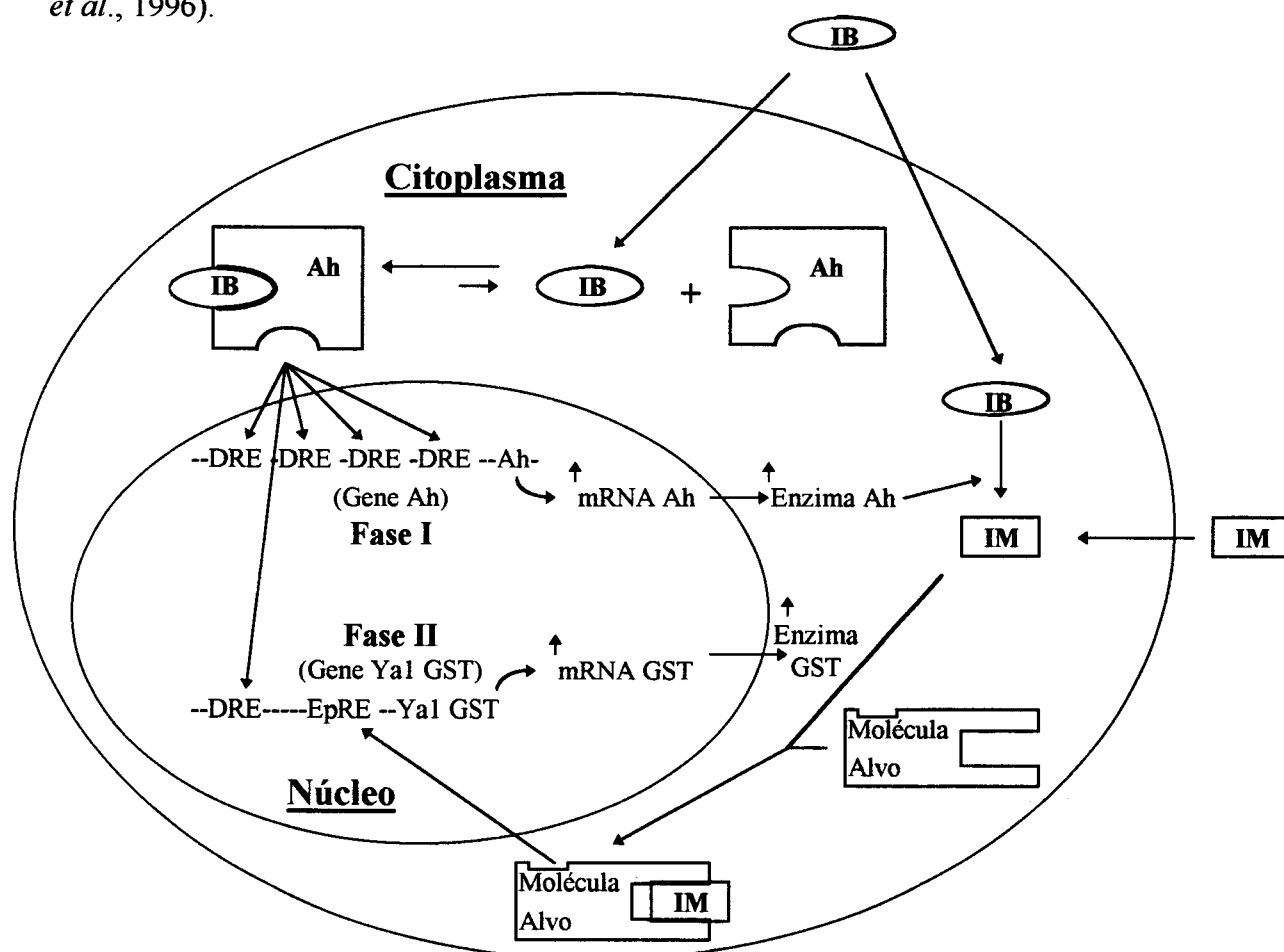
A análise das sequências reguladoras das regiões 5' do gene *GSTY<sub>a1</sub>* de rato e de carneiro revelou que a indução das subunidades constituintes dos enzimas glutatióno *S*-transferase dependente dos receptores "Ah" é regulada por uma sequência "enhancer" conhecida como elemento de resposta à dioxina (DRE), que já foi referida no ponto 1.3. a propósito da regulação da expressão genética de alguns enzimas citocromo P450. Foi igualmente observado que os indutores bifuncionais são produtos das reacções mediadas por citocromos P450 cuja indução depende igualmente de receptores "Ah" (Prochaska *et al.*, 1985, Rushmore e Pickett, 1990, Friling *et al.*, 1990, 1992, Jaiswal, 1994).

Para além da sequência DRE, existe uma segunda região nos genes que codificam subunidades dos enzimas glutatióno *S*-transferase denominada elemento de resposta electrófila (EpRE), que contém duas sequências "AP-1-like" separadas por três a oito nucleótidos (Jaiswal, 1994) e que são estimuladas quer pelos produtos da primeira fase de biotransformação quer pelos indutores monofuncionais. (Rushmore e Pickett, 1990, Friling *et al.*, 1990, Fernandes *et al.*, 1996). Estes resultados permitiram construir um diagrama explicativo que representa, na figura 1.5., o processo.

Embora tenham sido identificadas sequências EpRE em vários genes que codificam os enzimas glutatióno *S*-transferase, o factor de transcrição responsável pela indução enzimática ainda não foi inequivocamente identificado.

O mecanismo preciso pelo qual os indutores monofuncionais regulam a expressão dos genes codificantes dos enzimas glutatióno *S*-transferase não está ainda esclarecido. Prochaska *et al.* (1985) sugeriram que o sinal para a indução enzimática poderia ser desencadeado pelas propriedades electrófilas das formas activas dos indutores (cGST) ou pelo ciclo de oxidação-redução do glutatióno (mGST) (Aniya *et al.*, 1993, Dafré *et al.*, 1996).

Embora o stress oxidativo e/ou o ciclo redox do glutationo, possam estar envolvidos neste mecanismo de indução, vários autores admitem que esta só ocorre após o estabelecimento de uma ligação covalente entre indutor electrófilo e uma proteína reguladora, como está esquematizado na figura 1.6 (Talalay *et al.*, 1988, Rushmore *et al.*, 1991, Prester *et al.*, 1993, Bergelson *et al.*, 1994, Pinkus *et al.*, 1995 e Fernandes *et al.*, 1996).



**Fig.1.6** Regulação da transcrição dos enzimas citocromo P450 e glutatióno *S*-transferase por indutores monofuncionais (IM) e bifuncionais (IB). Como podemos observar na figura, a indução enzimática dá-se através de uma modificação covalente de uma proteína alvo. Os indutores bifuncionais actuam por dois mecanismos: O primeiro implica a ligação ao receptor Ah e conseqüente interacção com sequências “enhancer” “DRE” que induzem citocromos P450 e subunidades dos enzimas glutatióno *S*-transferase, o segundo resulta do aumento acentuado da concentração de citocromos P450 que convertem os indutores bifuncionais em derivados metabolicamente estruturalmente parecidos com os indutores monofuncionais (adaptado de Fernandes *et al.*, 1996).

Embora alguns factores de transcrição da família fos/jun se liguem de forma activa às sequências EpRE (Friling et al, 1992, Li e Jaiswal, 1992), não se pode admitir inequivocamente que esses factores de transcrição estejam directamente relacionados com o processo indutivo, uma vez que nem sempre se observa a indução de genes construídos com o promotor EpRE ligado a região codificante do gene “CAT reporter” (Neguyen *et al.*, 1994, Favreau e Pickett, 1993, Fernandes *et al.*, 1996).

#### 1.4.8.2. Inibidores

Os compostos que se comportam como inibidores *in vivo* dos enzimas glutathione *S*-transferase têm sido utilizados como auxiliares preciosos no esclarecimento e na regulação dos mecanismos moleculares de resistência adaptativa à acção de fármacos e de toxicidade dos xenobióticos.

Tew *et al.* (1988) observaram que o ácido etacrínico, um composto com propriedades diuréticas, comportava-se como um inibidor eficaz de isoenzimas glutathione *S*-transferase em culturas de células Walker 256 de carcinoma mamário de rato, citotóxicamente sensíveis ao clorambucil. O efeito observado foi bastante mais elevado na linhagem celular WR que expressava níveis mais elevados de glutathione *S*-transferase do que na linha celular WS parental.

A utilização *in vivo* do ácido etacrínico pode ter consequências deletérias para a célula uma vez que o composto, ao comportar-se como substrato das reacções de conjugação com o glutathione, pode levar a um acentuado decréscimo do conteúdo intracelular do tripéptido (Ouwerkerk-Mahadevan, 1997).

Por outro lado, em muitos casos, o aumento da sensibilidade celular a um determinado xenobiótico pode também provocar um aumento da toxicidade sistémica do mesmo.

Ciaccio *et al.* (1990) observaram *in vitro* que o ácido etacrínico, numa concentração da ordem dos micromolar, era capaz de inibir a conjugação do glutatióno com o clorambucil mediada por um enzima glutatióno *S*-transferase para um valor 20x inferior ao determinado sem a presença do inibidor, potenciando o efeito do clorambucil e dificultando a sua eliminação.

A maior parte dos inibidores conhecidos comportam-se como o ácido etacrínico actuando indiscriminadamente sobre todos os isoenzimas. Por esse motivo, tem aumentado a procura de inibidores específicos para cada classe pois, com esses compostos, poder-se-á compreender melhor o papel *in vivo* dos enzimas glutatióno *S*-transferase nos processos de biotransformação e de toxicidade. Por exemplo, Adang *et al.* (1990) sintetizaram e testaram novos inibidores estruturalmente semelhantes ao glutatióno mas específicos de classes particulares de isoenzimas glutatióno *S*-transferase, substituindo o resíduo C-terminal glicina por  $\beta$ -alanina ou fenilglicina e/ou bloqueando o grupo tiol da cisteína com grupos arilo ou alquilo. O efeito devido à substituição da glicina pela  $\beta$ -alanina ou pela fenilglicina foi confirmado pelo registo de alterações catalíticas selectivas ao nível dos valores das constantes de inibição  $K_i$  dos isoenzimas das classes  $\alpha$ ,  $\mu$  e  $\pi$  (Adang *et al.*, 1990, Lyttle *et al.*, 1994). Posteriormente, Ouwerkerk *et al.* (1995, 1996, 1997) observaram que o composto Et-R-Hep ((R)-5-etoxicarbonil-2- $\gamma$ -(S)-glutamilami-no-N-2-heptilpenta-mida), um derivado do glutatióno, comportava-se *in vivo* como um inibidor eficaz dos isoenzimas glutatióno *S*-transferase das classes  $\alpha$  e  $\mu$  de rato, sendo o efeito inibitório mais pronunciado sobre os isoenzimas da classe  $\alpha$ .

## 1.5. Glutathione redutase

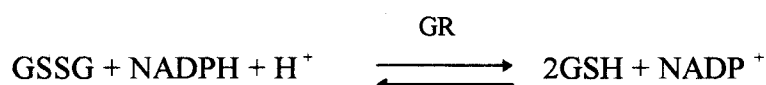
### 1.5.1. Perspectiva histórica

O enzima glutathione redutase foi descoberto em estudos realizados independentemente por Mapson e Goddard (1951) e Conn e Vennesland (1951) sobre a redução do glutathione em tecidos vegetais. Pouco tempo depois, Rall e Lehninger (1952) purificaram-no a partir de leveduras e do tecido hepático de rato tendo constatado que catalisava a redução da forma dissulfureto do glutathione (GSSG), utilizando o NADPH como cofactor. Contudo, só em 1963 Buzard e Kopko mostraram pela primeira vez que o glutathione redutase era uma flavoproteína .

Estudos realizados por Pinto *et al.*, em 1973, e Lopez-Barea e Lee, em 1979, em *Sacch. Cerevisiae* e *E.Coli*, mostraram que o enzima pode ser regulado pelo estado de oxidação intracelular, ao sofrer auto-inactivação na presença de NADPH e reactivação pelo GSSG (Penninks e Elskens, 1993).

### 1.5.2. Papel biológico

O enzima glutathione redutase (GR) participa no ciclo de oxidação-redução do glutathione e tem como papel principal a manutenção da concentração de estado estacionário do glutathione na forma tiólica (GSH) (Buzard e Kopko, 1963, Jocheim e Baillie , 1994 , Gérard-Monier e Chaudiere, 1996), através da reacção:



### 1.5.3. Caracterização estrutural

O enzima glutathione redutase é uma flavoproteína dimérica cujo grupo prostético é o dinucleótido de flavina (FAD). A sua massa molecular é aproximadamente 110 kDa possuindo cada subunidade a mesma dimensão (Buzard e Kopko, 1963).

### 1.5.4. Modelação enzimática exercida pelo NADPH e pelo GSSG

Os equivalentes redutores, sob a forma de NADPH, utilizados na reacção mediada pelo enzima glutathione redutase, podem ser gerados por diferentes desidrogenases a partir de vários substratos.

Provavelmente, a via das pentoses fosfato o enzima isocitrato desidrogenase dependente do  $\text{NADP}^+$  serão as principais fontes de NADPH que assistem à reacção do glutathione redutase (Deleve e Klapovitz, 1990, Gérard-Monnier e Chaudiere, 1996, Mkee e Mkee, 1996, Nishida, 1996).

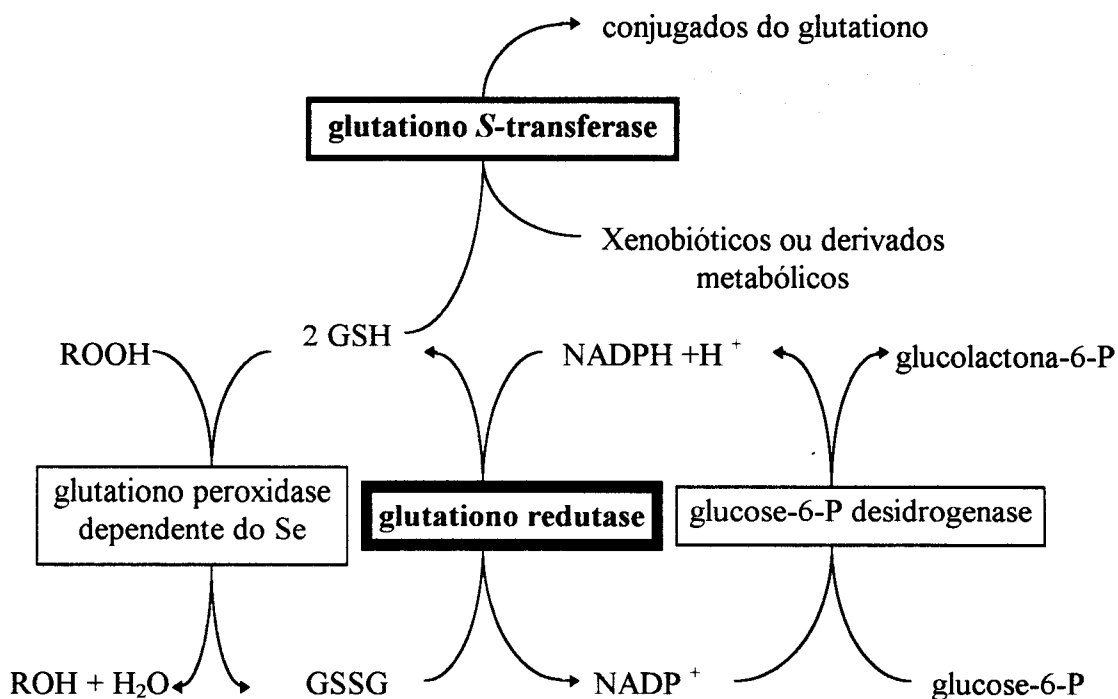
O coenzima NADPH, na ausência de GSSG, comporta-se como um inibidor dos enzimas glucose-6-P desidrogenase e glutathione redutase. No entanto, parece que as razões fisiológicas  $[\text{GSH}]/[\text{GSSG}]$  e  $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$  garantem a concentração de GSSG suficiente para manter a actividade basal destes enzimas.

Contudo, quando o conteúdo intracelular de GSSG aumenta, como acontece em condições de “stress” oxidativo, os enzimas glucose-6-P desidrogenase e glutathione redutase podem sofrer reactivação pelo glutathione na forma de dissulfureto, efeito esse que leva a um aumento do conteúdo intracelular de GSH.

Os equivalentes redutores do NADPH e do GSH conferem uma resposta dinâmica aos processos de metabolização de xenobióticos.

Alterações no conteúdo intracelular de GSH ou nos sistemas enzimáticos dependentes do GSH modelam fortemente a toxicidade de vários compostos químicos.

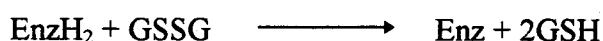
A figura 1.7 ilustra algumas interacções metabólicas estabelecidas pelo ciclo de oxidação-redução do glutathione que ajudam a compreender melhor esse facto.



**Fig 1.7** Interação metabólica entre o ciclo de oxidação-redução do glutathione e os enzimas, glutathione S-transferase e glucose-6-P desidrogenase, um dos geradores de equivalentes redutores sob a forma de NADPH (adaptado de Gérard-Monier, 1996, Mkee e Mkee, 1996).

### 1.5.5 Efeitos de alguns xenobióticos

A reacção mediada pelo glutatióno redutase decorre por dois passos que podem ser representados pelas semi-equações:



onde Enz representa a forma dissulfureto oxidada e EnzH<sub>2</sub> a forma tiólica reduzida, do enzima (Jocheim e Baillie, 1994). O enzima glutatióno redutase constitui, por esse motivo, um alvo potencial dos xenobióticos, em particular dos fármacos utilizados no tratamento de tumores resistentes à quimioterapia, uma vez que alguns inibidores, aproveitando as alterações particulares do centro activo, exercem o seu efeito, ligando-se com elevada especificidade ao seu grupo tiol (Jocheim e Baillie, 1994, Kassahun *et al.*, 1994).

Até à data, os principais estudos sobre a inibição do glutatióno redutase foram realizados com o *N,N*-bis-(2-cloroetil)-*N*-nitrosilureia (BCNU), um composto com propriedades antitumorais que se comporta, quer *in vitro* quer *in vivo*, como um inibidor potente e muito selectivo deste enzima. (Brundrett *et al.*, 1976, Frischer e Severe, 1977, Babson, e Reed, 1978, Karplus, *et al.*, 1988, Cohen e Duvel, 1988, Jocheim e Baillie, 1994).

O BCNU decompõe-se espontaneamente em condições fisiológicas numa série de derivados como o 2-cloro-etilisocianato (CEIC) que parece ser o principal responsável pela inibição enzimática observada (Babson e Reed, 1978, Karplus *et al.*, 1988). O CEIC é capaz de ligar-se ao grupo tiol do centro activo da forma reduzida do enzima,



impedindo que este exerça a sua actividade redutora (Karplus *et al.*, 1988). Parece que outras nitrosilureias que se convertem espontaneamente em isocianatos também exercem um efeito inibidor sobre o glutathione redutase por um mecanismo semelhante (Babson, e Reed, 1978).

O composto antitumoral *N*-metilformamida (NMF) promove o metabolismo dependente do citocromo P450, muito provavelmente, através de intermediários electrófilos reactivos metilisocianatos (MIC) que formam os conjugados tiocarbamatos S-(*N*-metilcarbamoil) com o glutathione (SMG) ou com a cisteína (SMC) (Threadgill, *et al.*, 1987, Slatter, *et al.*, 1991).

Estes conjugados têm-se mostrado moderadamente instáveis em condições fisiológicas, comportando-se como doadores de electrões para péptidos e proteínas onde os grupos sulfidrílo são carbamilados preferencialmente (Pearson, 1991, Baillie e Slater, 1991).

Tendo em conta o comportamento do CEIC e dos seus precursores metabólicos sobre o glutathione redutase, é possível que o SMG e o SMC possam comportar-se como inibidores e, deste modo, contribuir para as propriedades antitumorais do NMF (Jocheim, e Baillie, 1994).

As actividades enzimáticas do ciclo de oxidação-redução do glutathione no fígado alteram-se em murganhos tratados com tetracloreto de carbono. Em alguns trabalhos, a actividade do enzima glutathione redutase, por exemplo, diminuiu cerca de 80% relativamente ao controlo, na fase inicial do aparecimento das lesões hepáticas (Kumata, Wakui *et al.*, 1975, Watanabe e Nagashima, 1983, Di Simplicio e Mannervik, 1983, Harrisch e Meyer, 1985, Chagoya de Sánchez, Hernández-Munoz *et al.*, 1995, Ohta, Sasaki *et al.*, 1995, Ko *et al.*, 1995, Nishida *et al.*, 1996).

## 1.6. Aspectos da regulação hormonal nos sistemas de biotransformação de xenobióticos e de esteróides endógenos

### 1.6.1. Introdução

Os efeitos produzidos por alguns compostos exógenos em ratos fêmeas são, em geral, mais acentuados e manifestam-se por períodos mais longos do que nos machos, uma vez que, no período neo-natal e, por vezes, na puberdade, as hormonas séricas circulantes condicionam o perfil de expressão dos enzimas ligados à biotransformação de xenobióticos, na fase adulta (Dannan *et al.*, 1986, Shimada *et al.*, 1987, Pinot *et al.*, 1995, Oinonen e Lindros, 1998).

O perfil de expressão hepática dos isoenzimas citocromo P450 apresenta dimorfismo sexual e pode ser alterado quando se modifica o nível sérico de diferentes hormonas circulantes (Prough *et al.*, 1996, Oinonen e Lindros, 1998).

Os efeitos hormonais que regulam a expressão dos citocromos P450 resultam de um conjunto de interacções complicadas entre hormonas dependentes da hipófise como por exemplo, as hormonas da tiróide, a hormona do crescimento e os androgénios ou estrogénios produzidos pelas gónadas (Shapiro *et al.*, 1994).

Embora a acção hormonal sobre os enzimas da fase II de biotransformação seja menos conhecida, alguns estudos tem mostrado que a resposta enzimática também depende do sexo do individuo e dos níveis hormonais que lhe estão associados (Mulder, 1986, Zarida *et al.*, 1993).

Por exemplo, Zarida *et al.* (1993) realizaram um estudo onde procuraram avaliar o efeito da gonadectomia sobre as actividades glutatióno *S*-transferase e glutatióno

redutase hepáticas. Os resultados obtidos mostraram que estas actividades enzimáticas possuíam valores mais elevados nos machos controlo do que nas fêmeas.

Por um lado, a ovariectomia provocou um aumento das actividades glutathione *S*-transferase e glutathione redutase que foi contrariado pela suplementação hormonal das fêmeas castradas com estradiol, progesterona ou estradiol e progesterona.

Por outro lado, orquidectomia provocou uma diminuição das actividades glutathione *S*-transferase e glutathione redutase para valores próximos dos obtidos para as fêmeas controlo, mas a suplementação com testosterona repôs estas actividades para os níveis determinados no fígado dos animais intactos. Os resultados obtidos levaram os autores a sugerir a modelação destas actividades enzimáticas pelas hormonas sexuais.

#### 1.6.2. Interacção hormonas sexuais-hormona do crescimento

O perfil de secreção da hormona de crescimento (GH) parece estar correlacionado com o dimorfismo sexual que se observa na expressão dos citocromo P450, pois parece que a secreção intermitente desta hormona nos machos condiciona a expressão de genes *CYP* dominantes ou específicos dos machos (Skett, 1990, Waxman, *et al*, 1988, 1995, Oinonen e Lindros, 1998).

Nas fêmeas, pelo contrário, a libertação contínua da mesma hormona condiciona a expressão de genes *CYP* característicos das fêmeas. A libertação dos factores hormonais que regulam a secreção da hormona do crescimento é controlada por neuropéptidos produzidos no hipotálamo através de um mecanismo de “feedback” (Oinonen e Lindros, 1993, 1995, Lindros, 1997).

Os androgéneos controlam a expressão de vários enzimas característicos dos machos que participam na metabolização de esteróides. Tal facto tem sido confirmado

por vários investigadores que observaram uma diminuição das actividades hidroxilase de esteróides no fígado provocada pela orquidectomia, um efeito que pôde em muitos casos ser contrariado pela administração de testosterona (Gustafsson *et al.*, 1974, Skett, 1990).

Estudos realizados com ratos hipofisectomizados sugeriram que os androgéneos não actuam directamente sobre o fígado, mas sim através de interacções sobre o eixo hipotálamo-hipófise (MacGeoch, *et al.*, 1985, Kato *et al.*, 1986, Oinonen e Lindros, 1993, 1995, 1998).

Shimada *et al.* (1987) observaram que o produto da expressão hepática do *CYP2C11* responsável pelas actividades hidroxilase da testosterona nas posições 2 $\alpha$  e 16 $\alpha$  ocorre preferencialmente nos machos, enquanto que o produto da expressão hepática do *CYP2C12* responsável pela actividade 15 $\alpha$ -hidroxilase do dissulfato de androstenodiol manifesta-se preferencialmente nas fêmeas.

Os referidos autores observaram ainda que a hipofisectomia inibia a expressão da do *CYP2C11* nos machos mas aumentava nas fêmeas, as quais deixavam de expressar o *CYP2C12*.

A recuperação do perfil de expressão foi conseguido com a administração de hormona de crescimento, mas o modo de administração condicionou a resposta, ou seja, quando este simulava a secreção intermitente masculina observava-se uma recuperação da expressão do *CYP2C11* nos machos e uma indução da expressão nas fêmeas (Morgan *et al.*, 1985). No entanto, quando se procedia a uma administração por infusão contínua observava-se a expressão do *CYP2C12* em ambos os sexos (MacGeogh *et al.*, 1985).

O perfil de secreção da hormona do crescimento também condiciona o modo de expressão de outros *CYP* específicos ou que predominam num dos sexos (Shapiro, 1994). Por exemplo, a expressão dos genes *CYP1A2*, *CYP2C13*, *CYP3A2* e *CYP4A2*,

que codificam isoenzimas característicos dos machos, e dos genes *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A1* e *CYP3A18*, que codificam isoenzimas predominantes nos machos, é induzida pela hipofisectomia em ambos os géneros (Oinonen e Lindros, 1998)

A presença contínua da hormona de crescimento estimula a expressão dos genes *CYP2C12* e *2C79* que ocorre preferencialmente nas fêmeas e reprime a expressão dos genes *CYP2C11*, *CYP2C13*, *CYP2B* e *CYP3A1* típica dos machos (Guzelian *et al.*, 1988; Schuetz, *et al.*, 1990; Murayama, *et al.*, 1991).

Waxman *et al.* (1995), Ram *et al.* (1996) e Gebert *et al.* (1997) descobriram uma proteína activadora da expressão genética designada por “stat5” que actua como mediadora intracelular dos efeitos estimulatórios da hormona de crescimento nos machos.

A expressão do *CYP2C12* parece estar também sujeita a um factor regulador nuclear da hormona de crescimento (Waxman *et al.*, 1996).

### 1.6.3. Influência das hormonas da tiróide

As hormonas da tiroide também afectam a expressão dos *CYP* (MacGeoch *et al.*, 1985). Um conteúdo hepático elevado das formas *CYP1A2*, *CYP2A1*, *CYP2A2*, *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A1* e *CYP3A2* foi observado em ratos hipofisectomizados, tiroidectomizados e com atrofia da tiróide.

O efeito pode ser contrariado pela administração das hormonas T3 ou T4 (Oinonen e Lindros, 1997, 1998). Por outro lado, a administração de hormonas da tiróide a ratos hipofisectomizados ou com atrofia da tiróide estimulou a expressão do *CYP2C7* (Ram, 1990).

#### 1.6.4. Influência da insulina

Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que a insulina afecta acentuadamente o conteúdo de vários isoenzimas CYP assim como as actividades a eles associadas no fígado.

Em estudos efectuados com ratos nos quais foi induzida a diabetes pela streptozocina, observou-se um aumento das actividades enzimáticas hepáticas e da expressão dos *CYP2A1*, *CYP2C6*, *CYP2C7*, *CYP2E1*, *CYP3A2*, *CYP4A2* e *CYP4A3* (Barnett *et al.*, 1994), ocorrendo apenas uma diminuição da expressão do *CYP2C11* específica dos machos (Yoshita, 1996). Estes resultados, conjugados com estudos realizados com hepatócitos isolados nos quais foi observada a repressão da expressão dos *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP1A1*, *CYP1A2* pela insulina (Oinonen e Lindros, 1998), sugerem que esta hormona poderá participar na inibição da expressão hepática da maior parte dos genes *CYP* (Barker *et al.*, 1994). No entanto, como o nível da hormona de crescimento se apresenta diminuído na diabetes hormonal, a interpretação dos resultados torna-se complicada.

#### 1.6.5. Influência dos glucocorticóides

Prough *et al.* (1996) estudaram o efeito das hormonas esteróides, em particular dos glucocorticóides, sobre a expressão de genes regulados pelo receptor "Ah", ao tentarem compreender situações patológicas graves descritas por Hesselmeyer *et al.* (1979), em fetos e crianças filhas de mães fumadoras ou que tivessem estado expostas a compostos aromáticos policíclicos durante a gestação e o desenvolvimento neo-natal.

Prough *et al.* (1996) demonstraram, então, que a maioria dos genes induzidos por receptores “Ah” são regulados por glucocorticóides e podem desempenhar um papel importante na expressão basal destes genes ao longo do desenvolvimento. Utilizando modelos animais deficientes em glucocorticóides e culturas de hepatócitos de rato observaram que a indução do *CYP1A1* por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e da subunidade glutathione *S*-transferase *Ya1*, duplicava ou quadriplicava na presença de glucocorticóides, resultados estes que parecem ser concordantes com a hipótese formulada em 1988 por Abramovitz e Listowski onde estes autores admitiram que as variações naturais na expressão do gene *GSTYa1* de rato, durante o desenvolvimento reflectiam, em parte, as variações dos níveis de glucocorticóides circulantes no sangue fetal, neonatal e adulto.

Hayes *et al.* (1996), num estudo realizado com ratos machos e fêmeas Fischer 344 de várias idades, observaram que os animais sexualmente maduros apresentavam dimorfismo sexual na expressão do gene *GSTYc<sub>2</sub>*, responsável pela resistência aos efeitos genotóxicos provocados pela aflotoxina B1. Os autores observaram que, após indução com fenobarbital, 3-metilcolantreno e dieta deficiente em selênio, a subunidade *Yc2* só estava expressa no fígado das fêmeas, o que parece justificar a relativa insensibilidade destas à aflotoxina B1.

#### 1.6.6. Via neuroendócrina timo-fígado

Estudos clínicos e experimentais ao longo das últimas três décadas têm reconhecido ao timo o papel de glândula-mestre da imunidade. Contudo, evidências experimentais têm também reconhecido ao timo um papel importante no sistema

endócrino. Na década de 80, surgiram muitas publicações relacionadas com as interacções entre o timo e o sistema neuroendócrino.

Rebar *et al.* (1980) observaram que murganhos congenitamente atímicos possuíam uma concentração baixa da hormona luteinizante, da hipófise (LH) e da hormona foliculo-estimulante (FSH) que podiam ser elevadas para valores normais quando se efectuava um transplante do timo no primeiro dia de vida.

Rebar *et al.* (1980, 1981) e Grossman (1985) também descobriram que a timosina da fracção 5 purificada e um dos seus componentes peptídicos sintéticos, a timosina  $\beta$ 4, estimulavam a secreção da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) em fêmeas de rato.

Experiências realizadas *in vitro* com perfusão do hipotálamo e da hipófise demonstraram que as hormonas tímicas: timosina da fracção 5 e timosina  $\beta$ 4 estimulavam a secreção da hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH) pelo hipotálamo, induzindo a libertação da hormona luteinizante LH pela hipófise (Rebar *et al.*, 1983, Michael *et al.*, 1983).

Healy *et al.* (1983) observaram que a timectomia de macacos juvenis induzia um decréscimo na concentração de cortisol, corticotropinas e  $\beta$ -endorfinas plasmáticas, efeito esse que pôde ser contrariado pela administração intravenosa de timosina da fracção 5.

Geenen *et al.* (1989) observaram que os neuropéptidos ocitocina (OT) e vasopressina (VP) eram sintetizados no tímo humano de forma semelhante aos produzidos no sistema hipotálamo-neuro-hipófise. Os mesmos autores também observaram que a ocitocina e a vasopressina desempenhavam um papel activo na diferenciação e activação das células T (Geenen *et al.*, 1989). Os resultados atrás



referidos levaram Geenen *et al.* a proporem a existência de um conjunto de interações recíprocas entre o timo e o sistema neuroendócrino (Geenen *et al.*, 1989).

Li *et al.* (1990) observaram que o timo pode influenciar o metabolismo hepático através do sistema neuroendócrino. Os autores, utilizando como modelo ratos machos Wistar adultos timectomizados, observaram que o conteúdo em citocromo P450 microssomal hepático e a actividade aminopirina *N*-desmetilase diminuía quatro, seis e oito meses após a timectomia, sendo observada maior variação nos machos.

Considerando o dimorfismo sexual da resposta à timectomia, os autores suspeitaram que as hormonas sexuais podiam actuar como mediadoras entre o timo e o fígado. Na segunda parte do estudo, procuraram avaliar os efeitos das hormonas sexuais nas funções do fígado e observaram que as hormonas LHRH e LH plasmáticas declinavam dois a três meses após a timectomia dos ratos machos. No entanto, o decréscimo da testosterona plasmática só ocorreu quatro, seis e oito meses após a ablação do timo. A reposição do conteúdo em citocromo P450 e da actividade aminopirina *N*-desmetilase foram alcançadas com a administração subcutânea do androgénio propionato de testosterona (Li *et al.*, 1990). Nas fêmeas, a LHRH e o estradiol plasmático também diminuíram, mas seis meses após a timectomia. A administração do estrogénio benzoato de estradiol inverteu a variação observada.

Numa terceira fase do estudo, Li *et al.* observaram que o conteúdo em citocromos P450 e a actividade aminopirina *N*-desmetilase eram inferiores em ratos castrados, ocorrendo um efeito superior nos machos (Li *et al.*, 1993). O tratamento dos ratos machos castrados com propionato de testosterona restaurou a actividade enzimática para os níveis normais, enquanto que a administração de benzoato de estradiol às fêmeas castradas não produziu efeitos significativos.

Em resumo, Li *et al.* (1993) admitiram a existência de uma nova via neuroendócrina na qual o timo desempenhará um papel importante na manutenção dos sistemas enzimáticos hepáticos de biotransformação de xenobióticos que depende de uma série de interações ao nível do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, como se representa na figura 1.8.

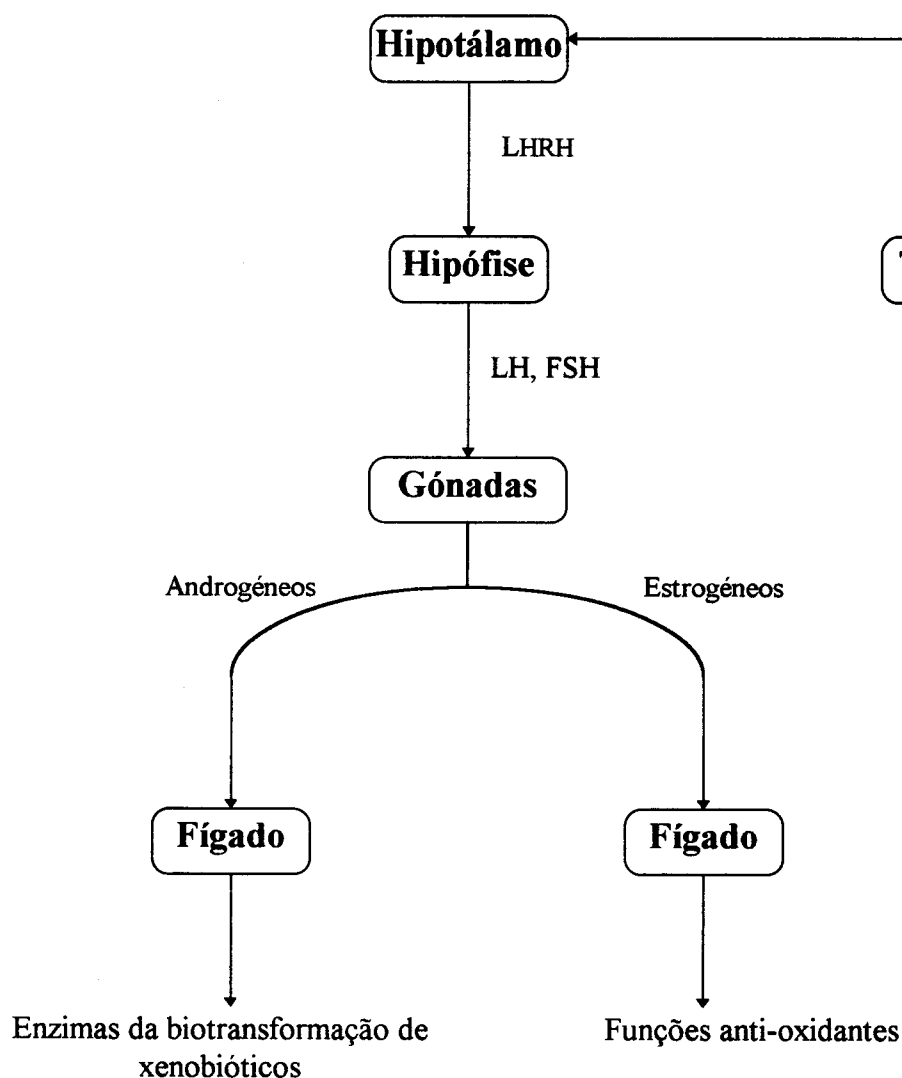


Fig.1.8 Via neuroendócrina timo-fígado (adaptado de Li *et al.*, 1993)

## 1.7. Influência da idade na biotransformação de xenobióticos e de esteróides endógenos

Ao longo da vida, os animais, apresentam alterações metabólicas que se traduzem muitas vezes, por perfis de expressão diferentes dos vários sistemas enzimáticos ligados à biotransformação de xenobióticos e de compostos endógenos que, por si só, podem explicar a diferença de sensibilidade a vários tóxicos observada ao longo do desenvolvimento (Finnen e Hassal, 1980, Pelkonen, 1985, Kamataki *et al.*, 1985, Anderson *et al.*, 1989, Juchau *et al.*, 1989, 1992, Fujita *et al.*, 1990, Imaoka, S., 1991, Raucy e Carpenter, 1993, Miller, 1994, Miller, 1996).

Nesta secção iremos descrever de forma sucinta alguns trabalhos onde os autores procuraram avaliar a influência da idade sobre os sistemas que participam na biotransformação de xenobióticos e esteróides endógenos

Rikans (1989), num estudo realizado com ratos fêmeas Fischer 344, com idade compreendida entre os 4 e os 25 meses, observou que a concentração total de citocromos P450 e a actividade NADPH (P450) redutase microsossomais do fígado diminuíam significativamente com a idade, mas a uma taxa inferior à observada por Schmucker e Wang (1980) em trabalhos semelhantes realizados com ratos machos Fischer 344. As actividades enzimáticas anilina hidroxilase, benzanfetamina *N*-desmetilase e nitroanisolo *O*-desmetilase também diminuíram com a idade, apresentando um perfil idêntico para qualquer dos substratos utilizados.

Fujita *et al.* (1990), ao pretenderem avaliar a influência da idade na resposta ao diazepam pelo sistema citocromo P450 de ratos machos e fêmeas Fischer 344 com idades compreendidas entre os 3 e os 30 meses de idade, observaram que, nos machos, as

actividades 3-hidroxilase e *N*-desmetilase do diazepam decresciam gradualmente com a idade até que se tornarem idênticas às das fêmeas durante a senescência.

As reacções de hidroxilação da testosterona pela fracção microsomal hepática estão bem caracterizadas e, como tal, torna-se fácil o reconhecimento da participação de citocromos P450 específicos na formação dos seus diferentes derivados metabólicos isoméricos. Por exemplo, a 7 $\alpha$ -hidroxilação da testosterona é quase exclusivamente catalisada pelos CYP2A1 (Levin et al., 1987), enquanto que a actividade 6 $\beta$ -hidroxilase é mediada pelos CYP3A, as actividades 2 $\alpha$ - e 16 $\alpha$ - hidroxilase pelo CYP2C11 (Guengerich, 1986, Gonzalez *et al.*, 1986, Waxman, 1988 Murray e Horsfield, 1990) e os CYP2B1, com actividades catalíticas muito baixas em ratos não submetidos a tratamento com indutores, participam na hidroxilação da testosterona nas posições 16 $\alpha$  e 16 $\beta$  (Guengerich, 1986).

Zangar *et al.* ( 1995) observaram que o tratamento neonatal de ratos machos Wistar com dietilestilbestrol ou com fenobarbital diminuía os níveis de proteína cinase C $\alpha$  e alterava o metabolismo da testosterona dos animais na idade adulta.

No entanto, os efeitos produzidos pelos dois compostos não eram sobreponíveis, pois o fenobarbital provocou um aumento para mais do dobro de quase todas as actividades hidroxilase da testosterona e o dietilestilbestrol inibiu as formas isoenzimáticas CYP2C11 e CYP3A específicas dos machos, induzindo a forma predominantemente feminina CYP2A1.

Vários autores têm considerado que as alterações observadas nas actividades enzimáticas do sistema citocromo P450 hepático dependiam do nível de testosterona circulante (Finnen e Hassal, 1980, Shimada 1987). Contudo, Zangar *et al.* (1995) só

observaram uma diminuição do conteúdo sérico em testosterona nos ratos tratados com dietilestilbestrol.

Resultados semelhantes já tinham sido obtidos por Dierenger *et al.* (1980) com ratos tratados no período neonatal com dietilestilbestrol ou com propionato de testosterona, mas nos quais também se observaram apenas alterações dos níveis de testosterona dos animais adultos tratados, no período neonatal, com dietilestilbestrol. Este tipo de resposta leva a supor que outros factores para além da testosterona circulante podem regular o metabolismo da testosterona mediado pelos citocromos P450 hepáticos.

A regulação da expressão da família *CYP3A* tem sido estudada em ratos e humanos mas o seu mecanismo permanece pouco claro. A sequência primária dos *CYP3A1* e *CYP3A2*, os dois membros melhor caracterizados desta família, apresenta uma homologia sequencial de aproximadamente 89% (Gonzalez *et al.*, 1986).

No entanto, o *CYP 3A1* apresenta um nível baixo de expressão em ratos Wistar que não tenham sido submetidos a tratamento com indutores (Gonzalez *et al.*, 1986; Ribeiro e Lechner, 1992) e o *CYP3A2* expressa-se no fígado logo após o nascimento, mas a sua expressão deixa de ocorrer quando as fêmeas atingem a maturidade sexual (Waxman *et al.*, 1985 Shimada *et al.*, 1989, Ribeiro e Lechner, 1992).

Em ratos machos Dark Agouti a evolução, com a idade, da concentração e das actividades enzimáticas dos citocromo P450 que participam no metabolismo da testosterona é diferente da que foi observada em ratos machos Fischer 344 e Wistar. Maeda *et al.* (1997) observaram que após a puberdade ocorria um pequeno decréscimo da concentração e das actividades enzimáticas do *CYP3A* em ratos fêmeas Dark Agouti mas nos machos, pelo contrário, aumentava.

Além disso, os machos adultos Dark Agouti, comparativamente com os ratos Wistar, possuem uma capacidade metabólica superior para a hidroxilação da testosterona na posição  $6\beta$ , a qual aumenta com a idade. Shimada *et al.* (1995) sugeriram a possibilidade de existir um factor independente dos androgéneos e da hormona de crescimento que controla a ontogenia destes citocromo P450 hepáticos.

Como os ratos Dark Agouti não expressam o *CYP2D1*, o aumento do conteúdo em *CYP3A* pode ser justificado pela existência de um substrato comum metabolizado pelos dois isoenzimas que não podendo ser metabolizado pelos *CYP2D* é, alternativamente, metabolizado pelos *CYP3A* (Liu *et al.*, 1995).

Maeda *et al.* (1997) propuseram ainda que a regulação da expressão do *CYP3A* em ratos machos Dark Agouti poderá ocorrer ao nível da transcrição e da tradução, uma vez que a quantidade de mRNA quantificada nos ensaios não se reflecte totalmente na quantidade de proteína expressa nem na actividade enzimática determinada.

Um estudo realizado por Masuda e Nukuzuma (1995) para avaliar a influência da idade na activação e/ou na inactivação de compostos mutagénicos específicos, como o fenobarbital, a furilfuramida e o 2-nitrofluoreno, pelo fígado de ratos machos Fischer 344 e de ratos machos e fêmeas Wistar, mostrou que as actividades enzimáticas dos sistemas de biotransformação de xenobióticos que participam na sua metabolização apresentavam dimorfismo sexual e dependiam da idade do animal.

Os ensaios foram realizados de acordo com o método de Ames *et al* (1975) ligeiramente alterado, utilizando pré-incubação de culturas de *Salmonella typhimurium* TA 98 com fracções pós-mitocondriais obtidas a partir do fígado de ratos Fischer 344, com três, seis, doze e vinte e quatro meses de idade e de ratos machos e fêmeas Wistar

com sete semanas de idade, seguido de incubação com um sistema gerador de NADPH e os cofactores das actividades UDP-glucuronosil transferase e glutathione *S*-transferase.

Os resultados obtidos sugeriram, ainda, que a eliminação de compostos que envolvam a activação pelo CYP2C11 e a inactivação por reacções de conjugação, como acontece com o fenobarbital, diminui com a idade do animal, assim como a eliminação de compostos como o 2-nitrofluoreno cuja inactivação seja exclusivamente mediada pelo sistema citocromo P450.

Contudo, a eliminação de compostos com acção mutagénica directa que não sejam biotransformados pela fracção pós-mitocondrial, como acontece com a furilfuramida, não variou em qualquer das idades estudadas (Masuda *et al.*, 1995).

Weinander *et al.* (1996) observaram que o perfil de distribuição dos enzimas glutathione *S*-transferase da fracção microsomal do fígado de ratos machos Wistar, determinado por técnicas imunoquímicas, aumentava acentuadamente desde o período neo-natal até aos 50 dias de idade, onde atinge um máximo, e decrescia suavemente até aos 100 dias, idade a partir da qual tendia para um patamar, com valores aproximadamente constantes até, pelos menos, aos 600 dias de vida.

Os estudos realizados para avaliar a influência da idade nos sistemas de biotransformação de xenobióticos e de compostos endógenos são raros e abrangem usualmente o período embrionário e neonatal, ou menos frequentemente a senescência animal. Poucas são, de facto, as publicações dedicadas à puberdade, fase do desenvolvimento onde ocorrem profundas alterações metabólicas, pelo que nos parece constituir um período da vida animal adequado para avaliarmos a forma como reagem, aos xenobióticos, os constituintes dos sistemas de biotransformação de compostos exógenos e de esteróides endógenos, eleitos para este estudo.

## 1.8. O Isoproturão como xenobiótico

### 1.8.1. Introdução

A utilização dos alimentos, as picadas de insectos e de alguns répteis, o emprego de plantas com finalidades medicinais ou a inalação de gases tóxicos libertados pela actividade vulcânica fez com que o homem desde a pré-história contactasse com moléculas potencialmente tóxicas (Decker, 1987, Manahan, 1990).

A história revela-nos que Hippocrates já chamava à atenção dos seus seguidores para os efeitos adversos de *venatrum album* e que a utilização de contentores em chumbo para o vinho poderia ter sido a principal causa de envenenamento por este metal no Império Romano. Embora os primeiros problemas sérios de contaminação ambiental na Europa começassem a surgir no século XVII devido ao o arrastamento de elevadas quantidades de resíduos das explorações mineiras e progredisse durante o século XVIII com a produção de corantes e outros produtos químicos orgânicos em paralelo com o desenvolvimento da industria do carvão (Manahan, 1990), só no século XX e, em particular, depois da segunda Guerra Mundial, a quantidade de desperdícios químicos aumentou exponencialmente devido ao desenvolvimento das industrias do aço, do chumbo, das baterias, do petróleo, do alumínio, dos medicamentos, da cosmética e da agricultura intensiva. Para além disso, foi durante este século que surgiram novos subprodutos manufacturados, como solventes clorados, fitofármacos, polímeros plásticos, tintas e conservantes da madeira, corantes e conservantes alimentares, entre outros, que diversificaram o tipo e acentuaram a quantidade de novos compostos com circulação ambiental (Manahan, 1990, Lu, 1991). Na década de 60, a poluição atmosférica e das águas nos países industrializados tornou-se, de facto, um problema



grave e de difícil resolução. O livro de Rachel Carson “Primavera silênciosa”, publicado em 1962, previa já que os danos ambientais provocados pelo uso indiscriminado de herbicidas e outros fitofármacos poderia constituir uma ameaça para a saúde humana.

### 1.8.2. Alguns aspectos sobre herbicidas

O controlo das infestantes constitui um problema do homem desde os primeiros tempos da agricultura. Os métodos pouco eficientes para a eliminação das ervas daninhas da era pré-revolução agrícola foram substituídos pelo conceito de rotação de culturas e uso de medidas profiláticas dentro de limites adequados (Kirkood, 1987, Kortenhoff, 1993). Apesar da mecanização da agricultura ter dotado o ser humano de capacidade para reduzir a competição entre as culturas e as suas infestantes, o poder para as controlar em situações de cultura ou de não cultura só foi alcançado pela primeira vez na história com a descoberta de novos herbicidas orgânicos. É sempre bom recordar que tal facto resultou da obtenção de novas moléculas com propriedades herbicidas especialmente talhadas para inibir reacções enzimáticas específicas (Kirkood, 1987, Kortenhoff, 1993, Kirby, 1994).

Apesar de a utilização dos herbicidas na agricultura estar hoje bem consolidada, os estudos sobre o impacto ambiental deste tipo moléculas e a procura de vias alternativas tem aumentado nos últimos anos, devido a problemas de contaminação ambiental e aos consequentes efeitos colaterais sobre a saúde humana que, muitas vezes, lhes são imputados (Naber, H., 1993).

A ingestão de herbicidas através dos alimentos ou de água “potável” contaminada constitui, de facto, uma fonte actual de inquietação em saúde pública.

Se excluirmos a libertação accidental de quantidades elevadas de herbicidas, podemos considerar residuais os seus níveis de circulação ambiental. No entanto, esses valores podem tornar-se muito elevados se o composto em questão for persistente e/ou tiver tendência para a bioacumulação ao longo da cadeia alimentar podendo, tornar-se num sério problema de poluição (Lu, 1991).

Existem várias famílias de herbicidas cuja toxicidade para os animais e em particular para os mamíferos está mal definida, particularmente ao nível molecular.

Os herbicidas clorofenóxiacéticos, como o ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, actuam como hormonas de crescimento das plantas e a sua toxicidade para os animais é considerada por esse motivo relativamente fraca. No entanto, os herbicidas biperidínicos paraquato e diquato são altamente tóxicos devido à sua capacidade para gerar radicais livres. A toxicidade do paraquato é caracterizada por efeitos pulmonares, não somente após exposição por via pulmonar mas também por via oral (Lu, 1991).

#### 1.8.2.1. Fenilureias

Os herbicidas derivados da ureia actuam ao nível do solo com um intervalo de selectividade específica muito amplo. Atacam preferencialmente as plantas jovens após absorção radicalar, produzindo amarelecimento foliar seguido de necrose progressiva e inibição do crescimento (Bucha e Todd, 1951, Villarias, 1981). Em geral, utilizam-se doses mais elevadas para o controlo total de áreas não cultivadas e doses mais baixas para o controlo em pré-emergência de várias culturas.

A degradação deste tipo de herbicidas por micorganismos do solo pode envolver a N-desmetilação (Mudd, *et al.*, 1983), N-desmetoxilação (Voss e Geissbuhler, 1966, Schuphan e Ebing, 1975, Nashed e Ilnicki, 1970), hidroxilação do anel benzénico (Fear e



Swanson, 1972, Jordan *et al*, 1975a,b), oxidação dos substituintes do anel e formação de anilina. (Geissbuhler *et al*, 1975, Ashton e Crafts, 1981, Maier-Bode e Hartel, 1981).

A *N*-desmetilação parece ser uma via importante do metabolismo que leva a uma diminuição da sua fitotoxicidade podendo em alguns casos otimizar-se a selectividade com taxas diferenciais de desmetilação (Geissbuhler *et al*, 1970, Voss and Geissbuhler, 1966, Rogers e Funderburk, 1968a, b, Rubin and Eshel, 1971, Lee and Fang, 1973, Lee and Ishizuka, 1976).

A acção primária destes herbicidas parece exercer-se ao nível da fotossíntese com o bloqueamento do sistema de transporte de electrões e consequente inibição da formação de ATP e NADPH (Geissbuhler *et al.*, 1975, Moreland and Hilton, 1976, Izawa, 1977, Ashton e Crafts, 1981, Fletcher e Kirkwood, 1982).

De um modo geral são considerados seguros para o homem, embora em alguns casos recomendem a não contaminação das águas com o produto e os considerem perigosos para os peixes (Nunes, 1994, Reis, 1997).

#### 1.8.2.2. Isoproturão

O isoproturão é uma fenilureia com propriedades herbicidas cuja estrutura química é apresentada na figura 1.9.

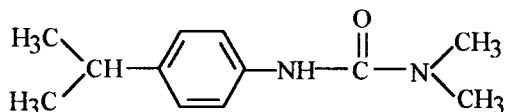


Fig. 1.9 Isoproturão: 3-(4-isopropil) fenil-1,1-dimetilureia

Este composto é utilizado no controlo de gramíneas e infestantes de folha larga podendo ser aplicado em pré- e pós- emergência nas culturas de cereais de Outono-

Inverno como a de cevada e a do trigo mole (Orlando *et al.*, 1994, Mudd *et al.*, 1983; Perez *et al.*, 1991, Machado, 1992, Reis, 1997).

Este derivado da ureia é um herbicida residual de absorção radicalar que é eficaz quando aplicado antes da germinação das infestantes ou antes que estas possuam quatro folhas verdadeiras (Villarias, 1981).

A sua fitoacção herbicida principal consiste na inibição da reacção de Hill impedindo a fixação do CO<sub>2</sub> e a formação de glúcidos.

A sua degradação ambiental decorre pela acção de bactérias e fungos do solo que são capazes de decompô-lo em monometilisoproturão e utilizá-lo como fonte de carbono (Mudd, 1983).

A solubilidade do isoproturão em água é de 70 ppm, a 20 ° C, e a sua persistência no solo é de 2 a 4 meses (Villarias, 1981).

Vários estudos tem identificado e quantificado fenilureias em amostras de águas superficiais (Johnson, 1995) e subterrâneas (Mathys, 1994) em diferentes estações do ano. Na Europa e nos Estados Unidos, a concentração mais elevada de isoproturão tem sido detectada no fluxo de Inverno de águas superficiais (Dupas, 1995).

#### 1.8.2.3. Efeitos provocados pelo isoproturão em mamíferos

Embora este herbicida seja amplamente utilizado na agricultura, a informação que existe sobre os efeitos metabólicos que pode provocar em mamíferos é escassa. Os poucos estudos realizados com o composto foram obtidos com doses superiores às detectadas no ambiente.

Em 1990, Dikshith *et al.*, num estudo efectuado com ratos machos e fêmeas, observaram efeitos tóxicos do isoproturão após aplicação dérmica de doses que variaram

entre 250 e 1000 mg/Kg/dia evidenciados pela elevada mortalidade animal e por alterações enzimáticas e hematológicas do soro. Os autores deste trabalho não conseguiram, no entanto, detectar uma relação dose-resposta porque as alterações enzimáticas e hematológicas observadas eram idênticas com qualquer das 3 doses aplicadas (250, 500 e 1000mg/Kg/dia).

Em 1990, Behera *et al.* observaram aberrações cromossomais em células germinais de murganhos provocadas pela administração do isoproturão em doses diárias que variaram entre 100-200 mg/Kg/dia, durante 5 dias.

Estudos realizados com murganhos para avaliar efeitos fetotóxicos e teratogênicos produzidos pelo isoproturão com doses que variaram desde 45 até 900 mg/Kg/dia, demonstraram que, a partir da dose 180mg/kg/dia, ocorriam rupturas dos cromátides fetais e que, a partir da dose 400mg/Kg/dia, ocorria uma diminuição do peso fetal e atraso no crescimento. No entanto, não foram detectadas alterações nas vísceras nem mal-formações do esqueleto do feto (Sarkar *et al.*, 1993, Srivastava *et al.*, 1995).

## **2. O problema e os objetivos**



Os seres vivos contactam esporádica ou continuamente com um grande e variado conjunto de novas moléculas de circulação ambiental, como por exemplo os herbicidas, que podem constituir factores perturbadores do seu desenvolvimento. Esse tipo de compostos vulgarmente designados por xenobióticos podem, por exemplo ser absorvidos através do tracto gastrointestinal e ser excretados pela urina, bilis, ou fezes. Embora em alguns casos a sua excreção possa ocorrer sem que sofram qualquer modificação química, o mais vulgar é ocorrerem interações entre estes produtos e os seres vivos.

Na maior parte das vezes, os seres vivos actuam sobre os xenobióticos produzindo a sua biotransformação. No entanto, estes ou produtos da sua biotransformação produzem quase sempre um efeito toxicodinâmico sobre os seres vivos que, a médio ou longo prazo, se pode manifestar a diferentes níveis da organização e funcionamento do organismo (Jeffrey, 1991, Coon *et al.*, 1992, Guengerich, 1992, 1993, Meyer, 1996).

A biotransformação de um xenobiótico é um processo integrado e, por vezes, complexo, sendo o destino metabólico de um composto em particular condicionado por factores como as suas propriedades físico-químicas, a dose de exposição, a via da sua penetração no organismo vivo, ou por processos fisiológicos naturais como a acção hormonal (Igarashi, 1984, Leader, 1991, Sipes e Gandolfi, 1991, Zarida, 1993).

Em mamíferos, a primeira fase de biotransformação de um xenobiótico pode, como já referimos na secção 1.3 do capítulo 1, dar-se ao nível do retículo endoplásmico onde está localizado o denominado sistema citocromo P450, uma cadeia de transporte de electrões, que envolve o coenzima NADPH, uma flavoproteína e diferentes formas isomórficas de citocromos P450, grupo de moléculas extremamente reactivas que na maior parte dos casos reconhecem de forma inespecífica diversos substratos. A



regulação deste sistema dá-se ao nível do genoma (Schuetz, 1984, Fuji-Kuriyama, 1992). e é fortemente influenciado pela acção hormonal (Finnen, 1980, Kato, 1986, Rikans, 1989, Skett, 1990, Zarida, 1993), manifestando-se em alguns caso um dimorfismo sexual da resposta a xenobióticos (Kato, 1980, Dannan, 1986, Fujita, 1990, Legraverend, 1992).

Por outro lado, os enzimas glutationo *S*-transferase, um grupo de isoenzimas localizado no citoplasma celular e no retículo endoplásmico do fígado (Anyia, 1993, Nijhoff, 1993, Gebhart, 1994), rim (Olivier, 1990, Sadzuka, 1994) e testículos (DiBiasio, 1991) e timo (Jeffrey, 1991) dos mamíferos, também podem, com já foi referido na secção 1.4 do capítulo 1, participar na conjugação directa de um determinado xenobiótico com o glutationo (GSH) ou ainda na conjugação de derivados metabólicos produzidos pelo sistema citocromo P450, levando em qualquer dos casos à sua eliminação sob a forma de mercapturatos (Sipes, 1991). Este processo poderá muitas vezes ser assistido pelos enzimas glutationo redutase que mantêm o nível intracelular de GSH necessário para as reacções de conjugação.

Tendo em conta a elevada complexidade assim como as diferenças existentes entre as vias de biotransformação de um determinado xenobiótico, é possível que pequenos desvios metabólicos relacionados, por exemplo, com a dose ou o estágio do desenvolvimento do ser vivo possam desencadear danos químicos com importância elevada do ponto de vista toxicológico.

Uma das consequências toxicológicas dos xenobióticos são os seus efeitos deletérios sobre os próprios sistemas que participam na sua metabolização. Por um lado, estes efeitos podem traduzir-se na alteração da capacidade de metabolização de outros xenobióticos, com importantes implicações sob o ponto de vista da toxicidade das

misturas. Por outro lado, podem manifestar-se com alterações de processos endógenos nos quais estes mesmos sistemas participam, como sejam o metabolismo da testosterona e/ou do glutatióno, podendo traduzir-se em perturbações do funcionamento normal dos organismos, cujas implicações no desenvolvimento animal nem sempre estão esclarecidas (Kyle e Farber, 1991, Woodhouse e Wyne, 1992, Smith *et al*, 1996).

Embora os sistemas enzimáticos que participam na biotransformação de xenobióticos estejam maioritariamente localizados no fígado (Murray, 1991, Weber *et al*, 1993, Ohmori *et al.*, 1993, Mulders, 1993, Kassahun *et al*, 1994, Bondy *et al.*, 1994), estes sistemas também estão expressos noutros órgãos como os rins (Reinaers *et al.*, 1990), testículos e timo (Li *et al*, 1992) e, para além de serem capazes de desempenhar um papel, nem sempre claro, na desintoxicação de xenobióticos, participam noutros processos metabólicos importantes ao nível de cada órgão como o metabolismo da testosterona mediado pelo sistema citocromo P450 (Jeffrey, 1991, Sipes e Gandolfi, 1991). Assim, a pesquisa de alterações metabólicas induzidas por xenobióticos em tecidos extra-hepáticos tem aumentado e tem-se tornado cada vez mais importante, uma vez que alguns desses órgãos como o timo e os testículos sofrem profundas alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas com a idade que poderão condicionar a resposta dos diferentes tipos de interações com um determinado xenobiótico.

No entanto, os estudos que procuram avaliar a resposta aos xenobióticos nos mamíferos são habitualmente dirigidos para um momento definido do desenvolvimento animal e procuram avaliar efeitos carcinogénicos e teratogénicos exercidos por um determinado composto (Prochaska, 1994, Flatgaard, 1993, Nijhof, 1994). Tal facto tem contribuído para que sejam ainda pouco conhecidos os efeitos sobre a evolução do

próprio sistema de metabolização de xenobióticos, ao longo do desenvolvimento, em situações de exposição prolongada a compostos exógenos.

Apesar de termos consciência de que não serão expectáveis respostas simplistas na interpretação da influência da idade e de factores ambientais nos sistemas de biotransformação de xenobióticos, e de uma forma mais geral no desenvolvimento animal (McClearn, 1997), supomos que será extremamente importante conhecer melhor como o factor idade, condicionado pelo património hereditário, e o contacto com os xenobióticos de circulação ambiental poderão influenciar os sistemas de biotransformação de compostos exógenos e endógenos no maior número possível de tecidos animais, tendo em vista uma melhor compreensão dos processos adaptativos dos animais a ambientes quimicamente hostis.

Foi na expectativa de contribuir com alguns elementos novos para o esclarecimento destas questões que concebemos e realizámos este trabalho.

Reconhecemos que se trata de uma questão complexa, com muitas variáveis em jogo. Por esse motivo, elegemos apenas algumas cujo estudo considerámos prioritário e possível de realizar na fase actual dos conhecimentos e com as condições de trabalho de que dispunhamos.

Embora os resultados obtidos com roedores não possam ser directamente transportados para o Homem, esperamos que os conhecimentos adquiridos com este trabalho também possam de algum modo contribuir, para perceber as relações entre órgãos e aumentar a nossa capacidade para identificar factores de risco associados à idade e ao uso de novas substâncias no ambiente que permitam, no futuro, traçar estratégias de prevenção que os minimizem.

Tendo em conta o que foi referido anteriormente, podemos dizer de uma forma sucinta, que este trabalho, realizado no âmbito das áreas científicas da Bioquímica do Crescimento e Desenvolvimento Animais e da Toxicologia Bioquímica teve como principais objectivos avaliar a evolução dos padrões de actividade do sistema citocromo P450 e dos enzimas glutathione *S*-transferase e glutathione reductase de fígado rins, testículos e timo de ratos machos Wistar, em duas fases distintas do desenvolvimento, puberdade e adulto jovem, assim como a sua capacidade de resposta face a pequenas doses de xenobióticos administradas diariamente durante um curto período de tempo (1 semana), utilizando o isoproturão como substância problema, por este ser um herbicida muito utilizado na agricultura portuguesa.

A escolha das fases do desenvolvimento avaliados neste estudo prende-se com o facto de não encontrarmos na literatura referência a estudos sistemáticos sobre o comportamento destes sistemas ao longo da fase crucial do desenvolvimento animal que decorre desde a fase precoce da puberdade até à idade adulta, período da vida animal em que ocorrem alterações metabólicas determinantes para o seu desenvolvimento condicionadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gónadas-timo (Grossman, 1985, MacGeogh, 1985, Li, 1993, Park, 1994).

Finalmente esperamos, de algum modo, contribuir para a acumulação empírica de resultados que com o tempo certamente permitirão a deduzir modelos ou teorias que contibuem para uma melhor interpretação do fenómeno desenvolvimento (Yates, *et al.*, 1972, McClearn, 1997).



### **3. Metodologia**



### 3.1. Estratégia

A concretização dos objectivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano que passamos a descrever:

- Modelo animal - ratos machos Wistar.
- Fornecedor - biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, em Oeiras.
- Idade da aquisição - após o desmame, ou seja, às 4 semanas de idade.
- Estágios do desenvolvimento em estudo
  - puberdade, 6-7 semanas e
  - adulto jovem, 11-12 semanas de idade.
- Agrupamento dos animais - quatro grupos de cinco animais por idade.
- Tratamento
  - grupo I** - controlo, injectados com óleo de amendoim, o veículo.
  - grupo II** - problema I, injectados com isoproturão na dose de 1mg/Kg de animal.
  - grupo III** - problema II, injectados com isoproturão na dose de 3mg/Kg de animal.
  - grupo IV** - problema III, injectados com isoproturão na dose 9 mg/Kg de animal.
- Esquema de administração - injeção intraperitoneal, de 12 em 12 h, durante 6 dias.
- Método de eutanásia - decapitação por guilhotina



- Composto em estudo

- nome vulgar: isoproturão
- nome sistemático: 3 - (4 -isopropil) fenil -1, 1 - dimetilureia.
- utilização: princípio activo de herbicidas utilizados nas culturas de cereais de Outono-Inverno, como a da cevada e a do trigo mole (Perez *et al.*, 1991, Orlando *et al.*, 1994, Reis, 1997).
- DL<sub>50</sub>: 3650 mg/Kg (Budavari *et al.*, 1996).
- solubilidade em água: 70 mg/dm<sup>3</sup> (Budavari *et al.*, 1996).

- Resultados obtidos *in vivo*

- peso dos alimentos ingeridos
- peso das fezes produzidas
- volume de água ingerida
- volume de urina produzida.

- Resultados obtidos após o sacrifício - peso do corpo e peso dos órgãos em estudo, concentração e actividades enzimáticas de constituintes das fracções celulares em estudo .

- Orgãos seleccionados

- fígado
- rins
- testículos
- timo

- Fracções subcelulares seleccionadas

- microssomal
- citosol.

- Doseamentos efectuados

- na fracção microsomal: proteína total, citocromo P450, citocromo b5 e hemo, por espectrofotometria UV/Vis.
- no citosol: proteína total, por espectrofotometria UV/Vis.

- Actividades enzimáticas determinadas

- na fracção microsomal - NADPH (P450) redutase, etilmorfina *N*-desmetilase, glutationo *S*-transferase, por espectrofotometria UV/Vis, etoxicumarina *O*-desetilase, etoxirresorufina *O*-desetilase, por espectrofluorimetria e  $6\beta$ -,  $16\alpha$ -,  $11\beta$ - e  $2\alpha$ -testosterona hidroxilase, por HPLC-UV/Vis.
- no citosol - glutationo *S*-transferase e glutationo redutase, por espectrofotometria UV/Vis.

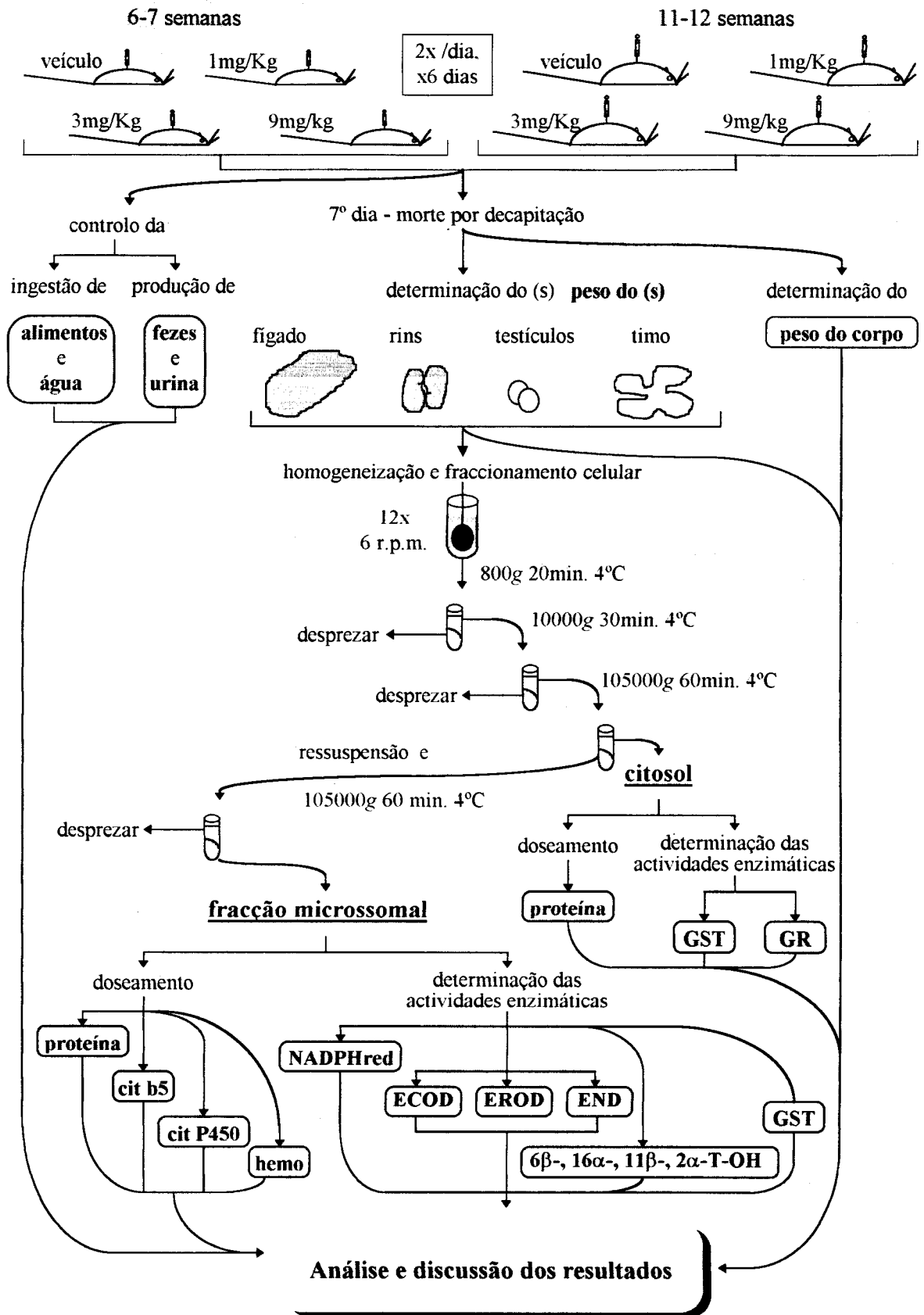
- Análise estatística dos resultados

Análise de variância simples, vulgarmente conhecida por ANOVA I e o teste de significância de Duncan para os resultados obtidos com o animal vivo, assim como para o peso do corpo, peso dos órgãos, concentração e actividades enzimáticas de constituintes do fígado.

- Desenvolvimento do trabalho

O desenvolvimento do trabalho decorreu como está representado no organigrama apresentado na secção 3.2., seguindo-se o procedimento experimental descrito na secção 3.3. e a análise estatística dos resultados como descrita na secção 3.4.

### 3.2 Organograma do trabalho



### 3.3.Procedimento experimental

#### 3.3.1.Animais

##### 3.3.1.1.Preparação dos animais

Os animais, ratos machos Wistar, foram adquiridos com 4 semanas de vida ao biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, em Oeiras, e transportados até Évora de comboio.

As experiências tiveram o seu início pelo menos uma semana depois da chegada dos animais, um período de tempo superior ao descrito por Kore *et al.* (1993) e Maeda *et al.* (1997) para minimizar os efeitos produzidos pela viagem e garantir a habituação às condições do biotério do laboratório de Bioquímica da Universidade de Évora.

Os animais foram mantidos durante os ensaios numa sala com a temperatura controlada a  $22 \pm 2$  ° C (Kore *et al.*, 1993, Bartholomaeus *et al.*, 1994, Carrillo *et al.*, 1995, Jung e Henke, 1996, Agrawal e Shapiro, 1997), a humidade mantida a  $55 \pm 5\%$  (Sadzuka *et al.*, 1994, Jung e Henke, 1996) e sob um ciclo diário de 12 h de luz - 12 h de escuridão (Kore *et al.*, 1993, Bartholomaeus *et al.*, Carrillo *et al.*, 1995, Agrawal e Shapiro, 1997, Maeda *et al.*, 1997).

Constituímos quatro grupos de cinco ratos para cada uma das idades seleccionadas. Um dos grupos foi escolhido como controlo e os outros três foram sujeitos à administração do isoproturão em diferentes concentrações.

Os animais foram colocados em gaiolas de metabolismo individuais 48 h antes da primeira injeção e aí mantidos durante os dias da experiência, tendo em vista o controlo

da quantidade de comida e o volume de água ingerida, assim como a quantidade de fezes e o volume de urina produzidos.

Os animais foram mantidos com água *ad libitum* (Finnen *et al.*, 1980, Kore *et al.*, 1993, Dannenberg *et al.*, 1993, Sadzuka *et al.*, 1994) cuja composição descrita no boletim nº 28/H/96 do Instituto Geológico e Mineiro, apresentava as características químicas que constam no quadro 3.1.

**Quadro 3.1.** Composição da água ingerida pelos ratos

ânion	concentração (mgcm <sup>-3</sup> )	catião	concentração (mgcm <sup>-3</sup> )
Cl <sup>-</sup>	8,8±0,3	Na <sup>+</sup>	6,3±0,4
HCO <sup>3-</sup>	8,8±0,8	Mg <sup>2+</sup>	1,3±0,2
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,6±0,2	Ca <sup>2+</sup>	1,2±0,4
NO <sup>3-</sup>	1,9±0,2		

composto	concentração (mgcm <sup>-3</sup> )
SiO <sub>2</sub>	13,1±0,6

pH	5,9±0,3
----	---------

Os animais foram alimentados *ad libitum* (Finnen *et al.*, 1980, Kore *et al.*, 1993, Dannenberg *et al.*, 1993, Sadzuka *et al.*, 1994) com dieta granulada da LETICA Ref.: IPM-R20 que possuía composição que consta no quadro 3.2, segundo os laboratórios do fabricante.

**Quadro 3.2.** Composição da ração ingerida pelos ratos

água (%)	9,00
proteína bruta (%)	17,00
lisina (%)	0,07
metionina ecistina (%)	0,50
lípidos totais (%)	3,00
fibra bruta (%)	5,00
cinza total (%)	5,00
cálcio (%)	0,80
fósforo ( )	0,65
cloretos (%)	0,60

Os animais foram mantidos em jejum durante as 18 h que antecederam o sacrifício o qual ocorreu sempre, entre as 8:00 h e as 9:00 h da manhã, após a pesagem prévia dos animais. A morte foi provocada por decapitação com guilhotina e sem recurso a quaisquer anestésicos.

### 3.3.1.2.Recolha e determinação do peso húmino dos órgãos

Após o sacrifício, procedemos à exanguinação dos animais, à abertura das cavidades torácica, abdominal e do escroto e à recolha do timo, fígado, rins e testículos, os quais foram colocados de imediato em meio de homogeneização, KCl 0,154 M em tampão Tris-HCl 50 mM pH (7,4) a 4 °C.

O peso dos órgãos foi registado após a sua lavagem, remoção do tecido adiposo periférico e secagem em papel de filtro Whatman nº 1.

### 3.3.2.Fraccionamento celular dos tecidos

#### 3.3.2.1.Preparação dos homogeneizados

Os homogeneizados do tecido hepático foram preparados utilizando amostras de fígado de cada rato com um peso aproximado de 3,0 g. Os homogeneizados dos rins, testículos e timo, devido à pequena dimensão dos órgãos, foram preparados a partir de “pools” com aproximadamente 6,0 g, no caso dos rins e testículos, e 2,0 g, no caso do timo, de amostras dos respectivos tecidos recolhidas nos 5 ratos de cada grupo e que, nos animais com 7 semanas, correspondia à massa total do tecido disponível em cada grupo.

As amostras foram transferidas para o copo do homogeneizador, mantido também a 4°C, e homogeneizadas com 9,0 cm<sup>3</sup>, no caso do fígado e rins, e 6,0 cm<sup>3</sup>, no caso dos testículos e do timo, de meio de homogeneização KCl 0,154 M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4, num homogeneizador tipo Potter, com 10 impulsos a 6000 rpm (Lake, 1987, Lash *et al.*, 1995, Dafré *et al.*, 1996).

Os homogeneizados foram coados através de um passador de rede de plástico com uma malha de 1 mm para tubos de centrifuga, mantidos a 4°C (Lake, 1987).

### 3.3.2.2. Preparação da fracção microssomal e do citosol

A fracção microssomal e o citosol foram preparados de acordo com o procedimento geral de Lake (1987). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g durante 20 min., a 2-4 °C (Lake, 1987, Sugimoto *et al.*, 1990). O sedimento obtido foi desprezado e o sobrenadante pós-nuclear foi centrifugado a 10000 g, durante 30 min, a 2-4 °C (Lake, 1987, Sugimoto *et al.*, 1990, Bartholomaeus *et al.*, 1994, Biro-Sauveur *et al.*, 1994, Chhabra e Rao, 1994, Kim *et al.*, 1998). Os sobrenadantes pós-mitocondriais obtidos foram transferidos para tubos de ultra-centrifuga previamente arrefecidos e centrifugados a 105000 g, durante 60 min., a 2-4 °C. A fracção citosólica sobrenadante foi recolhida para “eppendorfs” que guardámos a -20 °C (Jung, 1993 e Wilbert, 1997) para utilização posterior. O sedimento microssomal foi ressuspensionado num volume de sobrenadante idêntico ao registado antes da última fase de centrifugação e voltou a ser centrifugado a 105000 g, durante 60 min., a 2-4 °C. O sedimento então obtido foi ressuspensionado em igual volume de meio de homogeneização (Lake 1987, Sugimoto *et al.*, 1990, Kore *et al.*, 1993, Biro-Sauveur *et al.*, 1994 e Chhabra e Rao, 1994).

Utilizámos parte da fracção microsomal assim obtida para determinar de imediato a concentração de proteínas, citocromos P450, citocromos b5 e de hemo, assim como a actividade enzimática NADPH (P450) redutase.

Guardámos a porção remanescente a -20 °C para utilização posterior, de acordo com Lake (1987).

### 3.3.3. Análise quantitativa das fracções subcelulares

#### 3.3.3.1. Doseamentos

##### 3.3.3.1.1. Determinação da concentração de proteína total

Utilizamos o método de Lowry *et al.* (1951) cujo princípio reaccional se fundamenta na reacção, catalisada pelo cobre em meio alcalino, entre o reagente de Folin-Ciocalteu, ou ácido fosfomolibdicofosfotungstico, e os resíduos de aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano das proteínas, levando à formação de um complexo de heteromolibdénio de cor azul intensa.

Embora a resposta do método dependa da composição em aminoácidos da proteína, o seu maior problema tem a ver com o elevado número de substâncias que podem interferir na reacção. Os interferentes podem ser aminoácidos e seus derivados, constituintes de soluções tampão, detergentes, drogas, glúcidos, ácidos nucleicos, sais e reagentes sulfidrílicos. Contudo, escolhemos este método devido à sua elevada sensibilidade e ao facto de as substâncias interferentes encontrarem-se muito diluídas e, como tal, os seus efeitos estarem minimizados.



Preparamos uma curva de calibração para o intervalo de concentrações 50-200  $\mu\text{g. cm}^{-3}$ , a partir de uma solução-mãe de albumina do soro bovino, BSA ( $500 \mu\text{gcm}^{-3}$ ).

Tomamos uma alíquota de  $0,2 \text{ cm}^3$  da fracção microssomal ou do citosol que foi diluída com NaOH 0,5 M para um volume total de  $1,0 \text{ cm}^3$ .

Adicionamos a  $1,0 \text{ cm}^3$  de cada solução-padrão ou das amostras diluídas,  $5,0 \text{ cm}^3$  de reagente de Lowry, constituído por sulfato de cobre penta-hidratado 0,1% (p/v), tartarato de sódio e potássio 0,2% (p/v) em carbonato de sódio a 2% (p/v). Após agitação no vortex, adicionamos  $0,5 \text{ cm}^3$  de solução de ácido fosfomolibdicofosfotungstico - o reagente de Folin - diluído 1/2 com água bidestilada e voltamos a agitar. Aguardamos 30 min. Após nova agitação no vortex, lêmos a absorvência a 720 nm.

Construímos a curva de calibração com os valores obtidos (Apêndice C) e calculámos, por interpolação gráfica a concentração de proteínas das amostras.

#### 3.3.3.1.2.Determinação da concentração de citocromo b5

O citocromo b5 da fracção microssomal dos tecidos estudados foi estimado de acordo com a metodologia de Omura e Sato (1964) e Lake (1987), a partir do espectro de absorção molecular da forma reduzida traçado contra um branco que continha a forma oxidada. A redução do citocromo b5 foi catalisada por outra flavoproteína microssomal denominada NADH-citocromo b5 redutase após a adição de NADH.

Tomamos  $0,5 \text{ cm}^3$  de fracção microssomal de fígado ou  $1,0 \text{ cm}^3$  de fracção microssomal de quaisquer dos outros tecidos utilizados neste estudo e diluímos com  $4,0 \text{ cm}^3$  de tampão de fosfatos 0,2 M, pH 7,4. Seguidamente, distribuimos igual volume da solução obtida por duas células do espectrofotómetro e traçamos um espectro de absorção entre 500 e 400nm, para obter uma linha de base paralela ao eixo das abcissas.

Adicionámos 0,025 cm<sup>3</sup> de NADH 2% à célula de leitura, agitámos e aguardámos 2 min. a 37°C. Traçámos de novo outro espectro de absorção entre 500 e 400 nm e registámos a diferença de absorvência entre os 409 e os 429 nm, a qual foi utilizada no cálculo da concentração de citocromos b5, considerando o valor do coeficiente de absortividade molar para o citocromo b5 na forma reduzida de 185 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Lake, 1987).

### 3.3.3.1.3. Determinação da concentração de citocromo P450

A determinação da concentração de citocromos P450 da fracção microsomal dos tecidos estudados foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Omura e Sato (1964) e Lake, (1987), cujo princípio reaccional assenta no facto de estas hemoproteínas, quando se encontram na forma reduzida ligadas ao monóxido de carbono, apresentarem um espectro de absorção com um máximo característico a 450 nm.

Às células utilizadas na determinação do citocromo b5, adicionámos alguns cristais de ditionito de sódio.

Após agitação suave, traçámos um espectro de absorção entre 500 e 400 nm para obter uma linha de base paralela ao eixo das abcissas.

Fizémos borbulhar monóxido de carbono na célula de leitura, durante 1 min., e traçámos novo espectro de absorção na mesma gama de comprimentos de onda. Registámos a diferença de absorvência entre 450 e 490 nm, a qual foi utilizada no cálculo da concentração total de citocromos P450, considerando o valor do coeficiente de absortividade molar da forma reduzida do citocromos P450 de 91 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Lake, 1987, Swales *et al.*, 1996).

#### 3.3.3.1.4.Determinação da concentração de hemo

A concentração de hemo da fracção microsomal dos tecidos estudados foi determinada, de acordo com a metodologia de Omura e Sato (1964) e Luke (1987), a partir do espectro de absorção molecular da sua forma reduzida traçado contra um branco que continha a forma oxidada obtida por reacção do hemo com a piridina em meio alcalino.

Tomámos 0,75 cm<sup>3</sup> de fracção microsomal dos tecidos estudados e diluímos para metade com KCl 0,154 M. Distribuímos igual volume da solução obtida por duas células do espectrofotómetro e adicionámos 0,5 cm<sup>3</sup> e 0,49 cm<sup>3</sup> de NaOH 0,5 M às células de leitura e de referência, respectivamente.

Adicionámos, ainda, a cada célula 0,5 cm<sup>3</sup> de piridina. Em seguida, foi adicionada uma pequena quantidade de ditionito de sódio à célula de leitura e 0,010 cm<sup>3</sup> de solução 12,5 mM de ferricianeto de potássio, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, à célula de referência.

Após agitação suave, traçámos um espectro de absorção entre 600 e 530 nm e registámos a diferença de absorvência obtida entre 557 e 575 nm, a qual foi utilizada para o cálculo da concentração de hemo, considerando o valor do coeficiente de absorvidade molar do hemo na sua forma reduzida de 34,7 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Lake, 1987 ).

#### 3.3.3.2.Determinação das actividades enzimáticas

##### 3.3.3.2.1.NADPH (P450) redutase

A determinação da actividade enzimática desta flavoproteína microsomal foi efectuada de acordo com o método de Peterson *et al.* (1978) e Lake (1987), utilizando o

citocromo c como aceitador artificial de electrões, uma vez que a sua forma ferrosa possui um máximo de absorção a 550 nm.

Incubámos alíquotas de  $0,1 \text{ cm}^3$  de fracção microsomal com uma concentração aproximada de proteínas de  $7,5 \text{ mg.cm}^{-3}$ , no fígado, e de  $15 \text{ mg.cm}^{-3}$ , nos outros órgãos, sendo o meio de incubação constituído por citocromo c (0,5 mM), cianeto de potássio (1,2 mM) e NADPH (0,4 mM) diluídos em tampão fosfato 0,1M pH 7,60.

Iniciámos a reacção com a adição do NADPH, após pré-incubação dos restantes constituintes da mistura de ensaio durante 3 min. a  $37^\circ\text{C}$ .

Registámos, então, a variação de absorvência ao longo do tempo durante 120 s, a 550 nm, lida contra um branco de composição idêntica à das células de leitura mas onde a solução de NADPH foi substituído por igual volume de solução tampão fosfato 0,1M pH 7,60.

Determinámos o valor dos coeficientes angulares das rectas obtidas e a partir deles calculámos a actividade enzimática utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Lake, 1987, McMallum *et al.*, 1992, Weber e Waxman, 1993) para a forma ferrosa do citocromo c.

#### 3.3.3.2.2. Etilmorfina *N*-desmetilase

Determinámos a actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase por espectrofotometria do visível de acordo com o protocolo de Nash (1953), modificado por Lake (1987), tendo em conta que a *N*-desmetilação da etilmorfina em presença de citocromos P450 tem como produto da reacção o metanal - reacção de Hantzsch - que ficou retido no meio de incubação pela semicarbazida e reage com o reagente de Nash para formar um cromóforo que absorve preferencialmente a 412 nm.

Incubámos alíquotas de  $0,1 \text{ cm}^3$  de fracção microssomal com uma concentração aproximada de proteínas de  $10 \text{ mg.cm}^{-3}$ , no caso do fígado, e de  $15 \text{ mg.cm}^{-3}$ , no caso dos outros tecidos, num meio de reacção composto por semicarbazida (5 mM), hidrócloro de etilmorfina (5 mM),  $\text{NADP}^+$  (0,5 mM), ácido D,L-isocítrico (3,75 mM), sulfato de magnésio hepta-hidratado (5 mM) e isocitrato desidrogenase (1 U), diluídos em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,2 para um volume final de  $2,0 \text{ cm}^3$ .

Iniciámos a reacção com a adição da solução de hidrócloro de etilmorfina - o substrato - após uma pré-incubação de todos os outros constituintes do meio em banho a  $37^\circ\text{C}$ , com agitação a  $100 \text{ ciclos min.}^{-1}$ , durante 5 min. Deixámos decorrer a reacção durante 10 min. nas mesmas condições de agitação e temperatura.

Parámos a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo. Adicionámos  $1,0 \text{ cm}^3$  de sulfato de zinco 5% e  $1,0 \text{ cm}^3$  de solução saturada de hidróxido de bário. Após agitação no vortex, centrifugámos os tubos a 2000 g, durante 15 min., à temperatura de  $2-4^\circ\text{C}$ . Recolhemos  $2,0 \text{ cm}^3$  dos sobrenadantes aos quais adicionámos o reagente de Nash. Agitámos de novo os tubos no vortex e colocámos em banho, a  $37^\circ\text{C}$ , durante 60 min. Após arrefecimento dos tubos à temperatura ambiente lêmos a absorvência a 412 nm. Preparámos em simultâneo, para cada amostra, um branco idêntico ao meio anterior, mas só adicionámos a solução de hidrócloro de etilmorfina após os 10 min. de incubação. Preparámos, também, em simultâneo e para cada amostra, um padrão de referência com composição e ordem de adição idêntica à dos brancos, mas em que após a adição do substrato também adicionámos  $0,3 \text{ cm}^3$  de metanal (1,5 mM).

Lêmos os valores de absorvência contra os respectivos valores das soluções branco.

A actividade enzimática foi determinada por interpolação do valor de absorvência registado para as amostras com o valor de absorvência registado para o respectivo padrão.

O reagente de Nash foi preparado dissolvendo 0,4 cm<sup>3</sup> de acetilacetona bidestilada em 100 cm<sup>3</sup> de solução de acetato de amónio (0,308g.dm<sup>-3</sup>)/ácido acético (0,6%).

A calibração do padrão de metanal foi efectuada fazendo-se reagir 0,2 cm<sup>3</sup> da solução-padrão de metanal diluída para 2,0 cm<sup>3</sup> de água bidestilada com 2,0 cm<sup>3</sup> de reagente de Nash, durante 60 min., a 37 °C. Utilizámos o valor do coeficiente de absorvidade molar de 8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Lake, 1987) para o cálculo da concentração do metanal dissolvido na solução.

#### 3.3.3.2.3. 7-Etoxicumarina *O*-desetilase

Determinámos a actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase por espectrofluorimetria de acordo com Ulrich e Weber (1972), Aitio (1978) e Lake (1987), tendo em conta que a *O*-desetilação da 7-etoxicumarina leva à formação da 7-hidroxycumarina, um composto capaz de emitir fluorescência a 582 nm quando excitado por radiação electromagnética com  $\lambda=535$  nm.

No procedimento original proposto por Ulrich e Weber (1972), o ensaio de cada amostra de tecido decorria em células do espectrofluorímetro e a intensidade de fluorescência era registada ao longo do tempo. No entanto, o procedimento que seguimos obedeceu ao protocolo modificado por Lake em 1987 para a determinação rápida desta actividade enzimática de um grande número de amostras através da determinação de ponto final da intensidade da fluorescência.

Incubámos alíquotas de 0,050 cm<sup>3</sup> de fracção microssomal com uma concentração aproximada de proteínas de 10 mg.cm<sup>-3</sup>, no caso do fígado, e de 15 mg.cm<sup>-3</sup> no caso dos outros órgãos, num meio de reacção composto por 7-etoxicumarina (0,5 mM), NADP<sup>+</sup> (0,75 mM), ácido D,L-isocítrico (7,5 mM), sulfato de magnésio heptahidratado (5 mM) e isocitrato desidrogenase (1 U), diluídos em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,8 para um volume final de 2,0 cm<sup>3</sup>.

Iniciámos a reacção com a adição da 7-etoxicumarina - o substrato - ao meio de reacção, após pré-incubação dos seus outros constituintes em banho a 37°C, com agitação de 100 ciclos.min<sup>-1</sup>, durante 5 min.

Deixámos a reacção decorrer durante 10 min. nas mesmas condições de agitação e temperatura.

Parámos a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo. Em seguida, adicionámos a cada tubo 1,0 cm<sup>3</sup> de sulfato de zinco 5% e 1,0 cm<sup>3</sup> de solução saturada de hidróxido de bário.

Agitámos os tubos no vortex e centrifugámos a 2000 g, durante 15 min., à temperatura de 4°C. Recolhemos 1,0 cm<sup>3</sup> dos sobrenadantes do fígado e 2,0 cm<sup>3</sup> dos sobrenadantes dos outros tecidos aos quais foram adicionados 2,0 cm<sup>3</sup> e 1,0 cm<sup>3</sup> de tampão NaOH-glicina 0,5M pH 10,5, respectivamente.

Agitámos de novo os tubos no vortex e lêmos a intensidade da fluorescência para o comprimento de onda de emissão de 452 nm e de excitação de 380 nm e com a abertura de fenda de 1 e 3 mm, respectivamente.

Durante o processo, em simultâneo para cada amostra, preparámos ensaios em branco e ensaios com o padrão de referência. Nos ensaios em branco a solução de 7-etoxicumarina só foi adicionada ao meio reaccional após os 10 min. de incubação. Nos

ensaios com o padrão de referência mantivemos a composição e ordem de adição dos ensaios em branco, mas adicionámos 0.1 cm<sup>3</sup> de 7-hidroxicumarina (0,1mM) após a adição do substrato.

Lemos os respectivos valores de intensidade da fluorescência aos mesmos comprimentos de onda das amostras.

A actividade enzimática foi determinada por interpolação do valor da fluorescência registado para as amostras com o valor da fluorescência registado para o respectivo padrão.

#### 3.3.3.2.4. Etoxiresorufina *O*-desetilase

Determinámos a actividade enzimática 7-etoxiresorufina *O*-desetilase por espectrofluorimetria de acordo com o método proposto por Burke e Mayer (1974) e modificado por Lake (1987), tendo em conta que a *O*-desetilação da 7-etoxiresorufina leva à formação da resorufina, um composto capaz de emitir fluorescência a 582 nm quando excitado por radiação electromagnética a 535 nm.

Incubámos alíquotas de 0,050 cm<sup>3</sup> de fracção microssomal com uma concentração aproximada em proteínas de 10 mg.cm<sup>-3</sup>, no caso do fígado, e de 15 mg.cm<sup>-3</sup>, no caso dos outros tecidos, num meio de reacção composto por 7-etoxiresorufina (0,25 µM), NADP<sup>+</sup> (0,5 mM), ácido D,L-isocítrico (7,5 mM) sulfato de magnésio hepta-hidratado (5mM) e isocitrato desidrogenase (1U), diluídos em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4 para um volume final de 2,0 cm<sup>3</sup>.

Iniciámos a reacção com a adição da 7-etoxiresorufina - o substrato - ao meio de reacção, após pré-incubação de todos os seus outros constituintes a 37 ° C, coberto com tampa agitando a 100 ciclos min<sup>-1</sup>, durante 5 min..



Deixámos a reacção decorrer durante 10 min. nas mesmas condições de agitação e temperatura. Parámos a reacção colocando os tubos de ensaio em gelo. Adicionámos, em seguida, 1,0 cm<sup>3</sup> de sulfato de zinco 5% e 1,0 cm<sup>3</sup> de solução saturada de hidróxido de bário. Agitámos os tubos no vortex e centrifugámos a 2000 g, durante 15 min., à temperatura de 4°C. Após a sedimentação das proteínas, recolhemos 1,0 cm<sup>3</sup> dos sobrenadantes aos quais adicionámos 2,0 cm<sup>3</sup> de tampão glicina NaOH 0,5M pH 8,5.

Agitámos de novo os tubos no vortex e lêmos a fluorescência aos comprimentos de onda de excitação 535 nm e de emissão de 582 nm, com uma abertura de fenda de 1 e 3 mm, respectivamente.

Preparámos em simultâneo para cada amostra, ensaios em branco nos quais a solução de 7-etoxiresorufina - o substrato - só foi adicionada ao meio reaccional após os 10 min. de incubação.

Para cada amostra, preparámos também um padrão de referência com a mesma composição e seguindo a mesma ordem de adição dos ensaios em branco, mas em que adicionámos 0,2 cm<sup>3</sup> de resorufina (5 nmol cm<sup>-3</sup>) após a adição do substrato. Lemos os respectivos valores de intensidade de fluorescência aos comprimentos de onda de excitação e de emissão das amostras.

A actividade enzimática foi determinada por interpolação do valor de fluorescência registado para as amostras com o valor de fluorescência registado para o respectivo padrão descontando o respectivo branco.

A solução extemporânea de etoxiresorufina - o substrato - foi preparada dissolvendo, aproximadamente, 2 mg de etoxiresorufina com 2,0 cm<sup>3</sup> de solução-tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4, em banho de ultra-sons, durante 15 min.

Traçámos um espectro de absorção dessa solução entre 400 e 800 nm num espectrofotómetro de feixe duplo e registámos a diferença de absorbência entre o máximo registado a 482 nm e a linha de base. Calculámos a concentração da solução utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para a 7-etoxiresorufina de  $22,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Por fim, diluímos a solução para uma concentração de  $5,0 \text{ nmol.cm}^{-3}$  com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4 para ser utilizada no ensaio enzimático. A solução foi preservada do contacto com a luz envolvendo o frasco com papel de alumínio.

A solução extemporânea de resorufina, utilizada como solução padrão, foi preparada dissolvendo, aproximadamente, 2 mg de resorufina numa pequena alíquota de etanol e a diferença até  $2,0 \text{ cm}^3$  de solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4. Traçámos um espectro de absorção dessa solução entre 500 e 800 nm num espectrofotómetro de feixe duplo e registámos a diferença de absorbência entre o máximo a 572 nm e a linha de base. Calculámos a concentração da solução utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para a resorufina de  $40,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Por fim, diluímos a solução para uma concentração de  $5,0 \text{ nmol.cm}^{-3}$  com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,4 para ser utilizada no ensaio enzimático. A solução foi preservada do contacto com a luz envolvendo o frasco com papel de alumínio.

### 3.3.2.5. Testosterona hidroxilases

Determinámos as actividades enzimáticas  $6\beta$ -,  $16\alpha$ -,  $11\beta$ - e  $2\alpha$ -testosterona hidroxilases separando e quantificando derivados metabólicos hidroxilados da testosterona por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com os métodos descritos por Waxman (1983), Kato *et al.* (1986), Shimada *et al.* (1987), Murray, (1991) e Li *et al.* (1993).

Incubámos alíquotas de  $0,1 \text{ cm}^3$  de fracção microssomal com a concentração aproximada em proteínas de  $10 \text{ mg.cm}^{-3}$ , no caso do fígado, e de  $15 \text{ mg.cm}^{-3}$ , no caso dos outros tecidos, num meio de reacção composto por EDTA dissódico ( $1,0 \text{ mM}$ ),  $0,01 \text{ cm}^3$  de solução metanólica de testosterona ( $2,0 \text{ mM}$ ) e NADPH ( $1,0 \text{ mM}$ ) dissolvidos em tampão fosfato  $50 \text{ mM}$  pH 7,8.

Procedemos a uma pré-incubação do meio reaccional, sem a presença do NADPH, em banho com tampa, temperatura controlada a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e agitação constante de  $100 \text{ ciclos.min.}^{-1}$ , durante 5 min. Com a adição  $0,1 \text{ cm}^3$  de NADPH, iniciámos a reacção que decorreu durante 15 min nas mesmas condições de agitação e temperatura. Parámos a reacção adicionando  $2,0 \text{ cm}^3$  de diclorometano. Após agitação no vortex, centrifugámos a mistura a  $800g$  durante 5 min., a  $2-4^\circ\text{C}$ .

Transferimos  $1,0 \text{ cm}^3$  da fase orgânica, no caso do fígado, e  $1,5 \text{ cm}^3$  no caso dos outros órgãos, para tubos que foram levados à secura, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob corrente de azoto. O resíduo seco foi ressuscendido em  $0,1 \text{ cm}^3$  de metanol. Tomámos alíquotas de  $0,05 \text{ cm}^3$  que foram injectadas no HPLC.

Durante o ensaio, em simultâneo para cada amostra, preparam-se ensaios em branco em que a solução de NADPH só foi adicionada ao meio reaccional depois de parar a reacção ao fim de 15 min. de incubação.

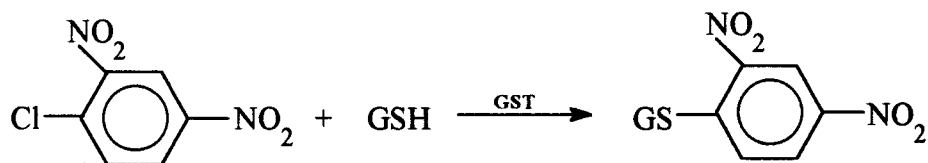
A análise dos derivados metabólicos da testosterona foi efectuada num cromatógrafo equipado com um detector UV/Vis, um injectador com "loop" de  $0,02 \text{ cm}^3$ , uma coluna Superspher 100 RP-18 ( $4 \times 250 \text{ mm}$ ) e uma pré-coluna Lichrosfer ( $4 \times 4 \text{ mm}$ ), tendo sido eluídos isocraticamente numa mistura com 10% de acetonitrilo, 55% de água e 35% de metanol, durante 20 min., seguido de um gradiente linear até 10% de acetonitrilo, 35% de água e 55% de metanol, durante 10 min., e um gradiente inverso

que atingiu as proporções iniciais em 20 min., com um fluxo constante de  $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$  e à temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Alguns dos metabolitos presentes no extracto foram identificados por comparação dos valores dos respectivos tempos de retenção com o tempo de retenção de padrões autênticos de  $6\beta$ -hidroxitestosterona,  $16\alpha$ -hidroxitestosterona,  $11\beta$ -hidroxitestosterona,  $2\alpha$ -hidroxitestosterona, e testosterona submetidos às mesmas condições experimentais e que foram quantificados por interpolação gráfica das respectivas áreas dos picos obtidos a  $254 \text{ nm}$ , em curvas de calibração dos mesmos padrões construídas pelo método de padronização externa para o intervalo de concentração que variou entre  $1,5$  e  $75 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , no caso da  $6\beta$ -hidroxitestosterona, e entre  $0,5$  e  $25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , nos restantes padrões (Apêndice B).

### 3.3.2.6. Glutathione *S*-transferase

A determinação espectrofotométrica da actividade enzimática glutathione *S*-transferase fundamenta-se na reacção:



Embora a reacção seja reversível, dá-se em maior extensão no sentido em que se forma o conjugado 2,4-dinitrofenil *S*-glutathione, um cromóforo que absorve preferencialmente a  $340 \text{ nm}$ .

A actividade catalítica foi determinada na fracção microsomal e no citosol do fígado, assim como no citosol dos rins, timo e testículos, de acordo com o método de Habig *et al.* (1974), acompanhando o aumento de absorvência com o tempo.

Em cada caso, incubaram-se alíquotas de  $0,1\text{cm}^3$  de fracção microsomal ou de citosol com a concentração aproximada de proteínas de  $10\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , na fracção microsomal do fígado e testículos,  $3,5\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , na fracção microsomal dos rins e do timo,  $1\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , no citosol hepático e dos testículos e  $35\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ , no citosol dos rins e do timo, em células de absorção do espectrofotómetro que continham um meio de reacção composto por glutatióno na sua forma reduzida (GSH) (1mM) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (1mM), dissolvidos em tampão fosfato 0,1M pH 6,5, que perfazia um volume de  $3,0\text{ cm}^3$ .

Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional sem a presença do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno no compartimento das células do espectrofotómetro, com a temperatura controlada a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e sob agitação constante, durante 5 min. Iniciou-se a reacção com a adição  $0,1\text{ cm}^3$  de solução etanólica do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e registou-se a variação de absorvência a 340 nm, durante 120 s, nas mesmas condições de agitação e temperatura, um intervalo de tempo 4 x superior aos 30 s descritos por Itio *et al.* (1993) e Siddiqi *et al.* (1990).

As leituras foram efectuadas contra um branco previamente preparado em que se substituiu o substrato por igual volume de etanol.

Calculámos a actividade enzimática a partir do valor do coeficiente angular das rectas obtidas, e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar  $9,6\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Weber e Waxman, 1993, Kore *et al.*, 1993) para o conjugado 2,4-dinitrofenil S-glutatióno.

### 3.3.2.7. Glutathione redutase

A determinação espectrofotométrica dessa actividade enzimática fundamenta-se na reacção:



Embora a reacção seja reversível, dá-se em maior extensão no sentido que conduz à formação da forma reduzida do glutathione. A actividade catalítica foi determinada no citosol do fígado, rins, testículos e timo de acordo com o método proposto por Goldberg e Sponer (1987) acompanhando-se o decréscimo de absorvência a 340 nm devido à oxidação do NADPH. Em cada caso, incubaram-se alíquotas de 0,1 cm<sup>3</sup> do citosol, com a concentração aproximada de proteínas de 20 mg.cm<sup>-3</sup> do fígado, 10 mg.cm<sup>-3</sup> dos rins e 30 mg.cm<sup>-3</sup> dos testículos e timo, em células de absorção do espectrofotómetro que continham um meio de reacção composto por glutathione na sua forma oxidada (GSSG) (2,2mM), EDTA (0,5 mM), NADPH(0,17mM) dissolvidos em 3,0 cm<sup>3</sup> de tampão fosfato 0,1 M pH 7,2.

Procedeu-se a uma pré-incubação do meio reaccional, no compartimento das células do espectrofotómetro, durante 5 min., sem a presença do NADPH, com a temperatura controlada a 37 °C e sob agitação constante. Iniciou-se a reacção com a adição de 0.050 cm<sup>3</sup> de NADPH e registou-se a variação de absorvência durante 120 s, nas mesmas condições de agitação e temperatura, um intervalo de tempo 4 x superior aos 30 s descritos em Itio *et al.* (1993). As leituras foram efectuadas contra um branco previamente preparado no qual se substituiu a solução de NADPH por igual volume de solução tampão. Determinou-se a actividade enzimática, a partir do valor do coeficiente angular das rectas obtidas e utilizando o valor do coeficiente de absorvidade molar para o NADPH de 6,3 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 3.4. Análise estatística

### 3.4.1. Introdução

A variação biológica contribui, muitas vezes, para que os resultados experimentais em bioquímica sejam obtidos com uma dispersão elevada. A estatística também nos diz que a incerteza do valor médio de uma amostra depende da sua própria dimensão e diminui em função do número de indivíduos ou de unidades que representa. No entanto, em muitos estudos biológicos torna-se difícil obter resultados com um número elevado de replicados ( $n$ ), como aconteceu neste trabalho, em que  $n$  corresponde a 5, o número de animais de cada experiência.

Embora possa controlar-se muitos factores que são responsáveis pela dispersão dos resultados como, por exemplo, o sexo, o meio ambiente e a alimentação, existem outros que, pela sua natureza, são difíceis de identificar e controlar, justificando por si só a análise estatística dos resultados experimentais, com a finalidade de discriminar as variações devido ao acaso, à variação biológica ou às diferenças populacionais.

### 3.4.2. Alguns conceitos de Estatística

A Estatística é o ramo da Matemática que permite o estudo de resultados numéricos que levam a inferir e delinear conclusões sobre uma determinada população, a partir de uma amostra suficientemente representativa.

Os resultados experimentais são muitas vezes “imperfeitos” pois, apesar de constituírem informação valiosa, estão sempre afectados pela incerteza das medições

efectuadas e, no caso das experiências bioquímicas, pela variação biológica (Siegel e Morgan, 1996).

O tratamento estatístico de resultados fundamenta-se em modelos que traduzem imagens simplificadas da realidade, mas que se tornam muito úteis na interpretação de situações complicadas. Convém, por isso, introduzir aqui alguns conceitos importantes da estatística como auxiliares interpretativos dos cálculos efectuados.

#### 3.4.2.1. População, amostra, dimensão e selecção da amostra

**População** pode ser considerada qualquer colecção de entidades identificáveis, que podem ser medidas, as quais muitas vezes são designadas por unidades.

**Amostra** corresponde a qualquer grupo de unidades de uma população para as quais a informação está disponível.

A estimativa do valor de uma população designa-se **estatística** e o valor estimado da população **parâmetro** (Sokal e Rohlf, 1981).

A **dimensão da amostra** corresponde ao número de unidades que constituem a amostra e só é adequada quando é representativa das características da população.

A selecção de amostras pode ser **programada**, como aconteceu neste trabalho, ou **probabilística**. No primeiro caso, formam-se classes ou grupos o mais homogéneos possíveis, quer em dimensão quer em factores de variação como, por exemplo, a idade, o sexo ou os tratamentos administrados, e tenta-se comparar os resultados das variáveis medidas em cada grupo. No segundo caso, a amostragem é aleatória e admite-se que a probabilidade de avaliação da amostra é idêntica à dos parâmetros da população (Sokal e Rohlf, 1981).



#### 3.4.2.4. Teorema do limite central

O teorema do limite central diz-nos que:

- As médias das amostras de uma população com distribuição gaussiana terão também uma distribuição gaussiana, qualquer que seja a dimensão  $n$  de cada amostra .

- Quando a dimensão das amostras aumenta, as suas médias aproximam-se estreitamente da distribuição gaussiana independentemente da distribuição da população, ou seja, mesmo quando a distribuição das observações individuais não seja gaussiana (Sokal e Rohlf, 1981; Carvalho, 1988; Siegel e Morgan, 1996).

#### 3.4.2.5. Desvio-padrão da média

O desvio-padrão da média, à semelhança do desvio padrão, pode ser interpretado como uma medida da dispersão das médias das amostras, da mesma forma que o desvio-padrão é uma medida da dispersão dos valores individuais de cada série de resultados. Pode ser calculado dividindo o usual desvio padrão pela raiz quadrada da dimensão da amostra. O desvio padrão da média é, por esse motivo, uma medida do afastamento das médias dos valores das amostras relativamente à média da população e nunca ultrapassa o valor do desvio padrão. Por outro lado, pode também ser considerado um indicador das diferenças existentes entre as médias estatísticas das amostras, pelo que, pode ser encarado como um indicador da variabilidade expectável da média das amostras. Por esse motivo reflecte o facto de a média das amostras ser uma estimativa mais precisa da média da população do que as observações individuais (Sokal e Rohlf, 1981; Siegel e Morgan, 1996).

### 3.4.2.6. Graus de liberdade

A expressão que define o desvio-padrão estatístico  $s$  tem como divisor  $n-1$  em vez de  $n$ , como seria de esperar, por se tratar da média de  $n$  desvios elevados ao quadrado. O valor  $n-1$  representa o número de comparações independentes que se podem fazer entre  $n$  valores e, por esse motivo, corresponde ao número de graus de liberdade.

A expressão grau de liberdade provém de conceitos da geometria e da mecânica em que a posição de um ponto num espaço a  $n$  dimensões é definido por um conjunto de  $n$  coordenadas. Cada coordenada corresponde a um grau de liberdade de movimento do ponto no espaço e, conseqüentemente, cada limitação imposta ao movimento desse ponto reduz o seu número de graus de liberdade. Se for imposto ao ponto  $P$  no espaço a condição de se mover num hiperplano que passe pela origem, passará a haver apenas  $n-1$  graus de liberdade de movimento do ponto  $P$ . Ora, no caso dos desvios  $(x_i - \bar{x})$ , a sua soma é necessariamente igual a zero e isto corresponde à restrição imposta ao movimento do ponto  $P$  no espaço  $n$ -dimensional. De facto, nestes  $n$  desvios apenas  $n-1$  são independentes, uma vez que o último tem o seu valor pré-determinado pela condição de ser:

$$\sum (x_i - \bar{x}) = 0$$

### 3.4.2.7. Intervalos de confiança

A média de uma série de valores de uma amostra aleatória constitui uma boa estimativa da média da população que sofreu a amostragem mas, por si só, não mostra o rigor dessa estimativa, dado que não conhecemos a exactidão com que foi determinada

antes que o intervalo de confiança que lhe está associado seja conhecido. Tal intervalo de confiança apresenta um limite superior e inferior bem definidos e fornece-nos uma ideia de quanto afastada está a média estatística da média desconhecida da população. Assim, deve procurar-se dois valores, um inferior e outro superior à média da amostra, entre os quais podemos encontrar, com determinada probabilidade, as médias dos valores das amostras de tamanho  $n$  seleccionadas na população (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

Em teoria, a distribuição de frequência gaussiana estende-se ao longo do eixo da variável  $x$  desde o infinitamente negativo até ao infinitamente positivo. Isto significa que uma variável com distribuição gaussiana pode assumir qualquer valor, embora sejam raros aqueles que se afastam  $\pm 3\sigma$  da média e para os quais as frequências relativas expectáveis são igualmente muito pequenas. Este facto pode ser deduzido a partir da expressão da função de densidade de probabilidade da distribuição gaussiana:

$$Z = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left[\frac{(\bar{x}-\mu)}{\sigma}\right]^2}$$

a qual nos mostra que para valores muito elevados ou muito pequenos da variável  $x$ , o termo  $1/2 [(\bar{x} - \mu) / \sigma]^2$  toma valores muito elevados e consequentemente a exponencial negativa desse termo e  $Z$  tomarão valores muito pequenos.

Existem tabelas onde os valores de  $Z$  estão ordenados em função da distância à média em unidades de desvio padrão (Pearson e Harley, 1958), que nos permitem concluir que os limites:

$\mu \pm \sigma$  contém 68,27% dos valores que a variável  $x$  pode tomar

$\mu \pm 2\sigma$  contém 95,45% dos valores que a variável  $x$  pode tomar

$\mu \pm 3\sigma$  contém 99,73% dos valores que a variável  $x$  pode tomar

ou, por outro lado, podemos ainda dizer que:

50% dos valores que uma variável  $x$  pode assumir caiem no intervalo  $\mu \pm 0,674\sigma$

95% dos valores que uma variável  $x$  pode assumir caiem no intervalo  $\mu \pm 1,960\sigma$

99% dos valores que uma variável  $x$  pode assumir caiem no intervalo  $\mu \pm 2,576\sigma$

como é ilustrado na figura:

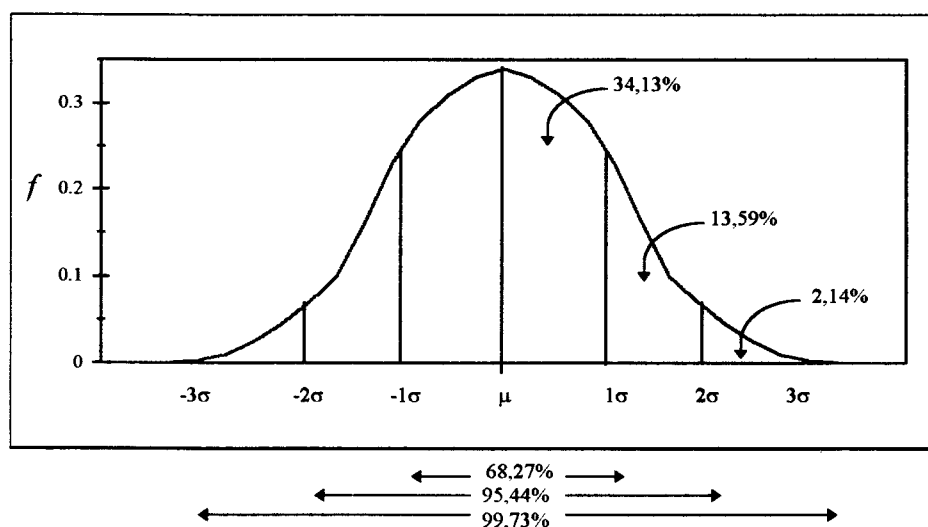


Figura 3.1- Áreas de densidade de probabilidade da função de distribuição gaussiana.

Se considerarmos uma população com média paramétrica  $\mu$ , desvio-padrão  $\sigma$  e desvio-padrão da média  $\sigma/\sqrt{n}$ , admitirmos que segundo o teorema do limite central, as médias de amostra seguem também uma distribuição gaussiana e tivermos em conta a expressão da função de densidade de probabilidade dessa distribuição, podemos dizer que o intervalo  $\mu \pm 1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  inclui 95% das médias de amostra  $\bar{x}$  de dimensão  $n$ , isto é o desvio padrão da média da amostra segue uma distribuição gaussiana e 95% do seu valor cairá entre  $-1,96$  e  $+1,96$ . Se considerarmos a razão  $(\bar{x} - \mu) / \sigma / \sqrt{n}$ , ou seja, o desvio-

padrão da média de uma amostra relativamente à média paramétrica da população, podemos reescrever a afirmação do parágrafo anterior na forma:

$$P \left\{ -1,96 \leq \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}} \leq +1,96 \right\} = 0,95$$

A inequação representada entre chavetas pode sofrer um rearranjo multiplicando todos os termos por  $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$  tomando o aspecto:

$$\left\{ -1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \bar{x} - \mu \leq +1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right\}$$

Tendo em conta que  $-a \leq b \leq a$  implica  $a \geq -b \geq -a$  que pode ser reescrito como  $-a \leq -b \leq a$  a inequação pode ser ainda reescrita como:

$$\left\{ -1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu - \bar{x} \leq +1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right\}$$

ou como:

$$P \left\{ \bar{x} - 1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + 1,96 \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right\} = 0,95$$

Generalizando, teremos então:

$$P \left\{ \bar{x} - \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right\} 1-\alpha = \gamma$$

em que as desigualdades entre chavetas são designadas por **limites de confiança** e  $\gamma$  é o **coeficiente de confiança**, ou seja, que existe a probabilidade  $P = \gamma$  dos termos:

$$\bar{x} - \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, L_1; \quad e \quad \bar{x} + \mu_{\alpha} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, L_2$$

serem respectivamente inferior ou igual e maior ou igual ao valor da média paramétrica  $\mu$  (Sokal e Rohlf, 1981).

#### 3.4.2.8. Distribuição t de “student”

Os desvios  $\bar{x} - \mu$  entre a média estatística e a média paramétrica de uma distribuição gaussiana seguem também uma distribuição gaussiana. O quociente entre esses desvios e o desvio padrão paramétrico:

$$\frac{(\bar{x} - \mu)}{\sigma}$$

também segue uma distribuição gaussiana. A diferença e o quociente calculados anteriormente não alteram a forma da distribuição da média estatística que é gaussiana. Se nós calcularmos a variância estatística  $S_i^2$  e  $(\bar{x}_i - \mu) / s$ , o desvio de cada média estatística relativamente à média paramétrica, onde  $S$  estima o desvio-padrão da média de  $i$  amostras, nós poderemos descobrir que a distribuição dos desvios é mais ampla e favorável do que a distribuição gaussiana. Esta nova distribuição tem um intervalo de variação superior ao da distribuição gaussiana, devido ao denominador ser o desvio-padrão da amostra em vez do desvio-padrão paramétrico (Sokal e Rohlf, 1981; Siegel e Morgan, 1996).

A distribuição expectável da razão  $(\bar{x}_i - \mu) / s$  é designada por distribuição t de “students”, o pseudónimo de Gossett, que foi quem a descreveu pela primeira vez. A equação que traduz a função de distribuição t é uma fórmula matemática complicada que não será aqui apresentada (Sokal e Rohlf, 1981; Siegel e Morgan, 1996).

Esta distribuição apresenta propriedades de simetria e de expansão semelhantes à da distribuição gaussiana, desde o infinitamente negativo até ao infinitamente positivo.

No entanto, difere dessa distribuição porque assume diferentes formas em função dos graus de liberdade que podem variar desde 1 até ao infinito. Quando assume o valor 1, a distribuição t de “student” desvia-se acentuadamente da distribuição gaussiana mas, à medida que o número de graus de liberdade aumentam, aproxima-se da forma dessa distribuição (Sokal e Rohlf, 1981).

Os limites de confiança podem ser calculados com base nesta nova função de distribuição, de acordo com a expressão:

$$P\{L_1 \leq \mu \leq L_2\} = P\{\bar{X} - t_{\alpha}[n-1]S_{\bar{y}} \leq \mu \leq \bar{X} + t_{\alpha}[n-1]S_{\bar{y}}\} = 1-\alpha$$

Embora os limites de confiança sejam, de facto, uma medida útil da confiança da estatística de uma amostra, não são frequentemente apresentados nas publicações científicas, utilizando-se, em regra, em sua substituição, o desvio-padrão da média (Sokal e Rohlf, 1981; Siegel, e Morgan, 1996).

### 3.4.2.9. Análise de variância simples

A análise de variância foi desenvolvida pela primeira vez por Fischer e tem como objectivo testar se a média estatística de duas ou mais amostras provêm de populações com a mesma média paramétrica.

Tradicionalmente, o teste t tem sido utilizado para esse efeito quando se pretende determinar diferenças significativas entre duas amostras. No entanto, para um número superior de amostras a análise de variância simples, ANOVA I, é um teste mais adequado pelo que será esse que passaremos a descrever (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Carvalho, 1988; Siegel e Morgan, 1996).

Em qualquer análise de variância, comparamos sempre a amostras ou grupos de  $n$  replicados e podemos sempre obter estimativas da variância da população a partir da soma dos quadrados de cada grupo utilizando a expressão:

$$s^2 = \frac{1}{(n-1)} \sum_{j=1}^n (x_{1j} - \bar{x}_1)^2$$

Todavia, existem razões para efectuarmos uma melhor estimativa da variância, efectuando o cálculo da média pesada da variância pela expressão geral em que a variância de cada amostra  $s_i^2$  é afectada pelos graus de liberdade  $w_i = n_i - 1$ :

$$\frac{1}{a(n-1)} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{j=n} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$$

O valor obtido por esta expressão é uma estimativa baseada em estatísticas da variância de  $a$  grupos e designa-se vulgarmente por **variância no interior dos grupos**. Este termo estima a dispersão em cada grupo individualmente, assumindo que todos os grupos são igualmente variáveis e englobando a variação em todos eles.

O termo é também designado por estimativa em “pool” da variância, devido à informação acerca da dispersão ter sido colocada num “pool” comum (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

Como veremos a seguir, podemos também calcular a variância entre grupos eliminando as próprias fronteiras entre os grupos. Para obtermos essa segunda estimativa da população, trataremos as médias  $\bar{x}$  dos  $a$  grupos, como se tratassem de  $a$  observações de uma amostra. Os resultados estatísticos podem então ser obtidos pela expressão:

$$\frac{\sum (\bar{x} - \bar{\bar{x}})^2}{(a-1)}$$



divide-se por  $a-1$  em vez de  $n-1$  porque a soma dos quadrados foi efectuada com  $a$  grupos. Considerando que para uma amostragem aleatória de uma única população:

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{\sigma^2}{n}$$

temos que:

$$n\sigma_{\bar{x}}^2 = \sigma^2$$

podemos estimar a variância das médias multiplicando pela dimensão da amostra. Esta segunda estatística da variância paramétrica não está tão próxima do valor tomado como verdadeiro como a estatística anterior baseada na variância média dentro dos grupos. Poderemos chamar a esta variância, **variância entre grupos**  $i$  e que é  $n$  x a variância das médias, sendo um estimador independente da variância paramétrica  $\sigma^2$ . A **variância entre grupos** que estima essencialmente a dispersão das médias entre os grupos pode então ser calculada por :

$$\frac{1}{a-1} \sum_{i=1}^{i=a} n_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2$$

A multiplicação pela dimensão das amostras, confere a cada grupo um peso proporcional à informação que dá da situação. O numero de graus de liberdade ( $a-1$ ) representa a quantidade de replicados a que temos acesso (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

O conhecimento destes dois estimadores independentes da variância da população permite-nos testar se, de facto, eles estimam o mesmo parâmetro ou não. Para esse efeito, utiliza-se a função de distribuição F.

### 3.4.2.10. Distribuição F

Se efectuarmos uma amostragem em que registamos  $n_1$  replicados da amostra 1 e calcularmos a sua variância  $s_1^2$ , e de seguida registarmos para  $n_2$  replicados da amostra 2 e calcularmos a sua variância  $s_2^2$  mesmo que a dimensão da amostra 1 seja diferente da dimensão da amostra 2, o quociente:

$$F_s = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

deverá ser próximo de 1, se as variâncias estatísticas estimarem o mesmo parâmetro. Os matemáticos estatísticos tem trabalhado na distribuição expectável desta estatística que denominaram distribuição F, a qual é descrita por uma equação matemática complicada que não vai aqui ser descrita. Contrariamente à distribuição t a forma da distribuição F depende de dois tipos de graus de liberdade  $\sigma_1$  e  $\sigma_2$ .

A distribuição F é uma distribuição de probabilidade teórica e o quociente das variâncias das amostras  $s_1^2 / s_2^2$  são estimadores estatísticos que podem ou não seguir uma distribuição F.

Para um número de graus de liberdade muito baixo a distribuição toma a forma de L mas à medida que esse valor aumenta a distribuição descreve uma curva com um máximo que se desloca para a direita. As tabelas da distribuição F apresentam a função de distribuição cumulativa para vários valores de probabilidade seleccionados (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Carvalho, 1988; Siegel e Morgan, 1996).

Quando pretendemos testar a hipótese nula  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ , determinamos, por leitura ou por interpolação, o valor crítico da tabela correspondente ao número de graus de liberdade respectivo, para um determinado nível de confiança. Calculamos o valor do F estatístico que, nesta situação, é igual ao quociente da **variância entre**

**grupos pela variância no interior dos grupos.** Se o valor do F estatístico for superior ao valor crítico da tabela, rejeitamos a hipótese nula de as médias dos grupos estimarem populações idênticas e concluímos que existem diferenças entre eles. Caso contrário, as diferenças observadas não podem ser consideradas estatisticamente significativas e aceitamos a hipótese nula. (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Carvalho, 1988; Siegel e Morgan, 1996).

#### 3.4.2.11. Comparação entre médias

Quando o teste F nos permite detectar diferenças significativas entre os grupos, em estudos planeados, como fizemos no nosso trabalho, podemos passar a uma segunda fase da análise de variância para determinar efectivamente quais os grupos que são significativamente diferentes. Caso contrário, não faz sentido prosseguir, uma vez que não foram estabelecidas diferenças reais entre os grupos da população (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

Neste segundo estágio, a média estatística de cada grupo é comparada com a média estatística dos outros grupos utilizando testes que derivam do teste t. Estes testes fazem sentido quando pretendemos avaliar se os tratamentos efectuados contribuíram para as diferenças observadas entre os grupos (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

Os testes são semelhantes aos que são utilizados para comparar dois grupos mas, nestes casos, utilizamos estimativas da dispersão em “pools” de todos os grupos, mesmo quando só comparamos dois grupos, uma vez que a estimativa com base no “pool” de variância nos dá um teste mais sensível. Assim, para aceitar que as médias de dois grupos

particulares são significativamente diferentes, calcularemos o desvio padrão do “pool” e o seu número adequado de graus de liberdade.

Existem muitas vias para comparar médias de tratamentos testados numa experiência, que são também vulgarmente designados por comparação de pares ou comparação de grupos (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

A comparação de pares é a comparação mais simples e utilizada mais frequentemente em análise de sistemas biológicos. Entre os testes utilizados em investigação biológica destacam-se o teste LSD (least significant difference) e o teste de Duncan ou DMRT de “Duncan’s multiple range test” (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984).

O teste LSD é adequado para efectuar uma comparação planeada de pares mas não é correcto para comparar todos os possíveis pares de médias, especialmente quando o número de tratamentos é elevado, uma vez que a probabilidade de pelo menos um par possuir uma diferença que exceda o valor de LSD aumenta com o número de tratamentos a serem testados. Deste modo, deve evitar-se o teste LSD para comparação de todos os possíveis pares de médias e por esse motivo não será aqui descrito (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984).

#### 3.4.2.12. Teste de Duncan

Quando o número total de tratamentos é elevado o teste de Duncan é mais adequado. O procedimento envolve o cálculo de fronteiras numéricas ou intervalos de confiança que permitam considerar como significativas ou não as diferenças observadas entre quaisquer duas médias de tratamentos (Gomez e Gomez, 1984)

O procedimento comparativo para o cálculo dos valores passa pela ordenação das médias estatísticas de todos os tratamentos por ordem crescente ou decrescente do seu valor e pelo cálculo do valor do desvio-padrão da média  $S\bar{d}$  utilizando a equação:

$$S\bar{d} = \sqrt{\frac{2s^2}{n}}$$

Seguidamente, calculam-se (a-1) intervalos de confiança  $R_p$  pela expressão:

$$R_p = \frac{(r_p)(S\bar{d})}{\sqrt{2}} \quad \text{para } p = 2, 3, \dots, a$$

onde **a** corresponde ao número total de tratamentos,  $S\bar{d}$  ao desvio-padrão da média das médias já calculados e  $r_p$  diz respeito aos valores tabelados dos intervalos de confiança da distribuição de “student” dependentes da posição de ordenação **p** de cada média estatística e de a (n-1) graus de liberdade.

Uma vez determinados os valores de  $R_p$ , calcula-se a diferença entre a média estatística mais elevada e o maior valor de  $R_p$ , ou seja, o valor de  $R_p$  com  $p = t$ , que será comparado com os valores das outras médias estatísticas.

Quando as médias estatísticas são inferiores a essa diferença, consideram-se significativamente diferentes da média estatística mais elevada (Duncan e Degroot, 1976; Gomez e Gomez, 1984).

Em seguida, repetem-se os passos anteriores, calculando-se uma nova diferença com os valores de  $R_p$  e das médias dos tratamentos remanescentes e procede-se como anteriormente. O processo repete-se até se comparar todos os pares de grupos em estudo (Gomez e Gomez, 1984).

### 3.4.2.13. Erros

A utilização da análise estatística conduz a resultados mais ou menos prováveis e, como tal, a interpretação teórica dos testes de hipóteses apresentados anteriormente podem levar a que se cometam dois tipos de erros: tipo I e tipo II, ou seja a rejeição de uma hipótese nula verdadeira ou a aceitação de uma falsa hipótese nula, respectivamente.

O erro do tipo II não é fácil de controlar porque depende do rigor com que as médias estatísticas das amostras estimam a média das populações e essa informação nós não temos. Uma vez que o estágio de agrupamento exige a detecção de diferenças significativas pelo teste F, a combinação de ambos os procedimentos exerce um certo controlo sobre os erros do tipo I com um nível de significância  $\alpha$ , isto é, se não existirem de facto diferenças entre as médias dos grupos da população então as conclusões para uma dada experiência são erradas e só  $\alpha\%$  das vezes descobrimos diferenças significativas entre eles.

Deste modo o erro do tipo I é controlado a  $\alpha\%$  da extensão em que os erros ocorrem numa determinada situação (Sokal e Rohlf, 1981; Gomez e Gomez, 1984; Siegel e Morgan, 1996).

### 3.4.3. Metodologia utilizada neste trabalho

Os resultados estatísticos deste trabalho são apresentados de forma gráfica tendo em vista dar um panorama geral dos mesmos de maneira simples e rápida. As representações utilizadas são linhas ou curvas com escala aritmética e gráficos de barras. Os elementos incluídos em cada representação gráfica são o título, a legenda explicativa

da natureza dos resultados e a origem dos mesmos. As coordenadas são o mais pequeno possível, estando as unidades indicadas de forma clara.

No caso particular dos gráficos de barras, a forma de representação mais utilizada neste trabalho, a sua espessura é arbitrária mas o seu comprimento é proporcional ao valor absoluto do componente que representa, como é recomendado em Sokal e Rohlf (1981, 1997).

Utilizámos, como estatística de localização, a média aritmética. Para tal, utilizámos sempre os resultados com precisão o mais semelhante possível, uma vez que a média aritmética só deverá ser utilizada no caso de possuímos resultados igualmente seguros.

Utilizamos o desvio-padrão da média como medida da dispersão dos resultados, na representação de medidas como o peso do animal ou o volume de água ingerido, obtidos com os animais intactos, ou na representação das concentrações e actividades enzimáticas do fígado, porque o desvio-padrão da média quantifica o afastamento das médias dos valores das amostras relativamente á média da população, reflectindo, por esse motivo, o facto de a média das amostras constituir uma estimativa mais precisa da média da população do que as observações individuais (Sokal e Rohlf, 1981, 1997, Siegel e Morgan, 1996).

Os resultados obtidos com o animal intacto, como o peso corporal ou dos órgãos seleccionados, o volume de água ou a quantidade de alimentos ingeridos, assim como os conteúdos e actividades enzimáticas do sistema P450, glutathione *S*-transferase e glutathione reductase hepáticos, foram submetidos a análise de variância e ao teste de Duncan. Os resultados obtidos com rins, testículos, e timo não foram submetidos a esse tratamento por serem triplicados de “pools” do órgão de cada grupo de cinco animais e

incluam já a dispersão devido à variação biológica. Por esse motivo, calculámos apenas a média aritmética dos triplicados e o respectivo desvio-padrão que utilizamos para a representação gráfica dos resultados.

Neste trabalho, testámos a existência de diferenças significativas na resposta do peso corporal, do volume de água ingerida e de outros parâmetros registados com o animal inteiro, assim como do sistema P450 e de alguns enzimas do metabolismo do glutatióno do fígado, ao isoproterenol, em duas fases distintas do desenvolvimento de ratos machos Wistar. Para esse efeito, constituímos grupos de ratos o mais semelhantes possíveis em termos de peso, idade ou doses administradas, tendo comparado entre si os resultados das variáveis por análise de variância simples.

Procedemos ao cálculo da **variância total** ( $s^2$ ) para todos os grupos em estudo, da **variância entre grupos** e da **variância no interior dos grupos** para termos uma ideia sobre a variação individual e o erro experimental.

Aceitamos diferenças significativas entre os grupos comparados, negando a hipótese nula  $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$  nas situações em que o valor do F-estatístico, o quociente da variância **entre os grupos** pela variância no **interior dos grupos**, excedeu o valor tabelado de F, para os respectivos graus de liberdade, com o nível de significância de 99% (Apêndice A).

Procedemos à discriminação dos grupos significativamente diferentes pelo teste de Duncan, pressupondo-se que as diferenças entre grupos são devidas aos tratamentos fixos.

Os cálculos e as representações gráficas que apresentamos foram efectuados utilizando os programas Excell 97 e SPSS Base 8.0 for Windows licenciados pela Microsoft para a Universidade de Évora.



### 3.5. Equipamento

- Balança analítica da marca Mettler, modelo AE 200
- Balança técnica da marca Mettler, modelo PJ 3000
- Banho de ultra-sons da marca Sonorex, modelo Bandelin RK 100
- Banho termostaticado com agitação da marca Selecta Unitronic, modelo 3200 R
- Bidestilador da marca Aquatron, modelo A 4D
- Centrífuga da marca Hermle, modelo Z380
- Cromatógrafo para cromatografia líquida de elevada eficácia (HPLC) da marca Isco constituído por uma bomba modelo 2350, gradiente modelo 2360 e detector UV/Vis, modelo V4R, com sistema de aquisição e tratamento automático de resultados pelo software Star Chromatography Workstation 03-914401 em computador IBM 325 T/S
- Espectrofluorímetro de feixe simples da marca Shimadzu, modelo RF-5001 PC
- Espectrofotómetro de feixe duplo da marca Hitachi, modelo U2000, com banho termostaticado e sistema de circulação de água da marca Grant.
- Homogeneizador tipo Potter da marca TRI- R Instruments STiR-R, modelo K41
- Medidor de pH da marca Metrohm, modelo 691
- Supercentrífuga da marca Hermle, modelo Z382 K
- Ultracentrífuga da marca Sorvall, modelo Ultra 80 TM & Combi Plus equipada com o rotor Sorvall T-875
- Vortex da marca Heidolph, modelo Reax 2000

### 3.6. Reagentes

- Acetato de amónio, pró-análise, 98,0%, MERCK, Darmstadt
- Acetilacetona, pró-análise (d = 1,05) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Acetonitrilo, Lichrosolv gradiente grade para cromatografia (d = 0,78) 99,8%, MERCK, Darmstadt
- Ácido acético glacial, pró-análise (d = 0,97) 100%, MERCK, Darmstadt
- Ácido clorídrico, pró-análise (d = 1,19) 37%, MERCK, Darmstadt
- Ácido DL-isocítrico, pró-análise, 96,0%, Sigma, St. Louis
- Ácido etilenodiaminotetracético (sal dissódico), pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Água, Lichrosolv gradiente grade para cromatografia, MERCK, Darmstadt
- Albumina sérica bovina, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Azoto R, Ar Líquido, Lisboa
- Carbonato de sódio anidro, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cianeto de potássio, pró-análise, 97,0%, MERCK, Darmstadt
- Citocromo c, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Cloreto de potássio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Cloreto de sódio, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno, pró-análise, 98,0 %, Sigma, St. Louis
- Diclorometano, pró-análise (d = 1,32) 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de potássio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- Dihidrogenofosfato de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt

- Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio), pró-análise, 97,0 %, Sigma, St. Louis
- Ditionito de sódio, pró-análise, >99,0%, MERCK, Darmstadt
- Etanol, pró-análise (d = 0,79) 99,8%, MERCK, Darmstadt
- 7-Etoxicumarina, pró-análise, 99,5%, Sigma, St. Louis
- 7-Etoxiressorufina, pró-análise, > 99,0 %, Sigma, St. Louis
- Fenol, pró-análise, BDH, England
- Ferricianeto de potássio, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (sal sódico) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (sal de sódio) pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glicina, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis.
- Glutationo, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Glutationo reduzido, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Hidroclorato de etilmorfina, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Hidroclorato de semicarbazida, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Hidrogenofosfato de sódio di-hidratado, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- 7-Hidroxycumarina, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Hidróxido de bário octahidratado, pró-análise, 98,0%, MERCK, Darmstadt
- Hidróxido de sódio, pró-análise, 99,0%, MERCK, Darmstadt
- 2 $\alpha$ -Hidroxitestosterona, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- 16 $\alpha$ -Hidroxitestosterona, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- 6 $\beta$ -Hidroxitestosterona, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis

- 11 $\beta$ -Hidroxitestosterona, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Isocitrato desidrogenase (de coração de porco), pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Metanal, pró-análise (d = 1,09) 37%, MERCK, Darmstadt
- Metanol, Lichrosolv gradiente grade para cromatografia, (d = 0,79) MERCK, Darmstadt
- Monóxido de carbono grau CA 15°, RI.93B, Ar Líquido, Lisboa
- Ortofosfato de tripotássio, pró-análise, 98,0%, Sigma, St. Louis
- Piridina, pró-análise (d = 0,98) MERCK, Darmstadt
- Reagente de fenol segundo Folin-Ciocalteu, pró-análise, Sigma, St. Louis
- Resorufina, pró-análise, >99,0%, Sigma, St. Louis
- sulfato de magnésio hepta-hidratado, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Sulfato de zinco, pró-análise, 99,5%, MERCK, Darmstadt
- Tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado, pró-análise, 99,9%,MERCK, Darmstadt
- Testosterona, pró-análise, 99,0%, Sigma, St. Louis
- Tris (hidroximetil) aminometano, pró-análise, 99,9%, MERCK, Darmstadt



## **4.Resultados**

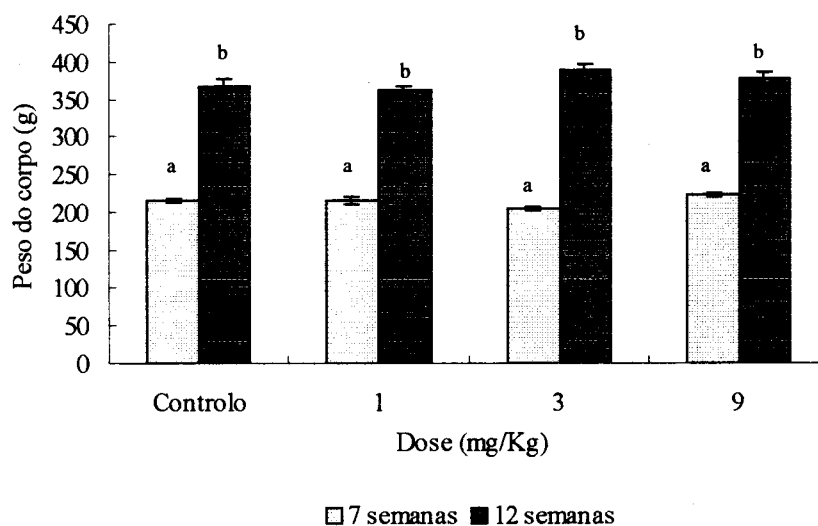


## 4.1. Influência da idade e do tratamento com isoproturão em ratos machos Wistar

Apresentamos nesta secção os resultados que traduzem a influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso corporal, na quantidade de alimentos e de água ingeridos, assim como na quantidade de fezes e de urina produzidos durante os ensaios.

### 4.1.1. Peso do corpo

O peso corporal aumentou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar, comparando, na figura 4.1., os valores obtidos para os ratos controlo de cada idade. A referida representação gráfica mostra-nos ainda que o tratamento com isoproturão não afectou o peso do corpo nas duas idades estudadas, pois não registámos diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre os grupos a que se administrou o xenobiótico e os respectivos grupos controlo de cada idade.

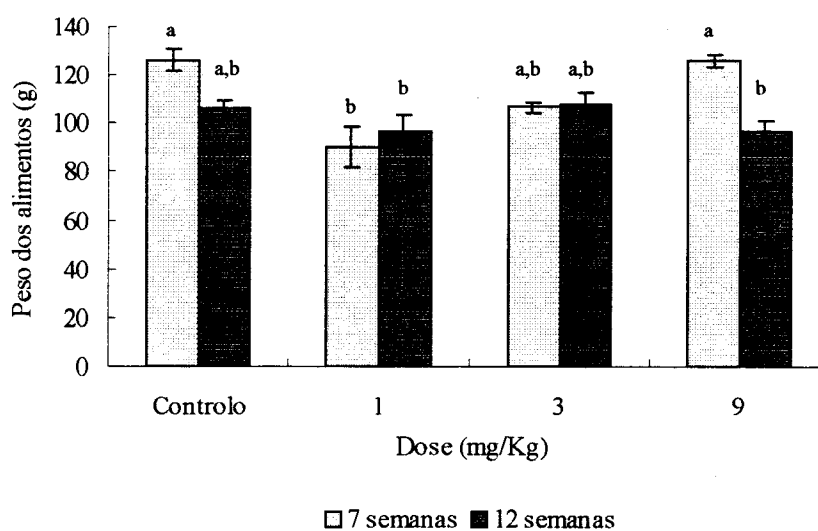


**Figura 4.1.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso do corpo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .



#### 4.1.2. Quantidade total de alimentos ingeridos

A quantidade total de alimentos ingeridos durante os ensaios não variou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.2.



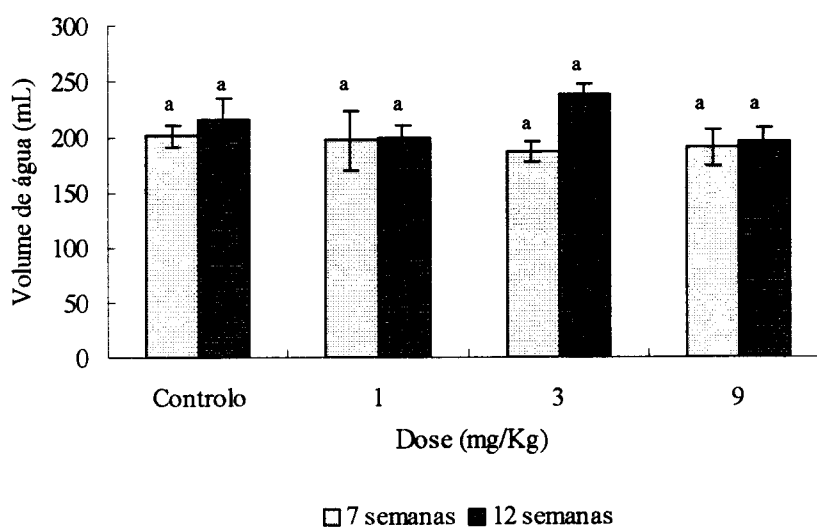
**Figura 4.2.** Influência da idade e do tratamento com isoprotrurão na quantidade de alimentos ingeridos por ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

A mesma figura mostra-nos ainda que o tratamento dos animais pubertais com isoprotrurão só afectou significativamente ( $P < 0,01$ ) a quantidade total de alimentos ingeridos pelos ratos injectados com a dose de 1mg/Kg, sendo inferior à dos animais controlo com 7 semanas de vida.

Nos animais maturos, não ocorreram variações significativas ( $P < 0,01$ ) devido ao tratamento com o xenobiótico.

### 4.1.3. Quantidade total de água ingerida

A figura 4.3. mostra-nos que o volume total de água ingerida ao longo dos ensaios não variou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida.

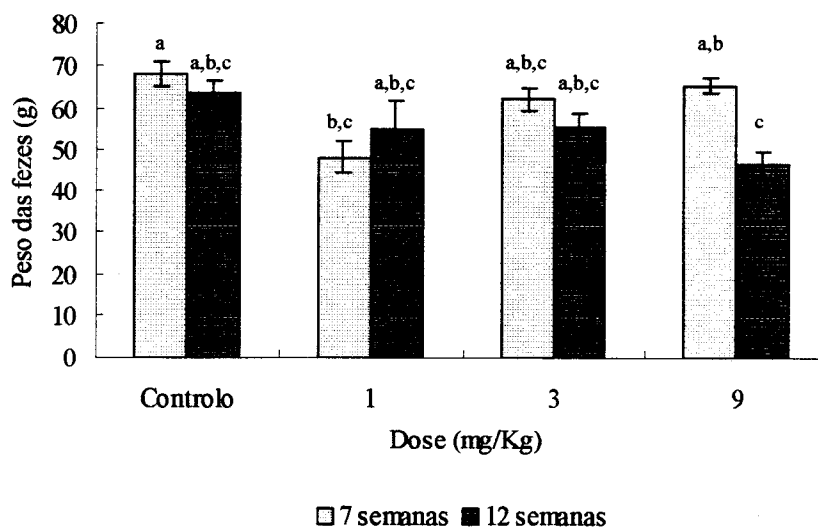


**Figura 4.3.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na quantidade de água ingerida por ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

A referida representação gráfica mostra-nos ainda que o tratamento com o xenobiótico também não afectou a quantidade total de água ingerida durante os ensaios, uma vez que não observámos diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre o volume de água que ratos tratados e ratos controlo ingeriram.

### 4.1.4. Quantidade total de fezes produzidas

O peso total de fezes produzidas ao longo dos ensaios também não variou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre os grupos controlo de cada idade estudada, como podemos observar na figura 4.4.



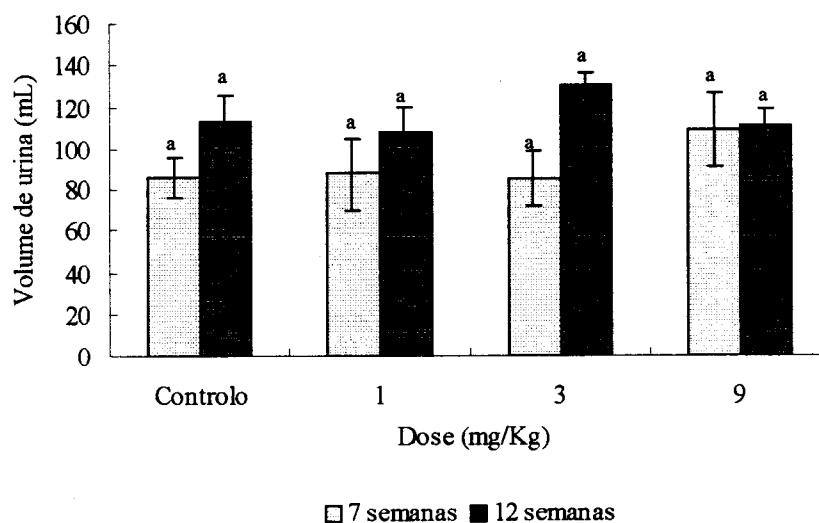
**Figura 4.4.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na quantidade de fezes produzidas por ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

A mesma representação gráfica mostra-nos ainda que, nos animais tratados com isoproterurão, apenas no grupo de ratos pubertais injectados com a dose de 1 mg/Kg e no grupo de ratos adultos injectados com a dose de 9 mg/Kg ocorreu uma pequena diminuição com significado estatístico ( $P < 0,01$ ).

#### 4.1.5. Quantidade total de urina produzida

A figura 4.5. mostra-nos que o volume total de urina produzida ao longo dos ensaios não variou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida.

A referida representação gráfica revela-nos ainda que o tratamento com o xenobiótico também não afectou a quantidade total de urina produzida durante os ensaios, uma vez que não observámos diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre ratos tratados e controlo de ambas as idades.



**Figura 4.5.** Influência da idade e do tratamento com isoproterão na quantidade de urina produzida por ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2. Influência da idade e do tratamento com isoproterão no fígado de ratos machos Wistar

Apresentamos neste subcapítulo os resultados que traduzem a influência da idade e do tratamento com isoproterão no peso do fígado, na sua relação com o peso do corpo, na concentração e na actividade enzimática de constituintes da fracção microsomal e do citosol hepático.

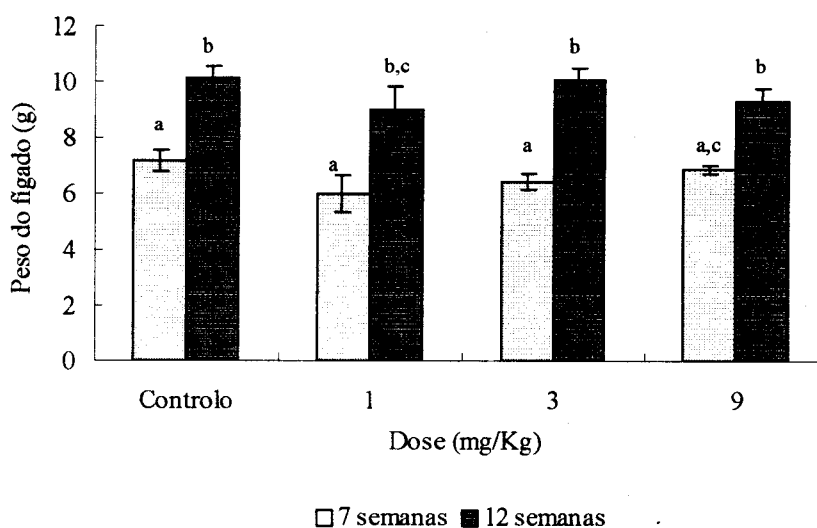
As actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, glutathione *S*-transferase da fracção microsomal, glutathione *S*-transferase do citosol e glutathione redutase foram calculados a partir dos coeficientes angulares de rectas de regressão com coeficientes de correlação que caíram nos intervalos 0,977998-0,999781; 0,994743-0,999430; 0,960507-0,999936 e 0,996991-0,999720, respectivamente.

## 4.2.1. Orgão intacto

### 4.2.1.1. Peso húmido

O peso húmido do fígado aumentou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.6.

O tratamento com isoproturão não afectou significativamente ( $P < 0,01$ ) o peso húmido deste órgão nas duas idades estudadas.

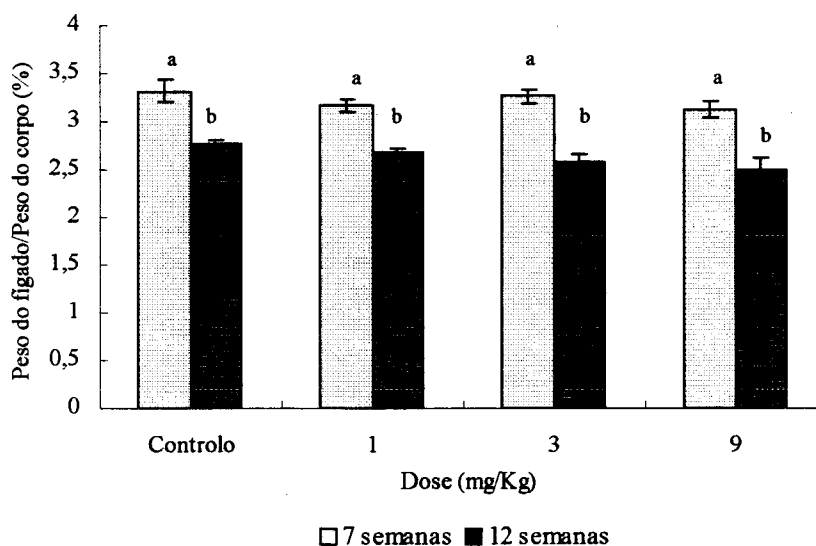


**Figura 4.6.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso húmido de fígado de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

### 4.2.1.2. Relação peso húmido do órgão / peso do corpo

A relação peso fígado/peso do corpo sofreu uma pequena diminuição com significado estatístico ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.7.

A mesma representação gráfica mostra-nos ainda que o tratamento com isoproterurão não provocou alterações significativas ( $P < 0,01$ ) na relação peso do fígado/peso do corpo, relativamente aos controlos de cada idade.



**Figura 4.7.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na relação peso do fígado/ peso do corpo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

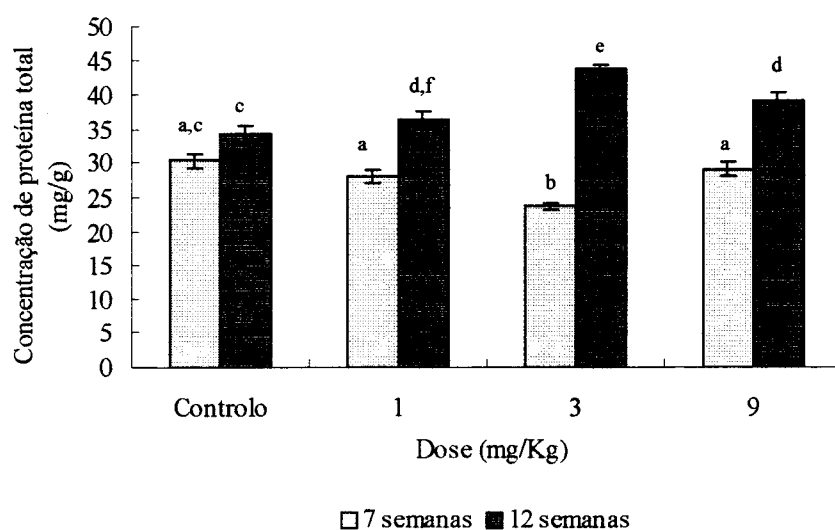
## 4.2.2. Fracção microssomal

### 4.2.2.1. Concentração de proteína total

A concentração de proteína total da fracção microssomal hepática sofreu um pequeno aumento entre as 7 e as 12 semanas de vida que só foi significativo para ( $P < 0,05$ ), como pode ser observado na figura 4.8..

A mesma figura mostra-nos, também, que o tratamento com isoproterurão provocou apenas uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da concentração proteica microssomal no grupo de animais com 7 semanas de idade que foram tratados com a

dose de 3mg/Kg. Podemos observar ainda que nos animais sexualmente maduros o efeito foi contrário ao observado nos ratos mais jovens, ocorrendo um aumento significativo ( $P<0,01$ ) da concentração de proteína total da fracção microssomal em qualquer dos grupos injectados com o xenobiótico.



**Figura 4.8.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total da fracção microssomal (mg/g de tecido húmido) de fígado de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P<0,01$ .

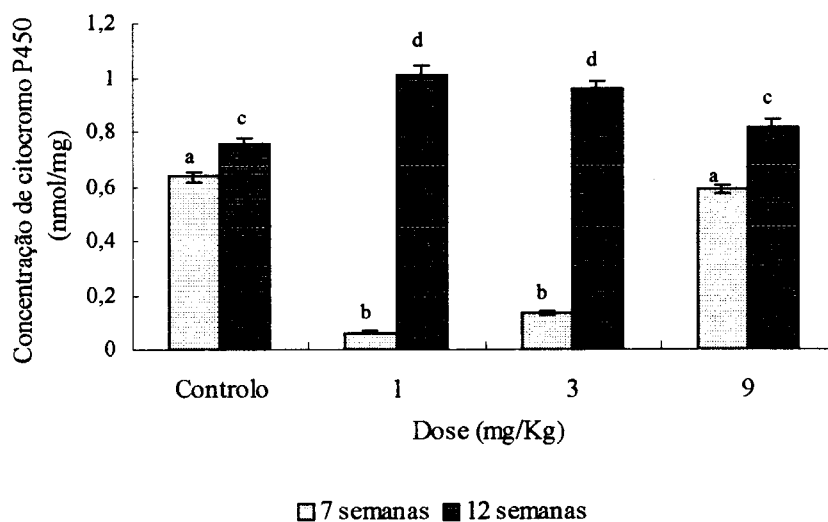
#### 4.2.2.2. Concentração de citocromo P450

A concentração de citocromo P450 do fígado sofreu um aumento significativo ( $P<0,01$ ) entre a puberdade e fase de adulto jovem, como nos mostra a figura 4.9.

Através dessa representação gráfica, podemos ainda observar que a concentração hepática de citocromo P450 diminuiu, nos ratos injectados com o isoproturão, às 7 semanas de vida. Mais uma vez a resposta ao xenobiótico dada pelos ratos mais velhos foi diferente dos ratos pubertais, uma vez que ocorreu um aumento significativo

( $P < 0,01$ ) da concentração de citocromo P450 nos ratos injectados com o isoproturão às 12 semanas de idade.

Em cada fase etária, o efeito provocado pelo xenobiótico, só foi significativo ( $P < 0,01$ ) para os grupos de ratos tratados com as doses de 1 e 3 mg/Kg.



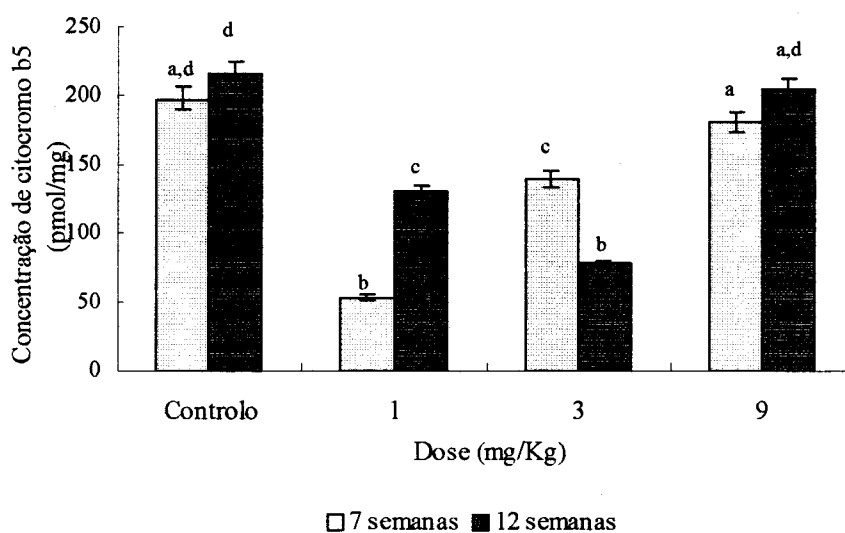
**Figura 4.9.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de citocromo P450 da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (nmol/mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.3. Concentração de citocromo b5

A concentração de citocromo b5 do fígado não se alterou entre as 7 e as 12 semanas de vida, uma vez que não observámos variações significativas entre os grupos controlos de cada idade, como se conclui da figura 4.10..



A referida figura mostra-nos, ainda, que o tratamento com isoproteronolol provocou em qualquer das idades estudadas, uma diminuição da concentração de citocromo b5 que foi significativa ( $P < 0,01$ ) nos ratos injectados com as doses de 1 e 3 mg/Kg.



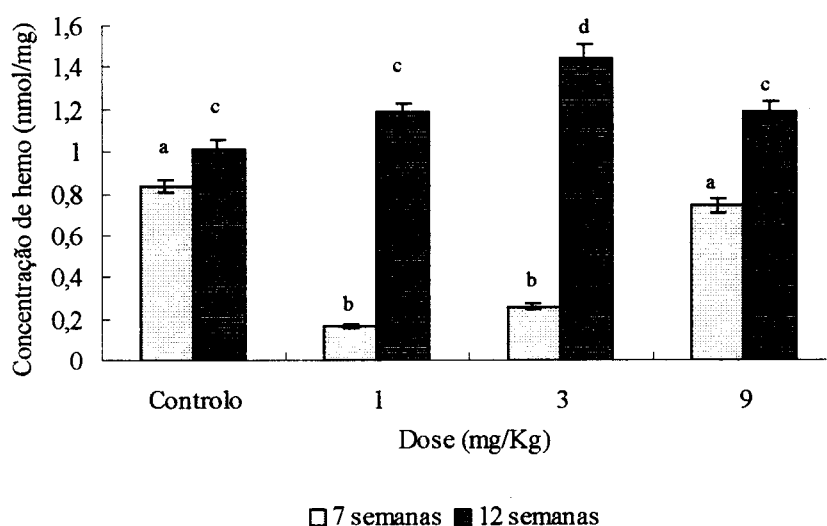
**Figura 4.10.** Influência da idade e do tratamento com isoproteronolol na concentração de citocromo b5 da fracção microsomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/mg de proteínas microsomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.4. Concentração de hemo

A concentração de hemo da fracção microsomal hepática sofreu um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) entre a puberdade e a fase de adulto jovem, como podemos observar através da figura 4.11.

A mesma representação gráfica permite-nos observar que o tratamento com o isoproteronolol exerceu um efeito diferente em cada idade estudada, ocorrendo um acentuado decréscimo da concentração de hemo com significado estatístico ( $P < 0,01$ )

nos ratos com 7 semanas de vida que foram injectados com as doses de 1 e 3 mg/Kg, o que foi contrariado nos ratos maturos por um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) para essas mesmas doses. No entanto, as diferenças observadas são significativas para todas as doses quando consideramos  $P < 0,05$ . Apesar de nos ratos maturos não ser possível estabelecer uma relação clara entre a dose de isoproturão injectada e o efeito observado, nos ratos mais jovens observa-se que o efeito diminuiu à medida que a dose administrada aumentou.

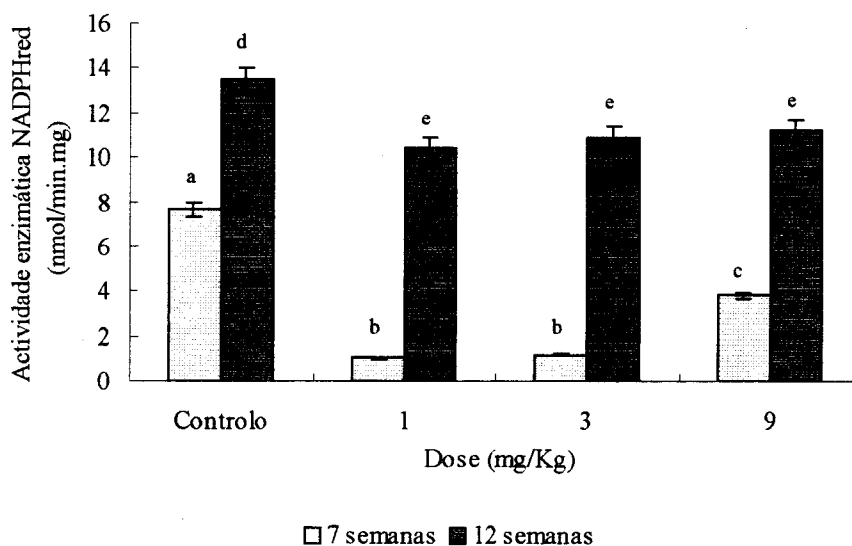


**Figura 4.11.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de hemo da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (nmol/ mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.5. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase

A figura 4.11. mostra-nos que a actividade enzimática NADPH (P450) redutase microssomal hepática aumentou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre a puberdade e a fase de adulto jovem.

A referida representação gráfica também nos revela que o tratamento com o isoproterurão provocou um decréscimo significativo ( $P < 0,01$ ) desta actividade catalítica em qualquer das idades estudadas, embora nos animais mais jovens o efeito pareça diminuir à medida que a dose injectada aumentou.

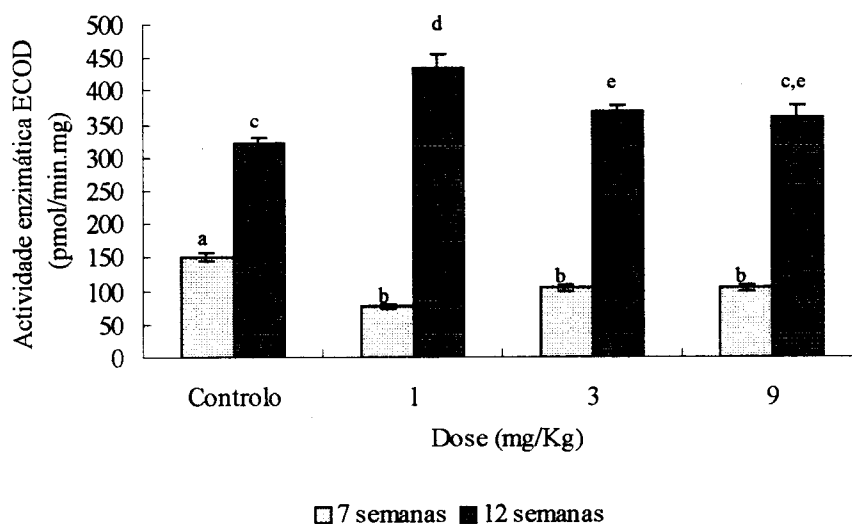


**Figura 4.12.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (nmol/min.mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.6. Actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microssomal do fígado aumentou entre a puberdade e a fase de adulto jovem, como pode ser observado pelas diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) registadas para os grupos controlo na figura 4.13.

Através dessa representação gráfica, podemos ainda observar que o efeito produzido pelo tratamento com isoproterurão depende da idade, uma vez que, em todos os grupos de ratos pubertais injectados com o xenobiótico, ocorreu uma diminuição significativa ( $P<0,01$ ) desta actividade catalítica, mas nos ratos adultos tratados com as doses de 1 e 3 mg/Kg ocorreu um aumento significativo ( $P<0,01$ ).

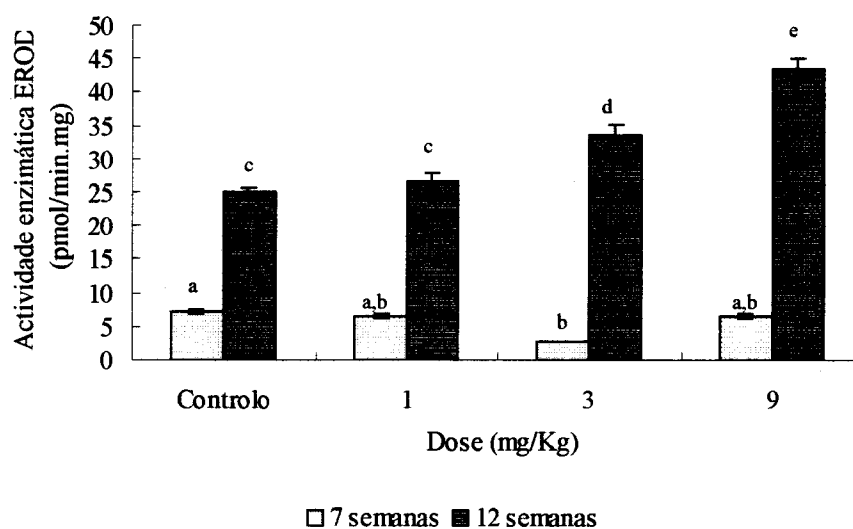


**Figura 4.13.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/min.mg de proteínas microsossomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P<0,01$ .

#### 4.2.2.7. Actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase

A actividade 7-etoxirresorufina *O*-desetilase microsossomal hepática aumentou entre as 7 e as 12 semanas de vida, conforme podemos observar na figura 4.14 através da diferença significativa ( $P<0,01$ ) registada entre os grupos controlo.

A partir da figura 4.14, podemos igualmente observar que o tratamento com o isoproterurão não afectou significativamente ( $P < 0,01$ ) esta actividade enzimática nos animais com 7 semanas de vida. No entanto, nos animais adultos jovens, injectados com as doses de 3 e 9 mg/Kg, o xenobiótico provocou um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) desta actividade catalítica.

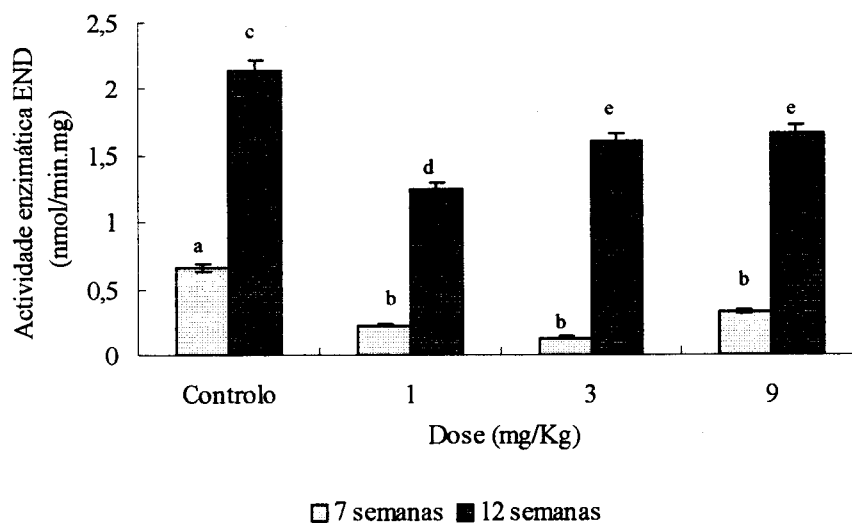


**Figura 4.14.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática 7-toxirresorufina *O*-desetilase da fracção microsomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/min.mg de proteínas microsossomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.8. Actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase

A actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase da fracção microsomal do fígado aumentou acentuadamente entre a puberdade e a fase de adulto jovem, como podemos observar na figura 4.15. onde se registaram valores significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) entre os grupos controlo de cada idade.

A referida representação gráfica mostra-nos também que o tratamento com o isoproturão provocou em qualquer dos estádios de desenvolvimento que estudámos, uma diminuição significativa ( $P < 0,01$ ) desta actividade enzimática, não dependente da dose administrada.



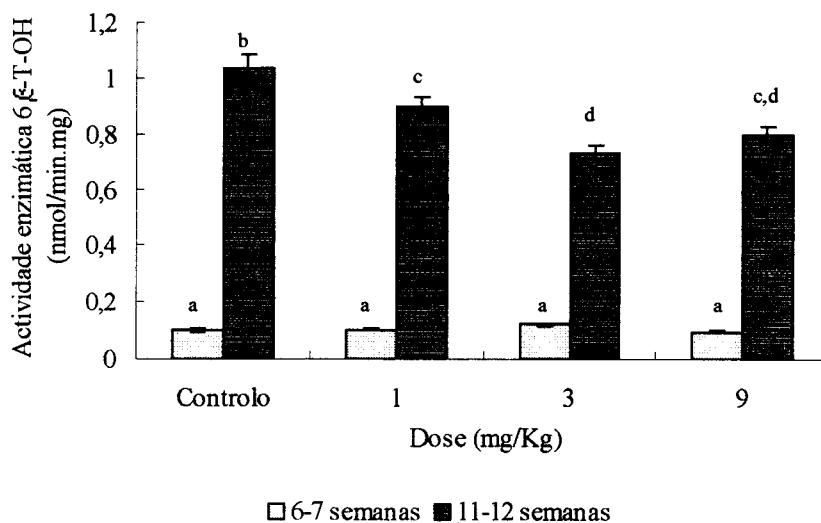
**Figura 4.15.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática etilmorfina *N*-desmetilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (nmol/min.mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.9. Actividade enzimática $6\beta$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática  $6\beta$ -testosterona hidroxilase microssomal hepática aumentou acentuadamente com a idade, como pode ser observado na figura 4.16 pelas diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) determinadas entre os grupos controlo de cada idade.

A referida figura permite-nos também observar que o tratamento com isoproturão não produziu efeitos significativos ( $P < 0,01$ ) sobre a actividade enzimática

6 $\beta$ -testosterona hidroxilase hepática dos ratos pubertais, apesar de ter provocado nos ratos adultos jovens um decréscimo significativo ( $P < 0,01$ ).

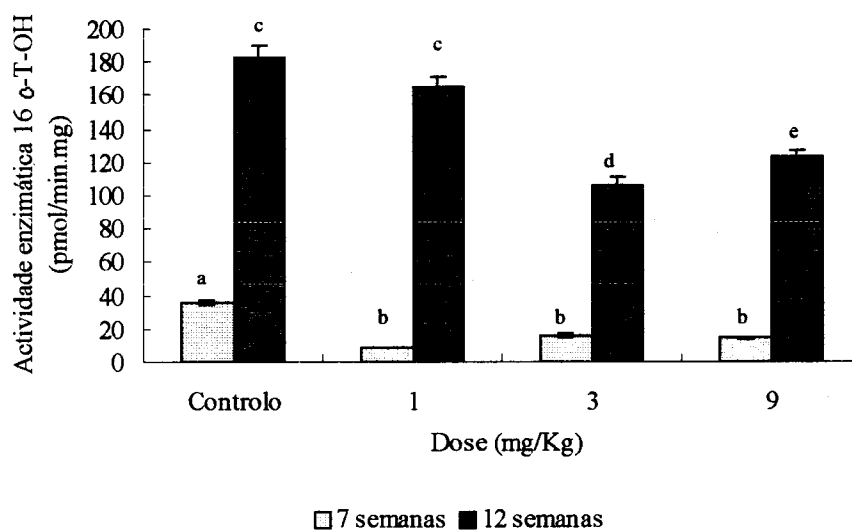


**Figura 4.16.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (nmol/min.mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.10. Actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase

A figura. 4.17. mostra-nos que a actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal hepática aumentou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida.

A mesma representação gráfica revela-nos, ainda, que o tratamento com isoproturão provocou em qualquer das idades estudadas uma diminuição significativa ( $P < 0,01$ ), e não dependente da dose administrada, desta actividade enzimática.

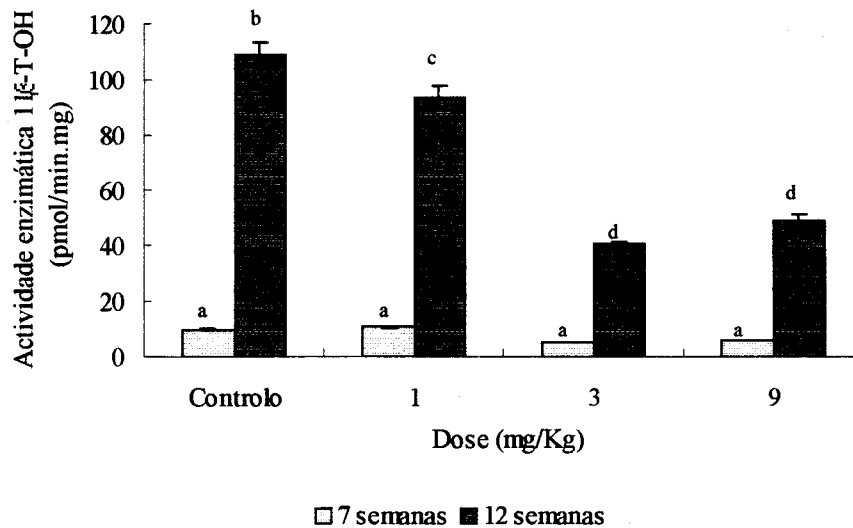


**Figura 4.17.** Influência da idade e do tratamento com isoproterão na actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microsomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/min.mg de proteínas microsossomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.11. Actividade enzimática 11 $\beta$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática 11- $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microsomal hepática também sofreu um aumento acentuado com a idade, como pode ser observado na figura. 4.18. pelas diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) registadas entre os grupos controlo de cada idade. A referida figura permite-nos, ainda, observar que o tratamento dos ratos pubertais com o isoproterão não afectou significativamente ( $P < 0,01$ ) esta actividade enzimática, mas provocou um decréscimo significativo ( $P < 0,01$ ) acentuado, nos animais adultos.



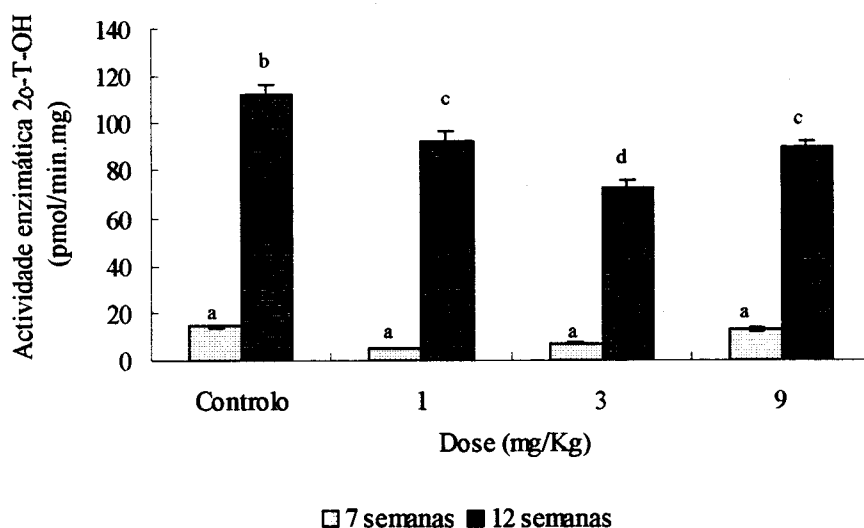


**Figura 4.18.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática  $11\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/min.mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.12. Actividade enzimática $2\alpha$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática  $2\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal hepática aumentou significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.19..

A referida figura permite-nos ainda observar que, nos ratos pubertais, o tratamento com isoproturão não afectou esta actividade enzimática, mas provocou um decréscimo significativo ( $P < 0,01$ ) que foi acentuado para a dose de 3mg/Kg nos animais com 12 semanas de vida.

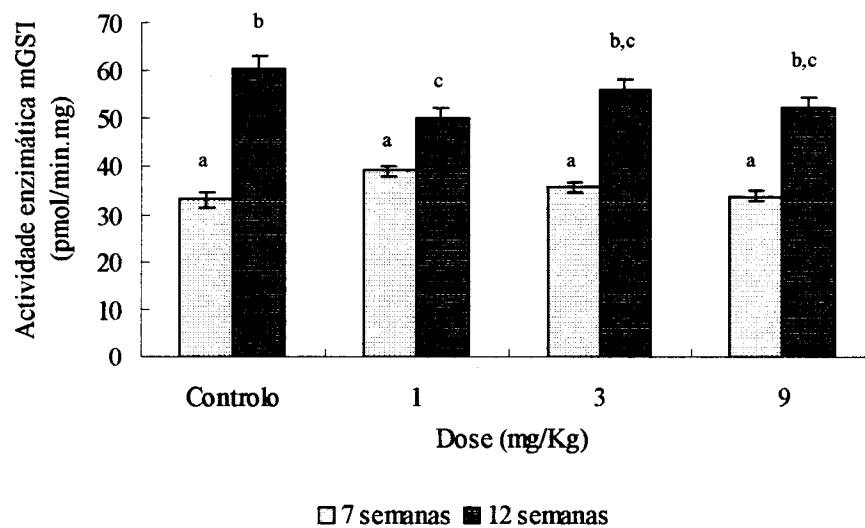


**Figura 4.19.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 2 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/min.mg de proteínas microssomais). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.2.13. Actividade enzimática glutathione *S*-transferase

A figura 4.20 mostra-nos que ocorreu um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) da actividade catalítica glutathione *S*-transferase microssomal do fígado, entre as 7 e as 12 semanas de vida.

O tratamento de ratos pubertais com isoproturão não exerceu qualquer efeito sobre esta actividade enzimática. No entanto, o tratamento de ratos adultos com a dose 1mg/Kg provocou um decréscimo significativo ( $P < 0,01$ ) da actividade enzimática glutathione *S*-transferase microssomal.



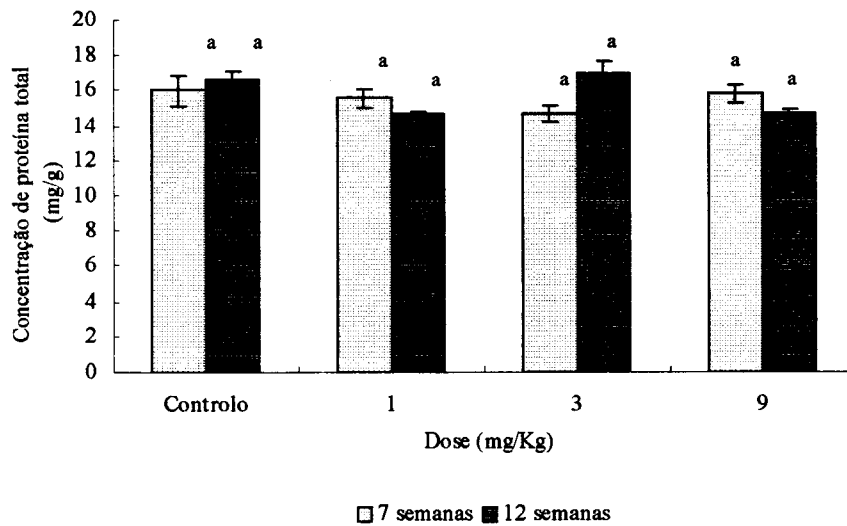
**Figura 4.20.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase da fracção microssomal do fígado de ratos machos Wistar (pmol/min.mg de proteínas). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

### 4.2.3.Citosol

#### 4.2.3.1.Concentração de proteína total

A figura 4.21 mostra-nos que a concentração de proteína total do citosol hepático não sofreu variação significativa ( $P < 0,01$ ) com a idade entre as 7 e as 12 semanas de vida.

O tratamento com isoproturão também não provocou qualquer efeito sobre a concentração proteica do citosol hepático, em qualquer das idades seleccionadas para o estudo.



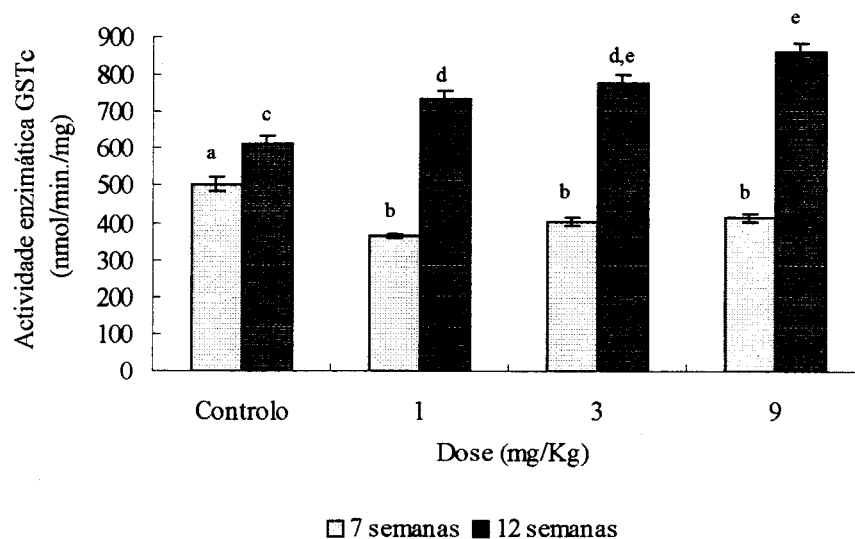
**Figura 4.21.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total do citosol do fígado de ratos machos Wistar (mg/g de fígado). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.3.2. Actividade enzimática glutathione *S*-transferase

Os valores da actividade enzimática glutathione *S*-transferase do citosol hepático aumentaram significativamente ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de idade, como pode ser observado na figura 4.22.

A mesma representação gráfica, mostra-nos ainda que o tratamento com isoproturão provocou nos animais pubertais uma diminuição significativa desta actividade catalítica ( $P < 0,01$ ), e não dependente da dose administrada.

Nos animais adultos, pelo contrário, observámos um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) da actividade enzimática glutathione *S*-transferase que, neste caso, parece depender da dose do xenobiótico que foi administrada.



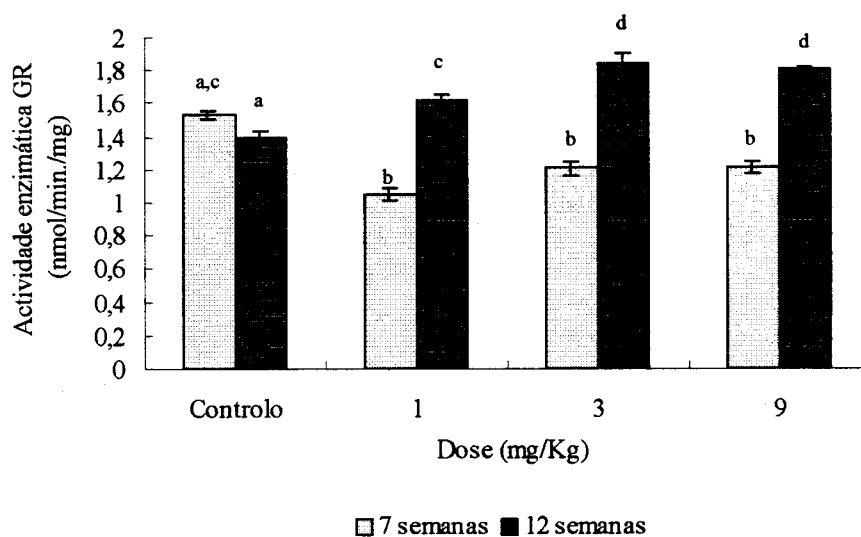
**Figura 4.22.** Influência da idade e do tratamento com isoproterão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase do citosol do figado de ratos machos Wistar (nmol/min.mg de proteínas do citosol). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.2.3.3. Actividade enzimática glutationo redutase

A figura 4.23. mostra-nos que a actividade enzimática glutationo redutase do citosol hepático sofreu uma pequena diminuição entre as 7 e as 12 semanas de vida a qual só foi significativa quando consideramos  $P < 0,05$ .

A referida representação gráfica revela-nos igualmente que o tratamento dos ratos pubertais com isoproterão provocou uma diminuição significativa da actividade enzimática glutationo redutase ( $P < 0,01$ ) e não dependente da dose administrada.

No entanto, nos ratos mais velhos, ocorreu um aumento significativo ( $P < 0,01$ ) desta actividade catalítica, que para as doses 1 e 3mg/Kg parece ser dependente da quantidade de xenobiótico que foi injectada.



**Figura 4.23.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutationo redutase do citosol do figado de ratos machos Wistar (nmol/min.mg de proteínas do citosol). Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.3. Influência da idade e do tratamento com isoproterurão nos rins de ratos machos Wistar

Apresentamos neste subcapítulo os resultados que traduzem a influência da idade e do tratamento com isoproterurão no peso dos rins, na relação entre o peso dos rins e o peso do corpo, na concentração e actividade enzimática de constituintes da fracção microsomal e do citosol renal.

As actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, glutathione *S*-transferase da fracção microsomal, glutathione *S*-transferase do citosol e glutathione redutase foram calculados a partir dos coeficientes angulares de rectas de regressão com coeficientes de

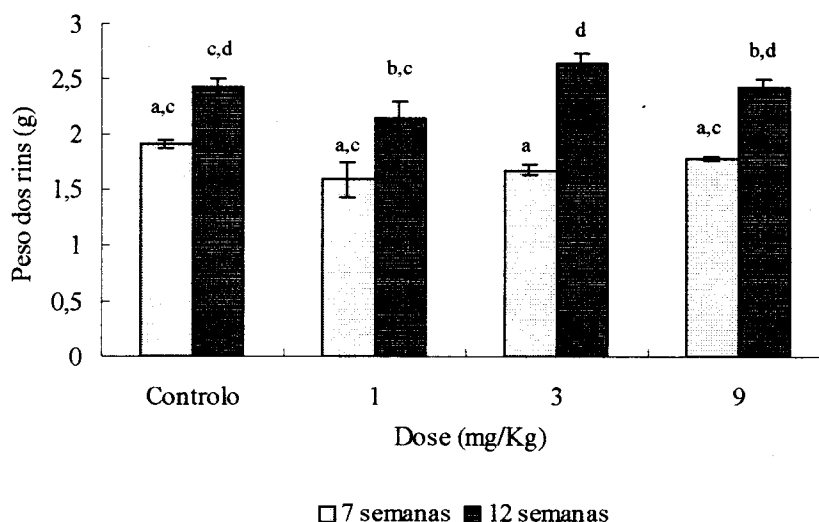
correlação que caíram nos intervalos 0,991786-0,999944; 0,957151-0,998895; 0,983686-0,999391 e 0,996803-0,999791 respectivamente.

Acrescentamos, ainda, que não nos foi possível detectar no tecido renal as actividades enzimáticas etilmorfina *N*-desmetilase,  $11\beta$ - e  $2\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microsomal, pelo que não apresentamos as correspondentes representações gráficas.

#### 4.3.1.Orgão intacto

##### 4.3.1.1.Peso húmido

O peso húmido dos rins também aumentou significativamente ( $P<0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, conforme pode ser observado na figura 4.24.



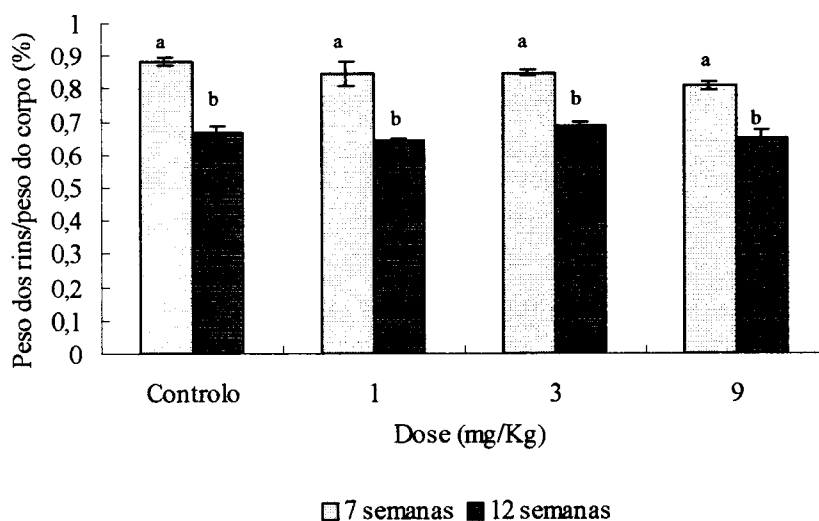
**Figura 4.24.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso húmido dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P<0,01$ .

O tratamento com isoproturão apenas provocou um aumento significativo ( $P<0,01$ ) do peso húmido dos rins nos ratos adultos em que foi injectado na dose de 3mg/Kg.

#### 4.3.1.2. Relação peso húmido do órgão/peso do corpo

A relação peso dos rins/peso do corpo diminuiu significativamente ( $P<0,01$ ) entre as 7 semanas e as 12 semanas de vida, conforme podemos observar na figura 4.25.

A referida figura mostra-nos também que o tratamento com isoproturão não provocou alterações na relação peso dos rins/peso do corpo, uma vez que não observámos diferenças significativas ( $P<0,001$ ) entre os ratos tratados com o xenobiótico e os ratos controlo de cada idade.



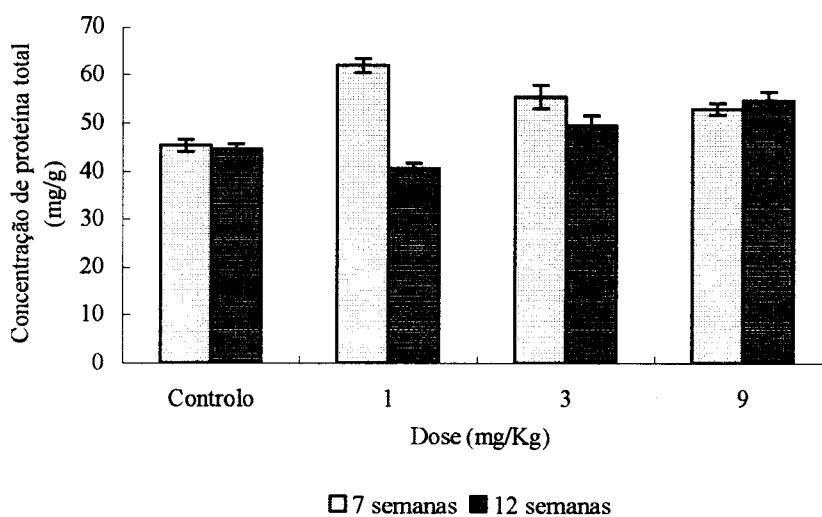
**Figura 4.25.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na relação peso dos rins/ peso do corpo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P<0,01$ .



## 4.3.2. Fracção microssomal

### 4.3.2.1. Concentração de proteína total

A concentração da proteína total da fracção microssomal dos rins não variou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.26., quando comparamos os resultados obtidos com os ratos controlo de ambas as idades.

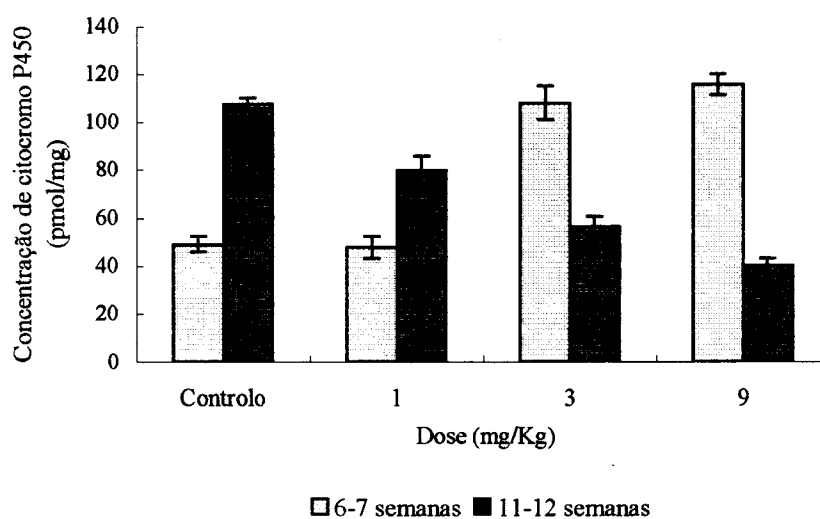


**Figura 4.26.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida figura permite-nos ainda observar que o tratamento com isoproturão provocou nos animais pubertais um pequeno aumento da concentração proteica microssomal, enquanto que nos ratos adultos esse aumento só foi observado nos grupos de animais injectados com as doses de 3 e 9 mg/Kg.

#### 4.3.2.2. Concentração de citocromo P450

A concentração de citocromo P450 da fracção microsomal renal sofreu um acentuado aumento entre as 7 e as 12 semanas de idade, como podemos observar na figura. 4.27, quando comparamos os valores obtidos com os ratos controlo de cada idade.

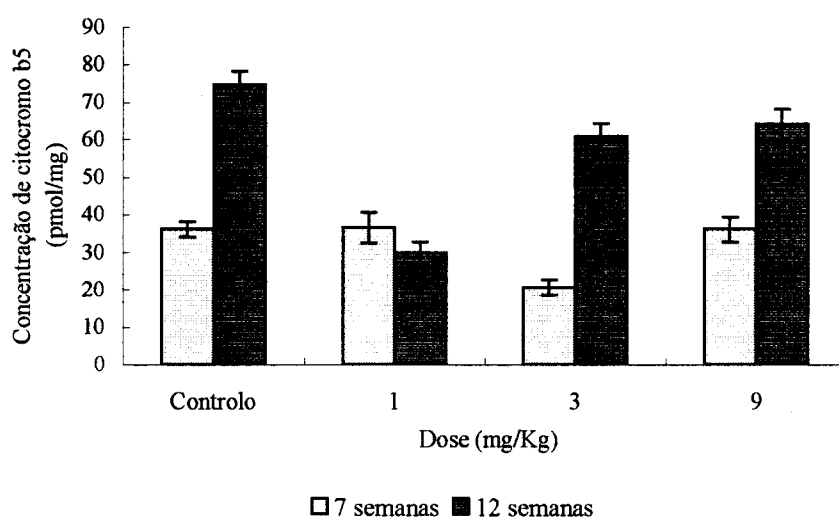


**Figura 4.27.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na concentração de citocromo P450 da fracção microsomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida representação gráfica mostra-nos também que o tratamento com isoproterurão provocou nos ratos mais jovens um aumento acentuado da concentração de citocromo P450 renal enquanto que nos animais adultos ocorreu um decréscimo da mesma dependente da dose do xenobiótico que foi administrada.

#### 4.3.2.3. Concentração de citocromo b5

A concentração de citocromo b5 da fracção microsomal dos rins aumentou acentuadamente entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.28., quando comparamos os valores obtidos com os ratos controlo de cada idade.

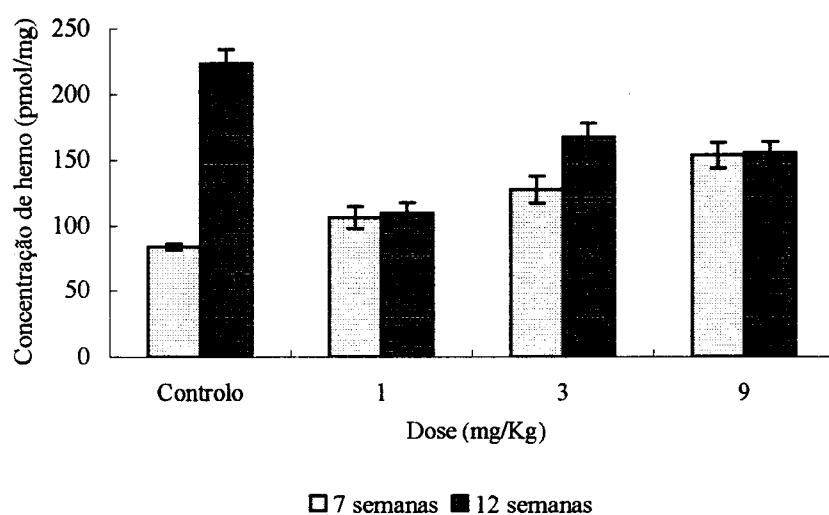


**Figura 4.28.** Influência da idade e do tratamento com isotretinona na concentração de citocromo b5 da fracção microsomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A mesma representação gráfica mostra-nos, igualmente, que o tratamento de ratos pubertais com isotretinona provocou uma diminuição da concentração de citocromo b5 apenas nos animais injectados com a dose de 3mg/Kg, enquanto que nos animais adultos esse efeito ocorreu em todos os grupos sujeitos ao tratamento, sendo mais acentuado nos animais injectados com a dose de 1mg/Kg.

#### 4.3.2.4. Concentração de hemo

A figura 4.29 mostra-nos que a concentração de hemo da fracção microssomal dos rins sofreu também um acentuado aumento entre as 7 e as 12 semanas de vida, quando comparamos os valores obtidos com os ratos controlo de ambas as idades.

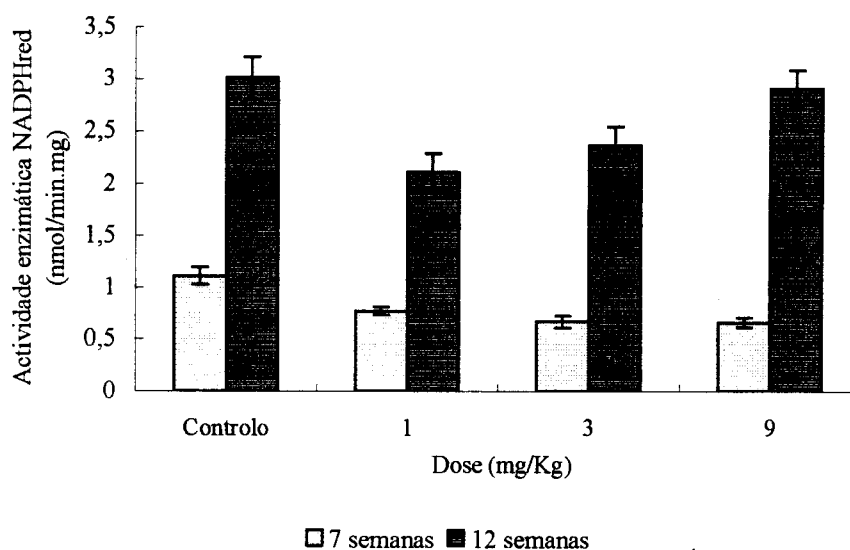


**Figura 4.29.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de hemo microssomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio padrão.

A mesma figura permite-nos ainda observar que o tratamento dos animais mais jovens com o isoproturão provocou um aumento, da concentração renal de hemo, dependente da dose, enquanto que nos animais maduros, pelo contrário, ocorreu um decréscimo da mesma, o qual foi mais acentuado naqueles em que injectámos a dose de 1mg/Kg.

#### 4.3.2.5. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase

A actividade enzimática NADPH (P450) redutase, da fracção microsomal renal, aumentou acentuadamente entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.30..

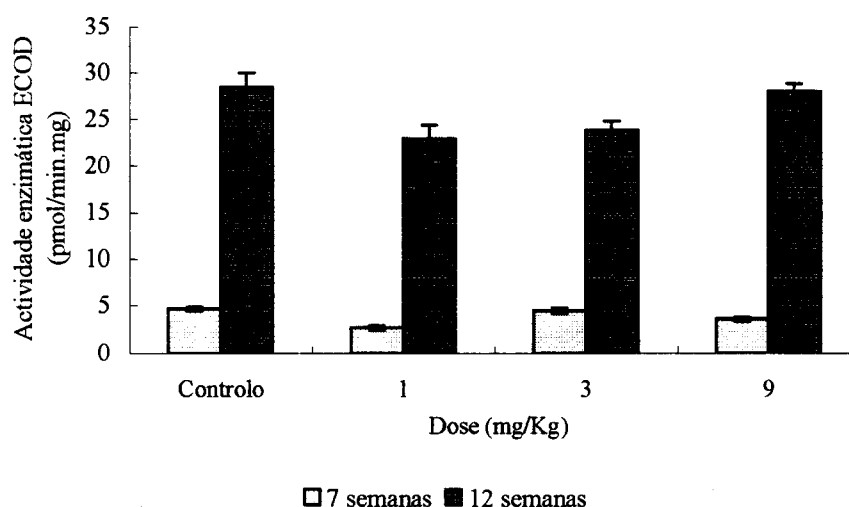


**Figura 4.30.** Influência da idade e do tratamento com isoproterão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microsomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida representação gráfica mostra-nos, também que o tratamento dos ratos pubertais com isoproterão provocou uma diminuição desta actividade enzimática de forma dependente da dose do xenobiótico que foi injectada, mas observamos que o efeito foi mais pronunciado nos ratos adultos que receberam as doses de 1 e 3 mg/Kg.

#### 4.3.2.6. Actividade enzimática 7- etoxicumarina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microssomal do tecido renal aumentou acentuadamente entre as 7 e as 12 semanas de vida como pode ser observado na figura 4.31., na qual é evidente que o valor desta actividade catalítica foi de facto muito baixo nos animais pubertais.

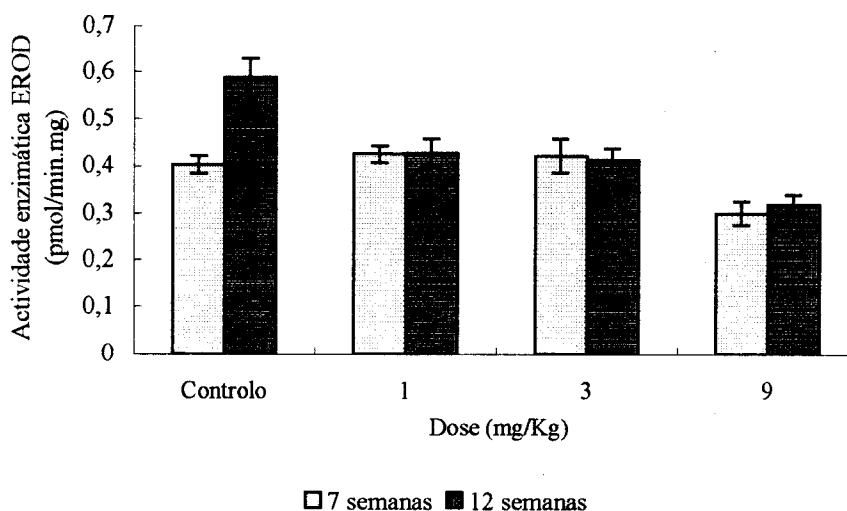


**Figura 4.31.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A mesma figura permite-nos ainda observar que, nos animais mais jovens, o tratamento com isoproturão não afectou a actividade catalítica 7-etoxicumarina *O*-desetilase, provocou um pequeno decréscimo mas nos ratos adultos injectados com as doses de 1 e 3 mg/Kg.

#### 4.3.2.7. Actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase da fracção microssomal do tecido renal aumentou acentuadamente entre as 7 e as 12 semanas de idade como pode ser observado na figura 4.32.



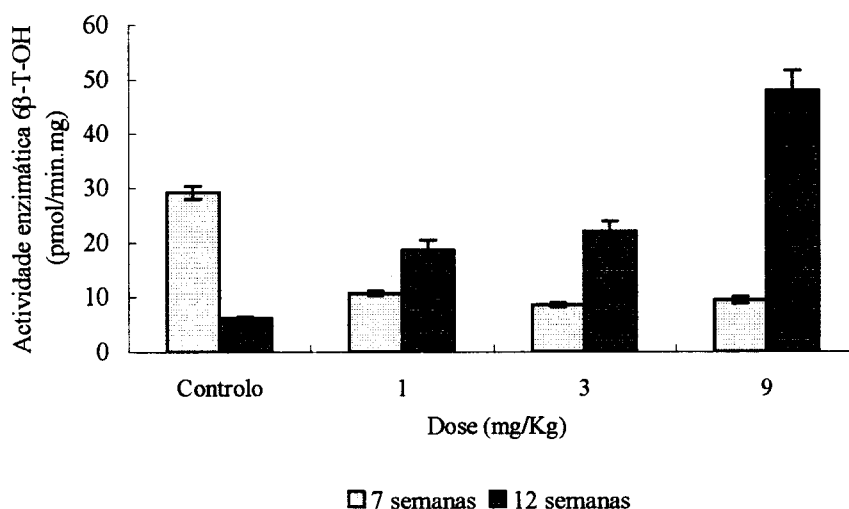
**Figura 4.32.** Influência da idade e do tratamento com isotreturão na actividade enzimática 7-etoxirresorufina *O*-desetilase da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida figura mostra-nos também que o tratamento dos animais pubertais com isotreturão provocou apenas uma pequena diminuição desta actividade enzimática no grupo de ratos injectados com a dose de 9mg/Kg.

No entanto, nos animais adultos, observámos um decréscimo acentuado dependente da dose de isotreturão que foi administrada.

#### 4.3.2.8. Actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do tecido renal diminuiu entre as 7 e as 12 semanas de idade, como pode ser observado na figura 4.33.



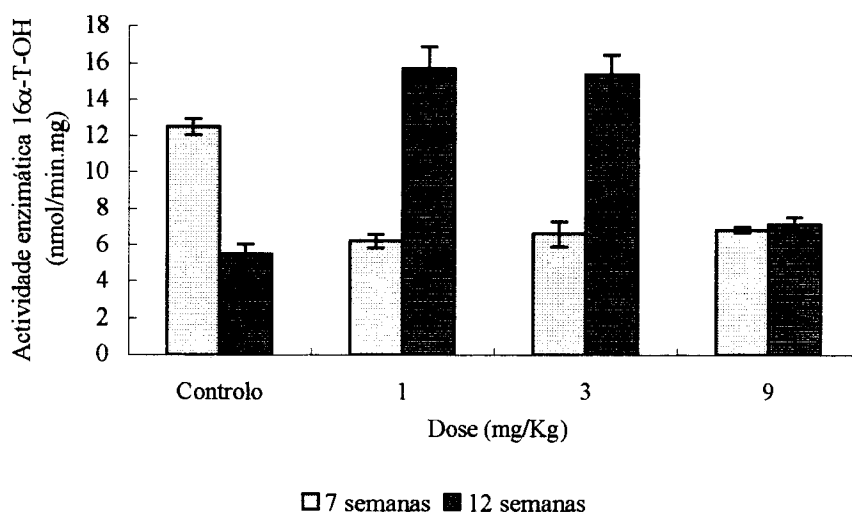
**Figura 4.33.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida representação gráfica permite-nos ainda observar que o tratamento com o isoproturão provocou nos animais pubertais uma diminuição desta actividade catalítica, que não se mostrou dependente da dose injectada. Nos animais sexualmente maturos, pelo contrário, observámos um aumento acentuado da actividade catalítica 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase renal, variação esta que se mostrou positivamente dependente da dose do xenobiótico que foi injectada



#### 4.3.2.9. Actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal do tecido renal diminuiu entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.34..

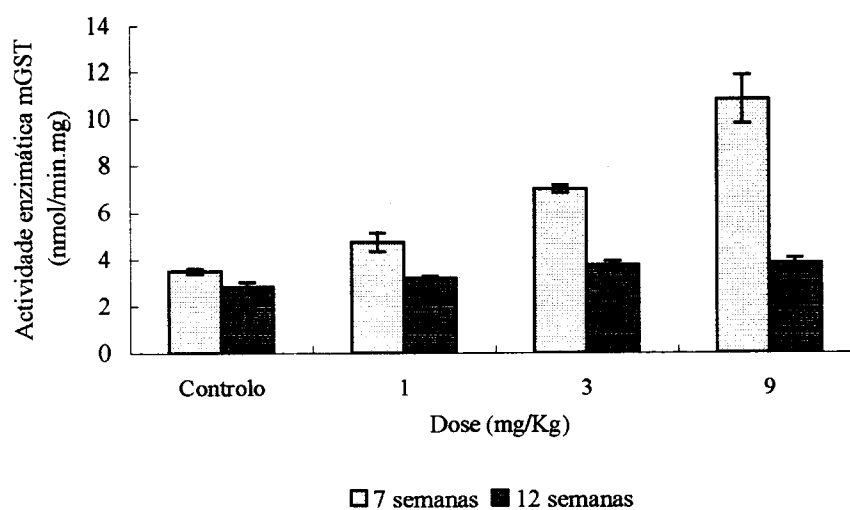


**Figura 4.34.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A mesma representação gráfica mostra-nos também que o tratamento com isoproturão provocou nos ratos pubertais um decréscimo acentuado desta actividade enzimática, não dependente da dose administrada,. Contudo, observámos um aumento acentuado da actividade catalítica 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase, nos animais maduros injectados com as doses de 1 e 3 mg/Kg, variação que não foi confirmada nos ratos adultos tratados com a dose de 9 mg/Kg.

#### 4.3.2.10. Actividade enzimática glutationo *S*-transferase

A figura 4.35 mostra-nos que a actividade enzimática glutationo *S*-transferase da fracção microsomal dos rins sofreu uma pequena diminuição entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar quando comparamos os valores obtidos com os ratos controlo de cada idade.



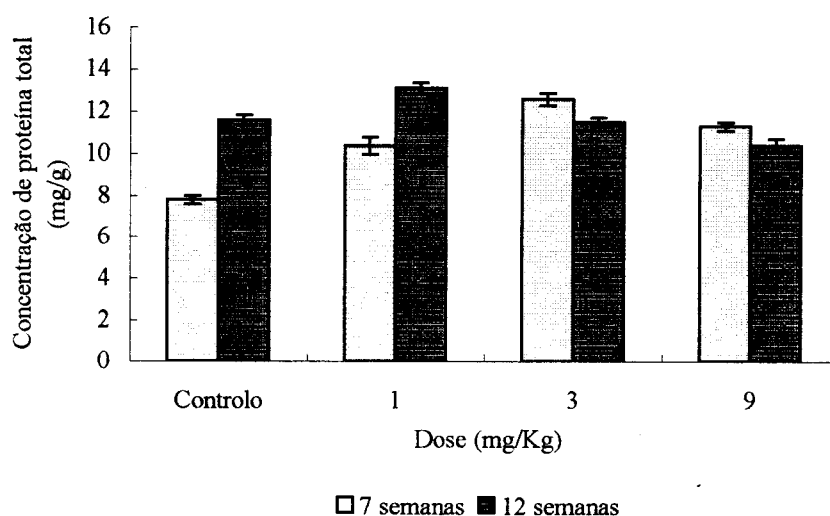
**Figura 4.35.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase da fracção microsomal dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida figura permite-nos, ainda, observar que esta actividade catalítica aumentou de forma proporcional com a dose injectada, nos animais de qualquer das idades eleitas para o estudo, embora esse efeito tenha sido muito mais acentuado em ratos pubertais.

### 4.3.3.Citosol

#### 4.3.3.1.Concentração de proteína total

A concentração de proteína total do citosol renal aumentou, entre as 7 e as 12 semanas de idade, como pode ser observado na figura 4.36 ao compararmos os valores obtidos com os ratos controlo de cada idade.



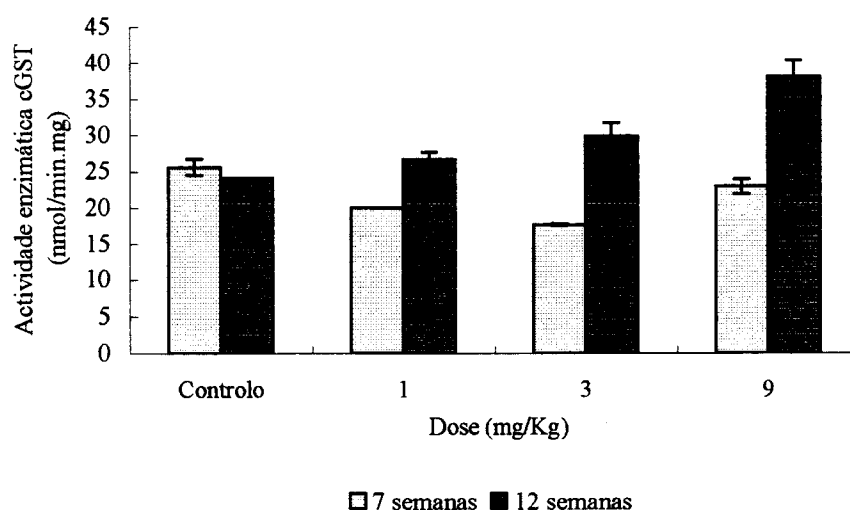
**Figura 4.36.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total do citosol dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 5 animais  $\pm$  desvio padrão.

A referida figura mostra-nos também que o tratamento dos ratos pubertais com isoproturão levou a um aumento da concentração de proteína total do citosol renal.

No entanto, observámos um efeito diferente nos ratos adultos tratados com o xenobiótico, pois nos animais injectados com as doses de 3 e 9 mg/Kg até ocorreu um decréscimo da concentração proteica do citosol.

#### 4.3.3.2. Actividade enzimática glutationo *S*-transferase

A actividade enzimática glutationo-*S*-transferase do citosol renal não variou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.37..



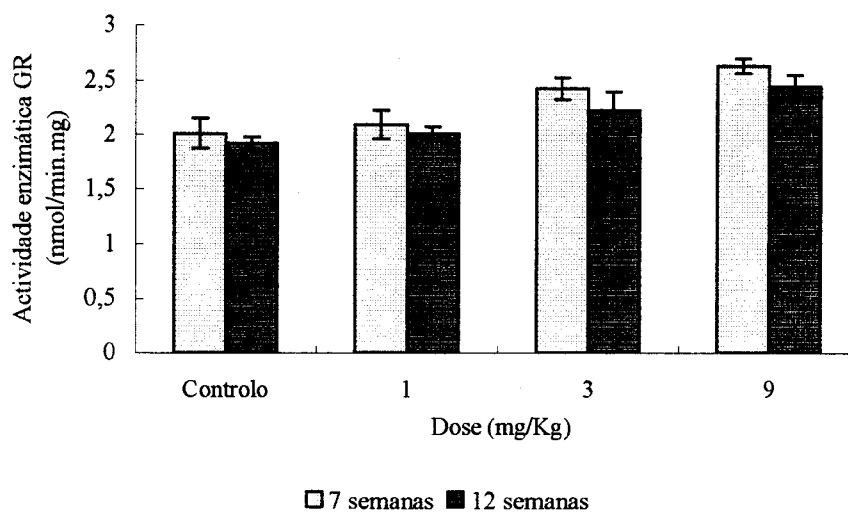
**Figura 4.37.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase do citosol dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

Pela referida figura podemos ainda constatar que o tratamento dos ratos pubertais com o isoproturão levou a uma diminuição dessa actividade catalítica, um efeito que foi mais pronunciado no grupo de ratos injectados com a dose de 3mg/Kg.

Pelo contrário, nos animais maturos, observámos que o tratamento com isoproturão provocou um aumento da actividade enzimática glutationo *S*-transferase do citosol renal e que esse efeito foi dependente da dose do xenobiótico injectada.

#### 4.3.3.3. Actividade enzimática glutatióno redutase

A actividade enzimática glutatióno redutase não variou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.38. A mesma figura mostra-nos também que o tratamento com isotproturão provocou em ambas as idades um aumento desta actividade catalítica, efeito este que foi dependente da dose de xenobiótico injectada.



**Figura 4.38.** Influência da idade e do tratamento com isotproturão na actividade enzimática glutatióno redutase do citosol dos rins de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.4. Influência da idade e do tratamento com isotproturão nos testículos de ratos machos Wistar

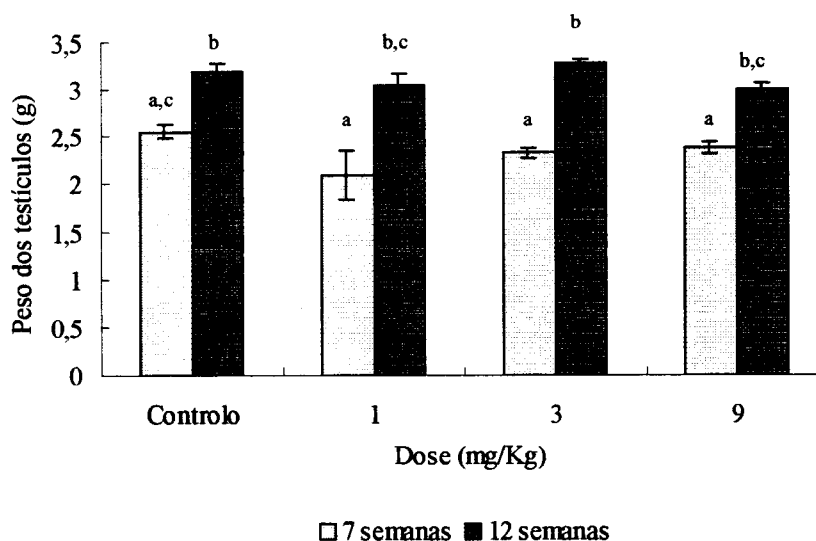
Apresentamos neste subcapítulo os resultados que traduzem a influência da idade e do tratamento com isotproturão no peso dos testículos, na sua relação com o peso do corpo, assim como na concentração e actividade enzimática de constituintes microsossomais e do citosol.

As actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, glutathione *S*-transferase da fracção microssomal, glutathione *S*-transferase e glutathione redutase do citosol foram calculados a partir dos coeficientes angulares de rectas de regressão com coeficientes de correlação que caíram nos intervalos 0,969614-0,999728; 0,968242-0,999925; 0,998850-0,999825 e 0,995002-0,999552, respectivamente.

Acrescentamos, ainda, que não nos foi possível detectar, com a metodologia adoptada, a concentração de citocromo b5 assim como as actividades enzimáticas etilmorfina *N*-desmetilase, 11 $\beta$ - e 2 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal, pelo que não apresentamos as respectivas representações gráficas.

#### 4.4.1. Orgão intacto

##### 4.4.1.1. Peso húmido



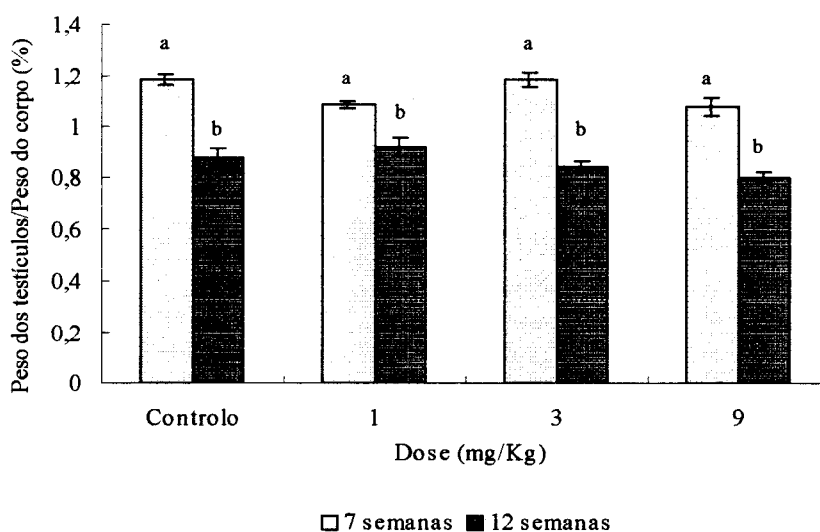
**Figura 4.39.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso húmido de testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

O peso húmido dos testículos aumentou significativamente entre as 7 e as 12 semanas de idade ( $P<0,01$ ), como podemos observar na figura 4.39..

A mesma representação gráfica permite-nos ainda observar que o tratamento com isoproturão provocou uma pequena diminuição do peso húmido do órgão nos animais pubertais, mas que essa diminuição só apresentou significado estatístico ( $P<0,01$ ) nos animais injectados com a dose de 1mg/Kg. Nos animais adultos, não foi observada qualquer variação significativa ( $P<0,01$ ) do peso húmido dos testículos devida ao tratamento.

#### 4.4.1.2. Relação peso húmido do órgão / peso do corpo

A relação peso dos testículos/peso do animal sofreu um decréscimo significativo ( $P<0,01$ ) entre as 7 e as 12 semana de vida, como podemos observar na figura 4.40..



**Figura 4.40.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na relação peso dos testículos/peso do animal, em ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P<0,01$ .

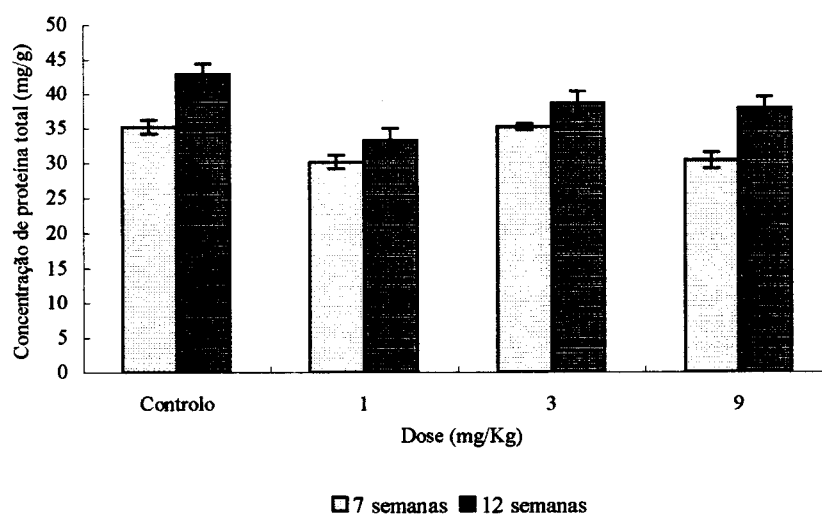
A mesma figura mostra-nos ainda que o tratamento com isotroturão, tal como no fígado e rins, não provocou alterações na relação peso dos testículos/peso do animal.

#### 4.4.2. Fracção microssomal

##### 4.4.2.1. Concentração de proteína total

A concentração de proteína total microssomal dos testículos aumentou entre as 7 e as 12 semanas de idade, como podemos observar na figura 4.41.

A mesma figura mostra-nos ainda que o tratamento com o isotroturão provocou uma diminuição da concentração de proteínas da fracção microssomal dos testículos de ratos pubertais, injectados com as doses de 1 e 9 mg/Kg. Um efeito semelhante foi igualmente observado em todos os grupos de ratos adultos injectados com isotroturão.



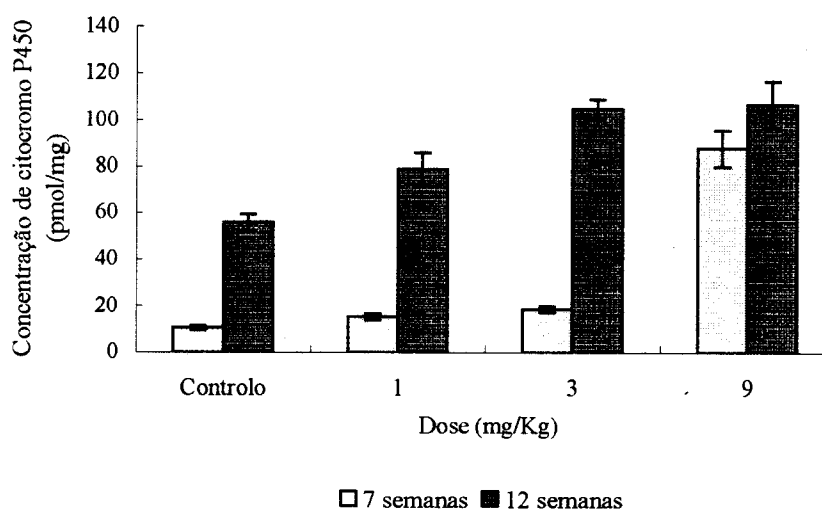
**Figura 4.41.** Influência da idade e do tratamento com isotroturão na concentração de proteína total da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.



#### 4.4.2.2. Concentração de citocromo P450

A concentração de citocromo P450 da fracção microsossomal dos testículos aumentou entre as 7 e as 12 semanas de idade, como podemos observar na figura 4.42., ao comparar os valores que obtivemos para os ratos controlo de cada idade.

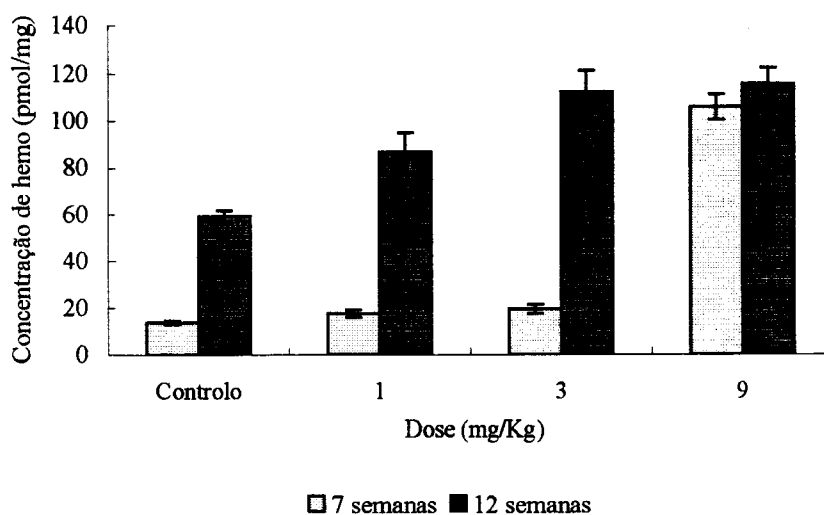
A referida figura também nos revela que, em qualquer das idades estudadas, o tratamento com isoproturão provocou um aumento da concentração de citocromo P450 dependente da dose administrada, sendo esse efeito mais pronunciado nos ratos pubertais injectados com a dose de 9 mg/Kg.



**Figura 4.42.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de citocromo P450 da fracção microsossomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.4.2.3. Concentração de hemo

A concentração de hemo da fracção microsossomal dos testículos aumentou entre as 7 e as 12 semanas de idade, como podemos observar na figura 4.43..

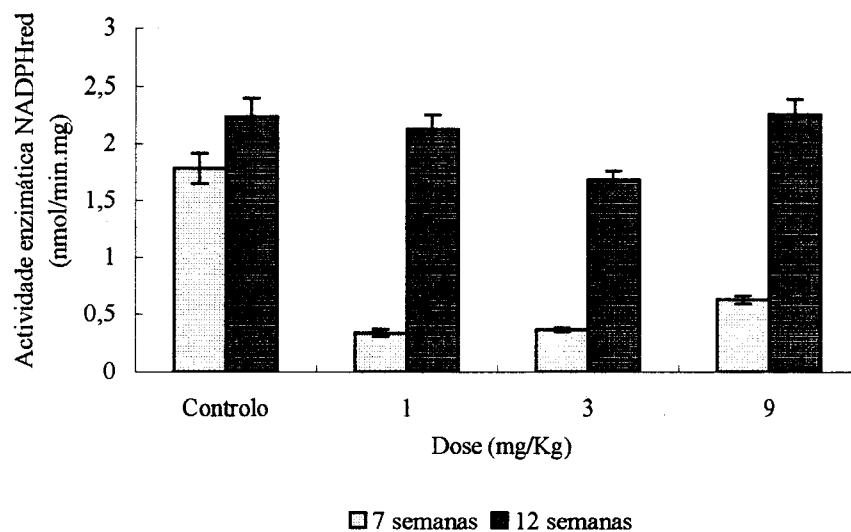


**Figura 4.43.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de hemo da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida representação gráfica também permite observar que o tratamento com isoproturão provocou um aumento da concentração de hemo microssomal dos testículos, tanto dos ratos pubertais como dos ratos adultos, embora nos ratos mais jovens esse efeito só seja inequivocamente observado nos animais em que foi injectada a dose de 9 mg/Kg. Nos ratos adultos, para as doses de 1 e 3 mg/Kg, a variação observada parece depender da dose de isoproturão que foi administrada.

#### 4.4.2.4. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase

A actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal dos testículos aumentou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.44..

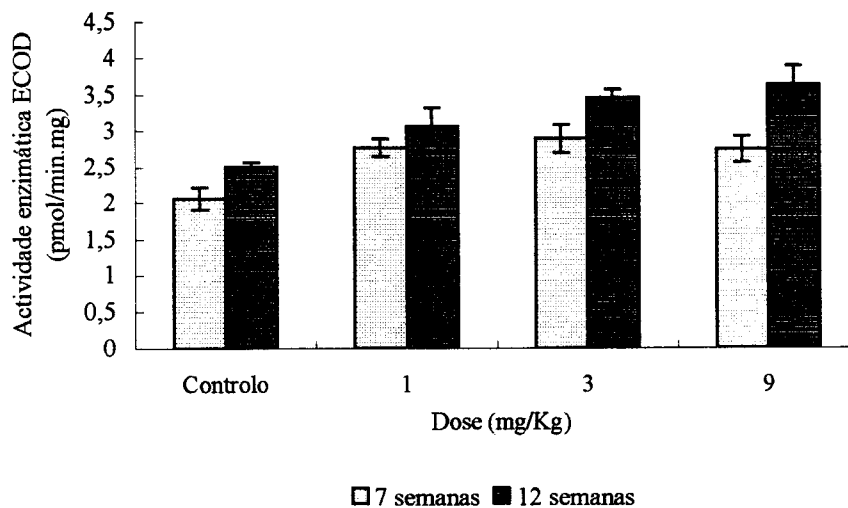


**Figura 4.44.** Influência da idade e do tratamento com isoproterão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microsomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A mesma representação gráfica mostra-nos ainda que o tratamento com isoproterão provocou nos animais mais jovens uma acentuada diminuição desta actividade catalítica, efeito este que, nos animais mais velhos, só foi observado nos ratos injectados com a dose de 3mg/Kg.

#### 4.4.2.5. Actividade enzimática 7- etoxicumarina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase dos testículos aumentou entre as 7 e as 12 semanas de idade, como pode ser observado na figura 4.45, quando comparamos os valores que obtivemos para os ratos controlo de cada idade.

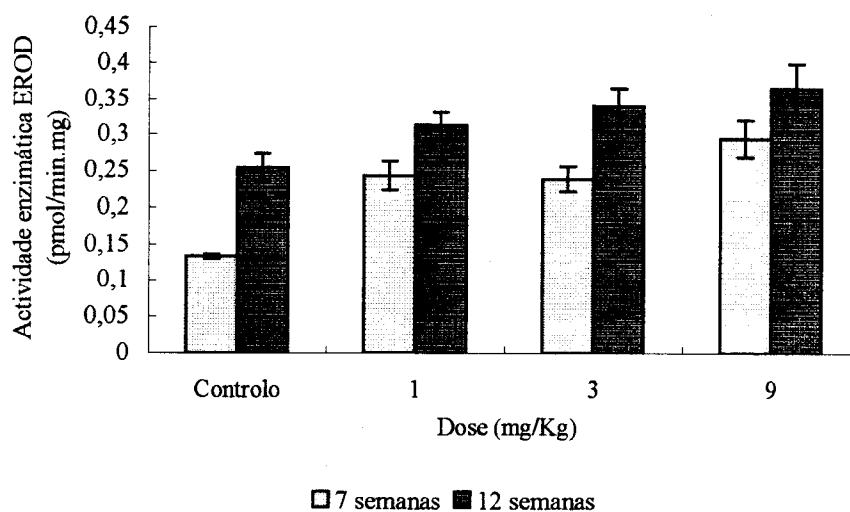


**Figura 4.45.** Influência da idade e do tratamento com isoproterenol na actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microsomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida figura revela-nos ainda que o tratamento com isoproterenol provocou em ambas as idades um aumento da actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase. Nos animais maduros, parece existir uma relação de dependência entre a variação observada e a dose injectada, enquanto que nos pubertais essa relação parece ter sido contrariada nos animais injectados com a dose de 9 mg/Kg

#### 4.4.2.6. Actividade enzimática 7-etoxiresorufina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxiresorufina *O*-desetilase, da fracção microsomal dos testículos, aumentou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.46, quando comparamos os resultados que obtivemos para os ratos controlo de ambas as idades.

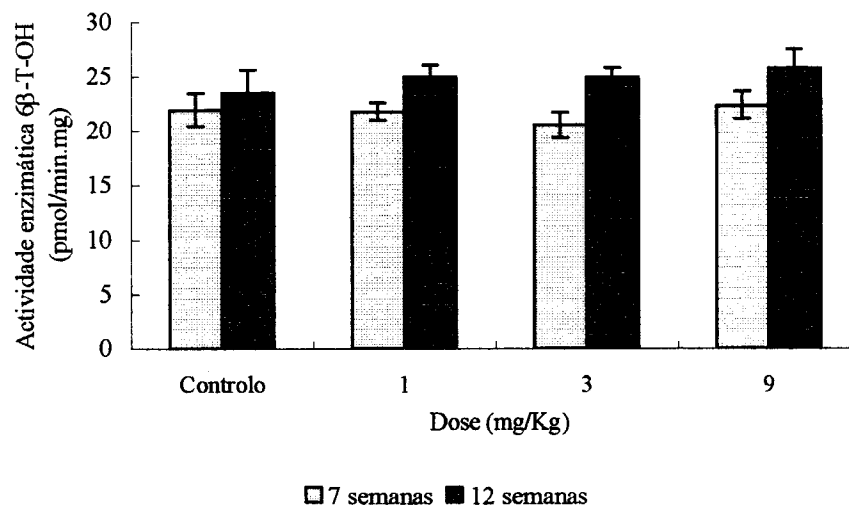


**Figura 4.46.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 7-eto-xirresorfina *O*-desetilase da fracção microsomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida figura também nos mostra que, em qualquer das idades estudadas, o tratamento com isoproturão provocou um aumento desta actividade catalítica foi dependente da dose de xenobiótico administrada.

#### 4.4.2.7. Actividade enzimática $6\beta$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática  $6\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microsomal dos testículos apresenta um valor semelhante nos ratos com 7 e 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.47, ao compararmos os ratos controlo de qualquer das idades estudadas.



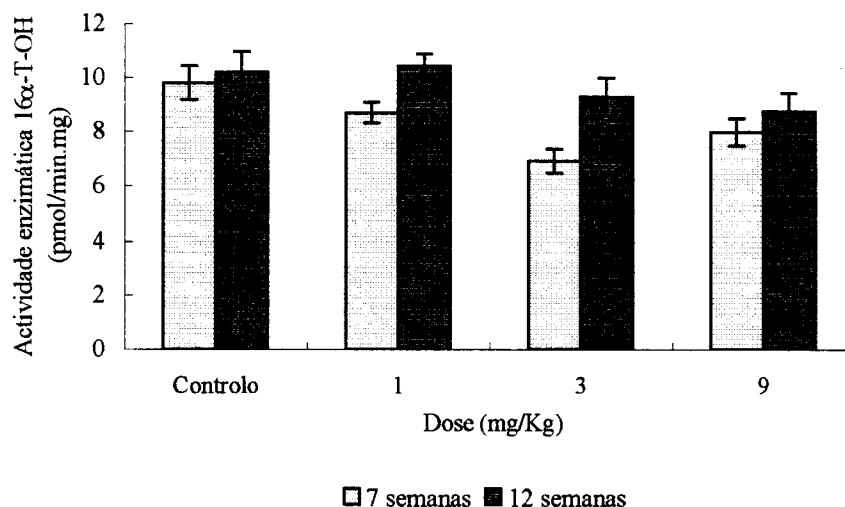
**Figura 4.47.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática  $6\beta$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A mesma representação gráfica também nos mostra que o tratamento com isoproturão não afectou esta actividade enzimática nos testículos dos ratos em qualquer das idades estudadas quando comparadas com os valores dos respectivos ratos controlo. Isto, apesar de as fracções microssomais dos testículos dos ratos maturos injectados com o xenobiótico possuírem valores de actividade  $6\beta$ -testosterona hidroxilase superiores aos dos ratos pubertais submetidos ao mesmo tratamento.

#### 4.4.2.8. Actividade enzimática $16\alpha$ -testosterona hidroxilase

A actividade enzimática  $16\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal dos testículos não sofreu qualquer variação entre as 7 e as 12 semanas de vida, como

podemos observar na figura 4.48, quando comparamos os resultados obtidos para ambas as idades.

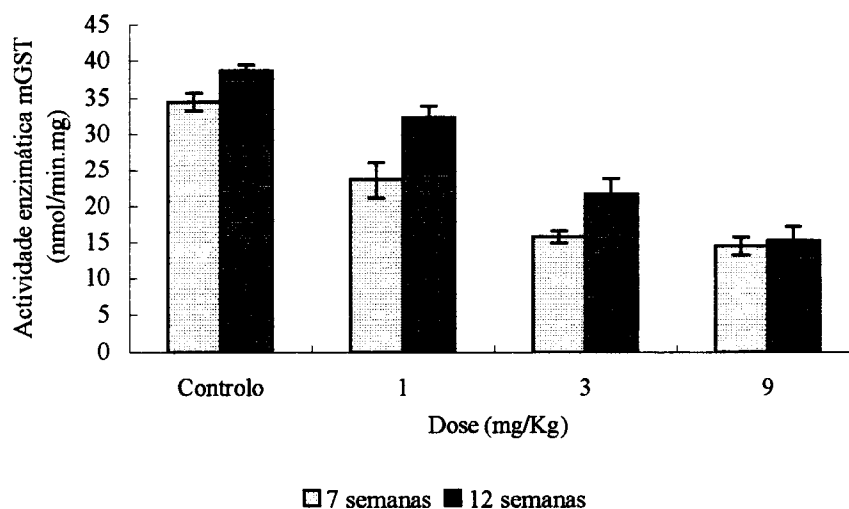


**Figura 4.48.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática  $16\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microsomal de testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A referida representação gráfica mostra-nos ainda que o tratamento com isoproturão provocou uma diminuição desta actividade catalítica em qualquer das idades estudadas, embora nos animais maturos, tenha sido mais acentuada nos grupos injectados com as doses de 3 e 9 mg/Kg. Por isso admitimos uma dependência entre o efeito observado e a dose de xenobiótico que foi injectada.

#### 4.4.2.9. Actividade enzimática glutathione *S*-transferase

A figura 4.49. permite-nos observar que o valor da actividade enzimática glutathione *S*-transferase da fracção microsomal dos testículos sofreu um pequeno aumento entre as 7 e as 12 semanas de idade.



**Figura 4.49.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase da fracção microsomal de testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

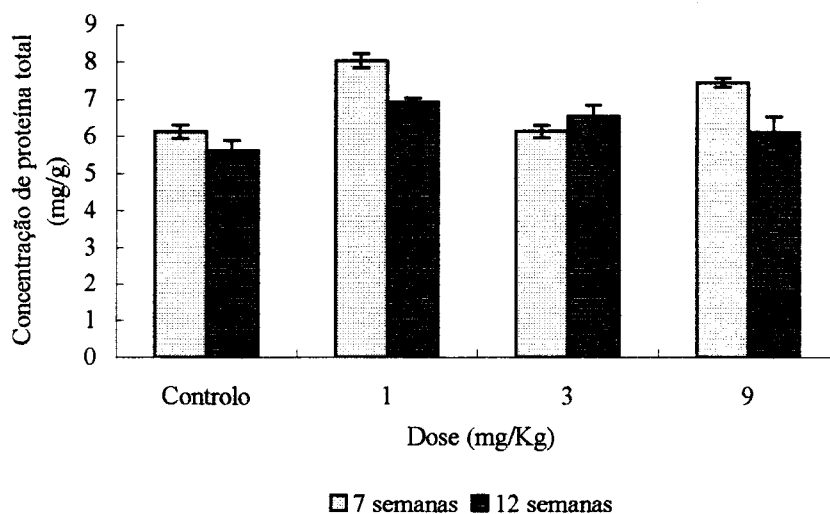
A mesma figura mostra-nos também que esta actividade catalítica diminuiu acentuadamente nos animais submetidos ao tratamento com isoproturão em qualquer dos grupos etários estudados. A figura 4.49. revela-nos ainda que parece existir uma dependência directa entre o decréscimo de actividade enzimática observado e a dose do xenobiótico que foi administrada.

### 4.4.3.Citosol

#### 4.4.3.1.Concentração de proteína total

A concentração de proteína total do citosol dos testículos não variou entre a puberdade e a fase de adulto jovem, como podemos observar na figura 4.50 quando comparamos os grupos controlo das duas idades que estudámos.





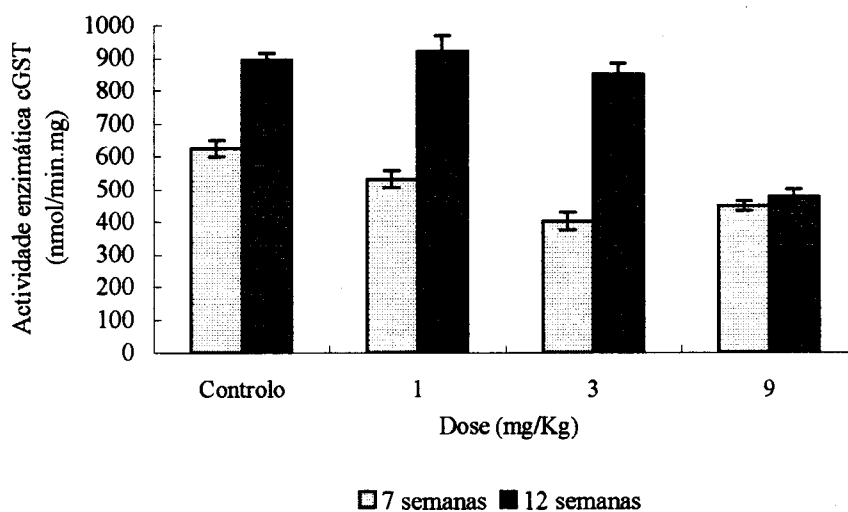
**Figura 4.50.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total do citosol dos testículos de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A figura 4.50 revela-nos que o tratamento com isoproturão provocou nos ratos pubertais injectados com as doses 1 e 3 mg/Kg um pequeno aumento da concentração proteica do citosol dos testículos. No entanto, nos ratos adultos esse efeito manifestou-se no citosol de todos os animais que foram injectados com o xenobiótico.

#### 4.4.3.2. Actividade enzimática glutationo *S*-transferase

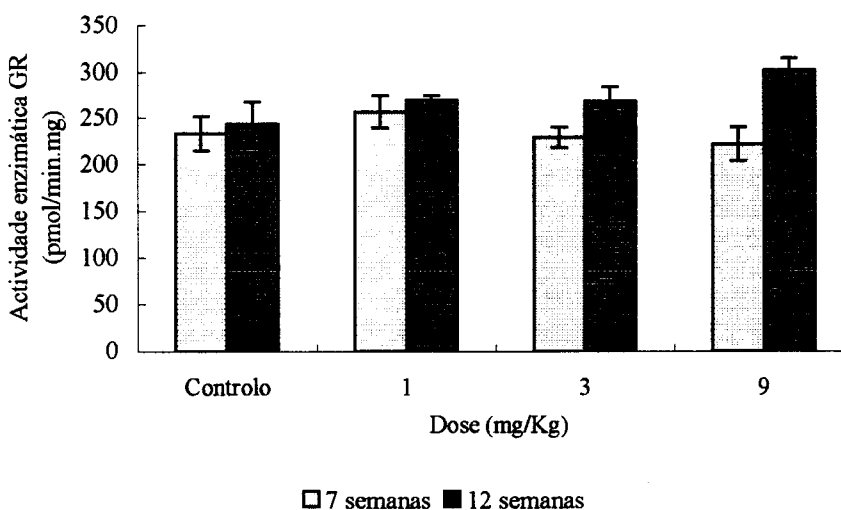
O valor da actividade glutationo *S*-transferase do citosol dos testículos aumentou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.51..

A mesma representação gráfica revela-nos ainda que o tratamento com isoproturão provocou, em qualquer das idades estudadas, um pequeno decréscimo desta actividade enzimática, embora nos ratos adultos esse efeito só seja inequívoco no grupo de animais que foram injectados com a dose de 9mg/Kg.



**Figura 4.51.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathiono *S*-transferase do citosol dos testículos de ratos machos. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.4.3.3. Actividade enzimática glutathiono redutase



**Figura 4.52.** Influência da idade e do tratamento com isoproterurão na actividade enzimática glutathiono redutase do citosol dos testículos de ratos machos Wistar em duas idades diferentes. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A actividade enzimática glutationo redutase do citosol dos testículos tomou um valor semelhante nas duas idades estudadas como podemos observar na figura 4.52, quando comparamos os valores que obtivemos para os ratos controlo de ambas as idades.

A figura 4.52 mostra-nos ainda que o tratamento com o isotruturão não afectou esta actividade enzimática nos testículos dos animais pubertais, embora tenha provocado nos animais adultos um pequeno aumento relativamente ao grupo controlo.

#### 4.5. Influência da idade e do tratamento com isotruturão no timo de ratos machos Wistar

Apresentamos neste subcapítulo os resultados que traduzem a influência da idade e do tratamento com isotruturão no peso do timo, na relação entre o peso do timo e o peso do corpo, na concentração e actividade enzimática de constituintes da fracção microssomal e do citosol do timo.

As actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, glutationo *S*-transferase da fracção microssomal, glutationo *S*-transferase do citosol e glutationo redutase foram calculadas a partir dos coeficientes angulares de rectas de regressão com coeficientes de correlação que caíram nos intervalos 0,984928-0,999669; 0,968985-0,997976; 0,989001-0,999883 e 0,996339-0,999845, respectivamente.

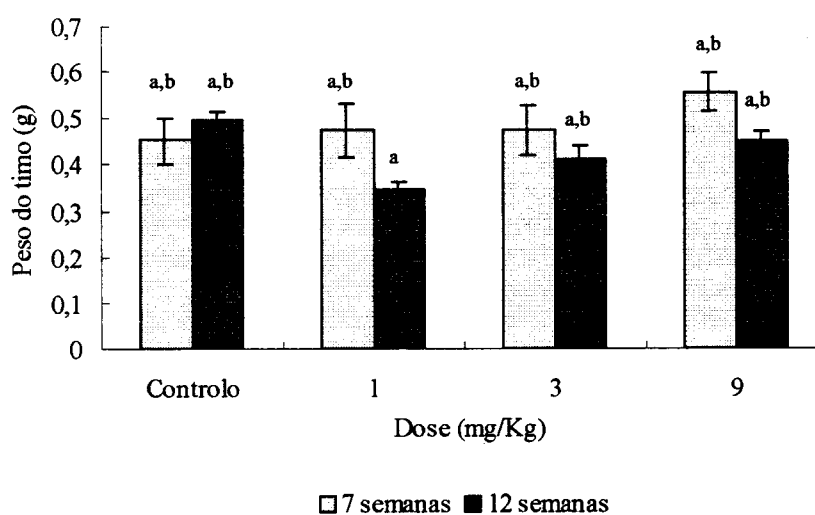
Acrescentamos, ainda, que não nos foi possível detectar a concentração de citocromo b5 e as actividades enzimáticas etilmorfina *N*-desmetilase, 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 11 $\beta$ - e 2 $\alpha$ -testosterona hidroxilase da fracção microssomal, pelo que não apresentamos as correspondentes representações gráficas.

## 4.5.1. Orgão intacto

### 4.5.1.1. Peso húmido

O peso húmido do timo não variou significativamente entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.53. ao compararmos os valores obtidos com os ratos controlo de ambas as idades.

A referida figura permite-nos ainda observar que o tratamento com o xenobiótico também não afectou significativamente ( $P < 0,01$ ) o peso húmido deste órgão relativamente ao controlo de cada idade, embora tenham sido observadas diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre animais sujeitos ao tratamento com a dose 1 mg/Kg, mas com idades diferentes.

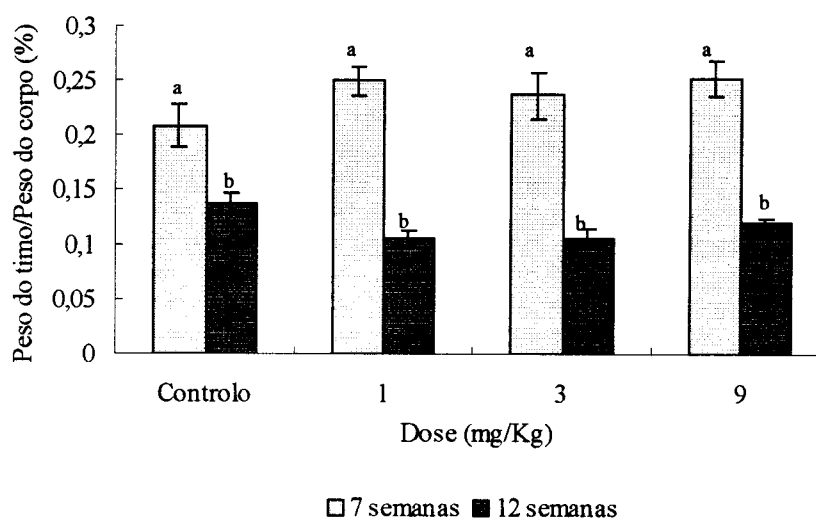


**Figura 4.53.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão no peso húmido do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.5.1.2. Relação peso húmido do órgão / peso do corpo

A relação peso do timo/peso do corpo sofreu um decréscimo significativo ( $P < 0,01$ ) entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura.4.54., comparando os valores dos grupos controlo de cada idade.

No entanto, o tratamento com isotretinona também não provocou alterações na relação peso do timo/peso do corpo, quando comparamos com os respectivos controlos.



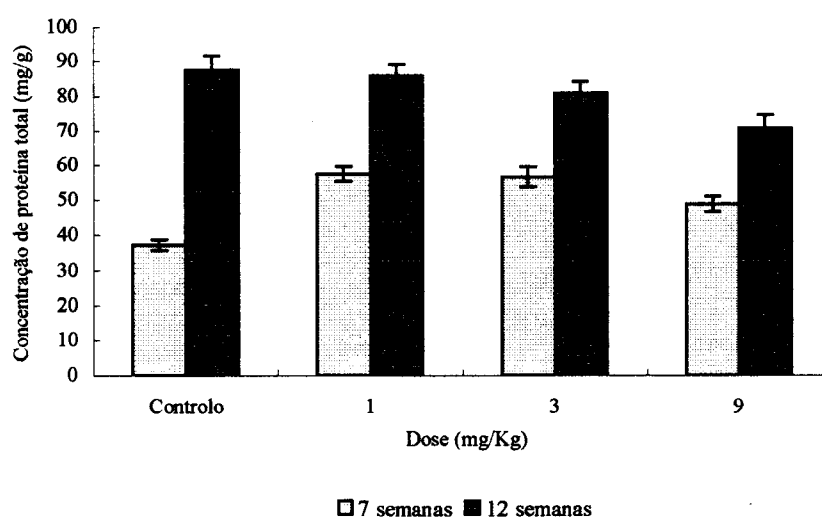
**Figura 4.54.** Influência da idade e do tratamento com isotretinona na relação peso de timo / peso do corpo, de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão da média. Os grupos assinalados com letras diferentes são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

#### 4.5.2. Fracção microssomal

##### 4.5.2.1. Concentração de proteína total

A concentração de proteína total da fracção microssomal do timo aumentou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.55.

A mesma representação gráfica mostra-nos também que o tratamento com o isoproturão provocou um pequeno aumento da concentração de proteínas da fracção microsomal tímica dos ratos com 7 semanas de idade que mostrou uma dependência inversa da dose injectada. No entanto, nos ratos com 12 semanas de vida foi apenas observada uma pequena diminuição desse conteúdo em função da dose administrada.

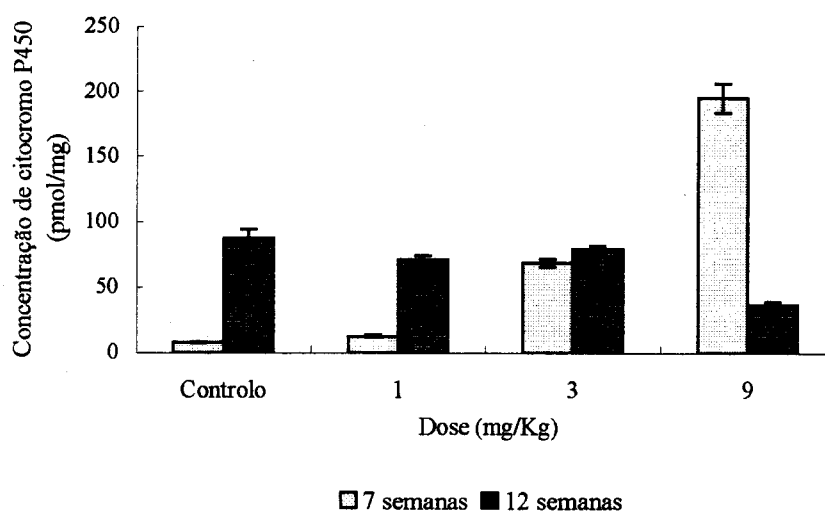


**Figura 4.55.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de proteína total da fracção microsomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.5.2.2. Concentração de citocromo P450

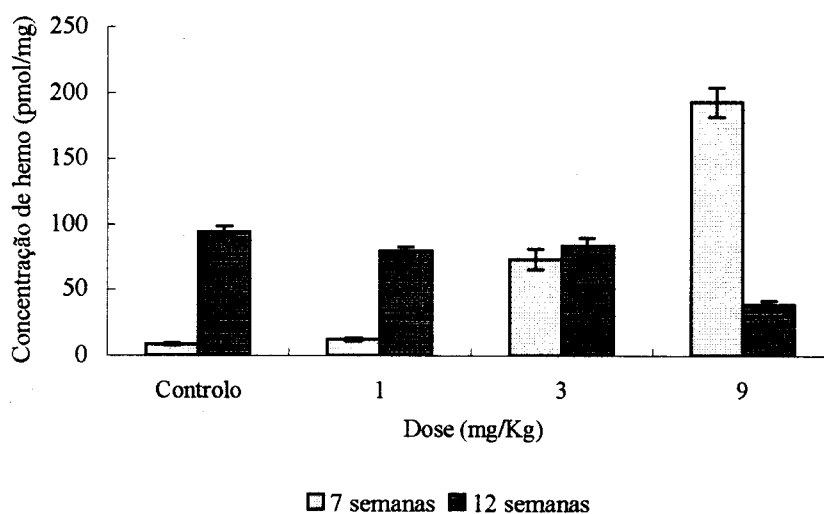
A concentração de citocromo P450 da fracção microsomal do timo aumentou entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.56.

A mesma figura também nos revela que, nos ratos pubertais, o tratamento com isoproturão provocou um aumento da concentração de citocromo P450 tímico, dependente da dose do xenobiótico que foi injectada. No entanto, nos ratos adultos, provocou apenas uma diminuição acentuada no grupo de animais tratados com a dose de 9mg/Kg.



**Figura 4.56.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de citocromo P450 da fracção microsomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.5.2.3. Concentração de hemo



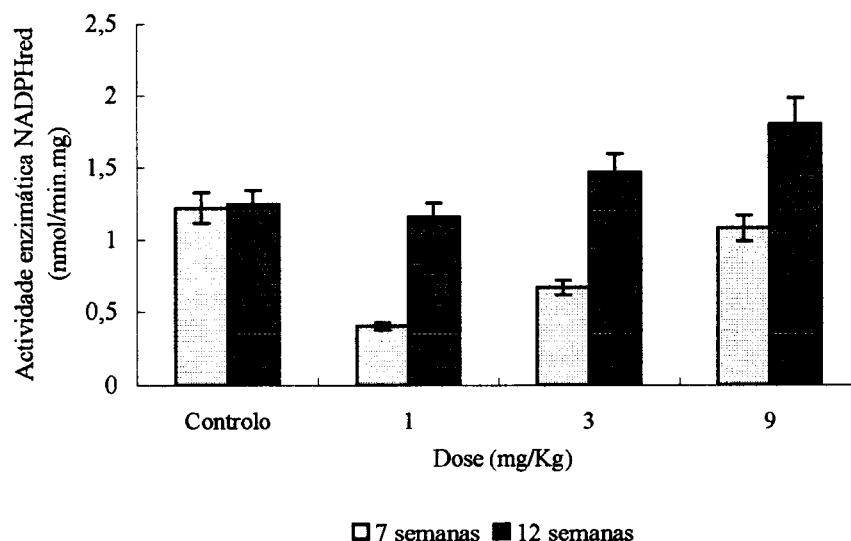
**Figura 4.57.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na concentração de hemo da fracção microsomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um "pool" de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

A concentração de hemo da fracção microssomal do timo aumentou entre as 7 e as 12 semana de vida, como podemos observar na figura 4.57.

A mesma representação gráfica revela-nos ainda que o tratamento com o isoproturão provocou no timo dos animais pubertais um aumento da concentração de hemo da fracção microssomal, dependente da dose de xenobiótico que foi injectada, enquanto que nos animais sexualmente maturos apenas ocorreu uma diminuição acentuada com a dose de 9 mg/Kg.

#### 4.5.2.4. Actividade enzimática NADPH (P450) redutase

A actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal do timo apresentou valores semelhantes em qualquer das idades estudadas, conforme podemos observar na figura 4.58, para os ratos controlo de cada idade que estudámos.



**Figura 4.58.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática NADPH (P450) redutase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

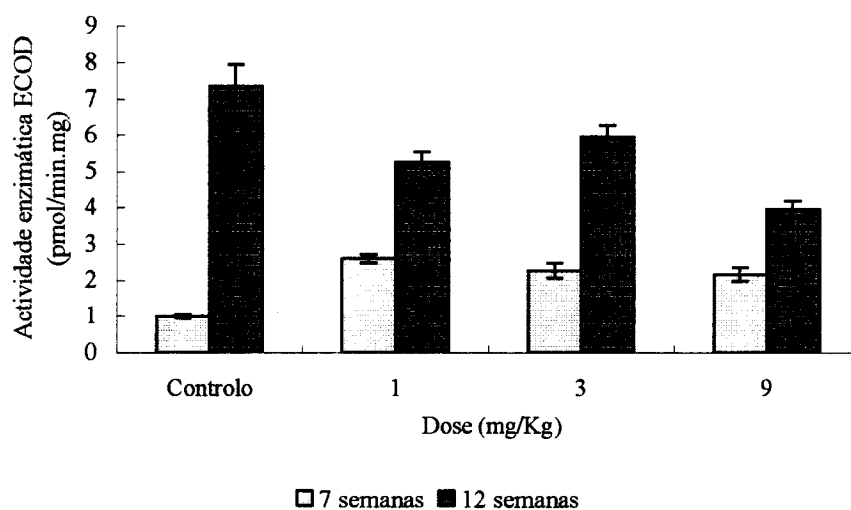


A referida figura permite-nos ainda observar que, nos ratos pubertais, o tratamento com isoproturão provocou uma diminuição desta actividade catalítica, efeito que foi mais acentuado nos animais injectados com a dose de 1 mg/Kg. Nos animais adultos, pelo contrário, a actividade enzimática NADPH (P450) redutase aumentou com a dose de xenobiótico que foi injectada.

#### 4.5.2.5. Actividade enzimática 7- etoxicumarina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microsomal do timo sofreu um aumento acentuado entre as 7 e as 12 semanas de vida, como pode ser observado na figura 4.59.

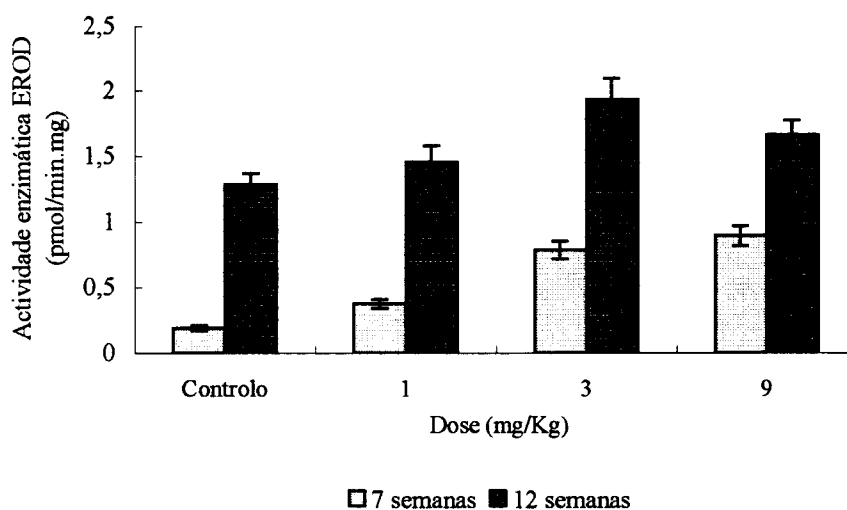
A referida representação gráfica também nos revela que, nos ratos pubertais, o tratamento com isoproturão provocou um aumento desta actividade catalítica, enquanto que nos ratos adultos provocou o efeito contrário.



**Figura 4.59.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 7-etoxicumarina *O*-desetilase da fracção microsomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.5.2.6. Actividade enzimática 7-etoxirresorfina *O*-desetilase

A actividade enzimática 7-etoxirresorfina *O*-desetilase da fracção microssomal do timo aumentou acentuadamente entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.60. A referida figura também nos revela que, em qualquer das idades, o tratamento com isoproturão provocou um aumento desta actividade enzimática da fracção microssomal do tecido tímico e que, no caso dos ratos pubertais, essa variação aumentou com a dose injectada.

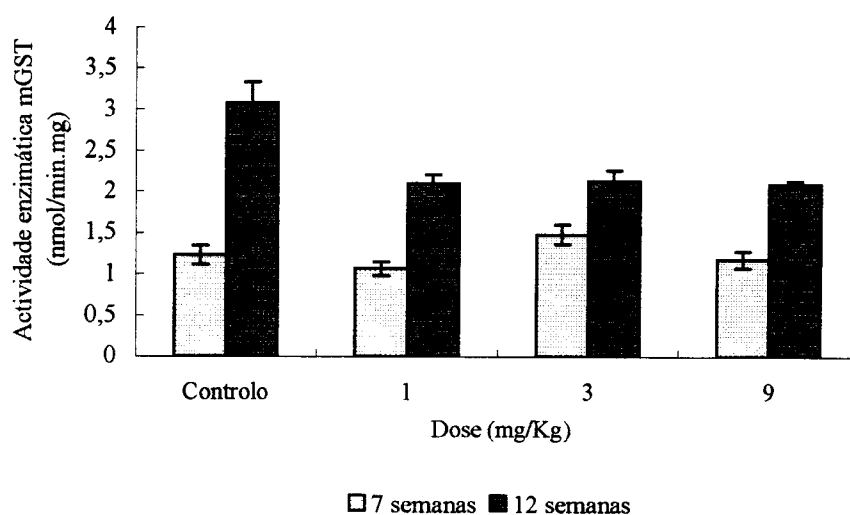


**Figura 4.60.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática 7-etoxirresorfina *O*-desetilase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.5.2.7. Actividade enzimática glutathione *S*-transferase

A actividade enzimática glutathione *S*-transferase da fracção microssomal do tecido tímico aumentou acentuadamente entre as 7 e as 12 semanas de idade, como podemos observar na figura 4.61.

A referida representação gráfica revela-nos ainda que o tratamento com isoproturão influenciou de forma diferente esta actividade catalítica em cada grupo etário estudado. Assim, nos animais pubertais, só observámos um pequeno aumento desta actividade enzimática no grupo que foi injectada a dose de 3 mg/Kg., enquanto que, nos animais adultos, ocorreu um decréscimo acentuado não dependente da dose, da referida actividade catalítica, relativamente ao grupo controlo.



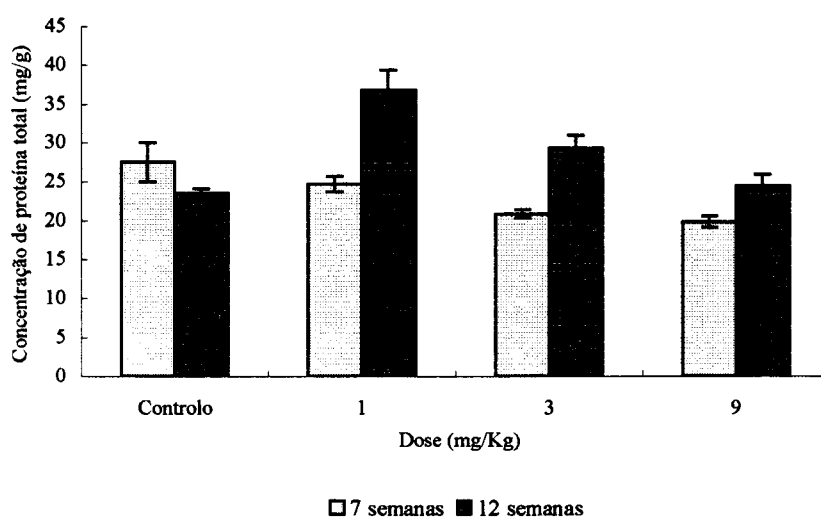
**Figura 4.61.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase da fracção microssomal do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

### 4.5.3. Citosol

#### 4.5.3.1. Concentração de proteína total

A concentração de proteína total do citosol tímico diminuiu entre as 7 e as 12 semana de vida, como podemos observar na figura 4.62.

A referida figura permite-nos ainda observar que, em cada uma das idades que estudámos, o tratamento com isotproturão produziu efeitos diferentes sobre a concentração proteica do citosol tímico. Enquanto que nos animais pubertais ocorreu um decréscimo dependente da dose que foi injectada, nos animais adultos, a resposta traduziu-se apenas por um aumento da concentração proteica nos animais injectados com as doses de 1 e 3 mg/Kg.

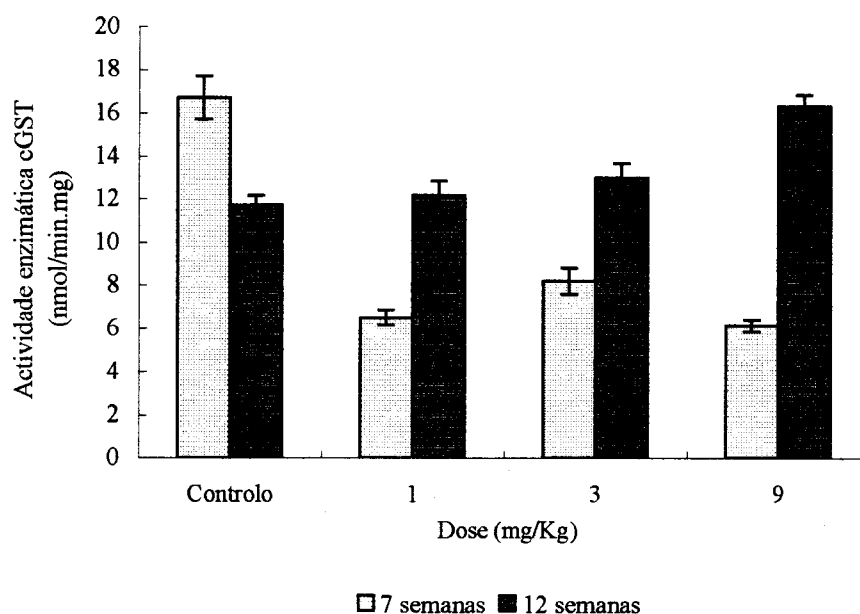


**Figura 4.62.** Influência da idade e do tratamento com isotproturão na concentração de proteína totalo do citosol do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.5.3.2. Actividade enzimática glutathione *S*-transferase

A actividade enzimática glutathione *S*-transferase do citosol do tecido tímico, diminuiu entre as 7 e as 12 semanas de vida, como podemos observar na figura 4.63. ao compararmos os valores obtidos para os ratos controlo de cada idade.

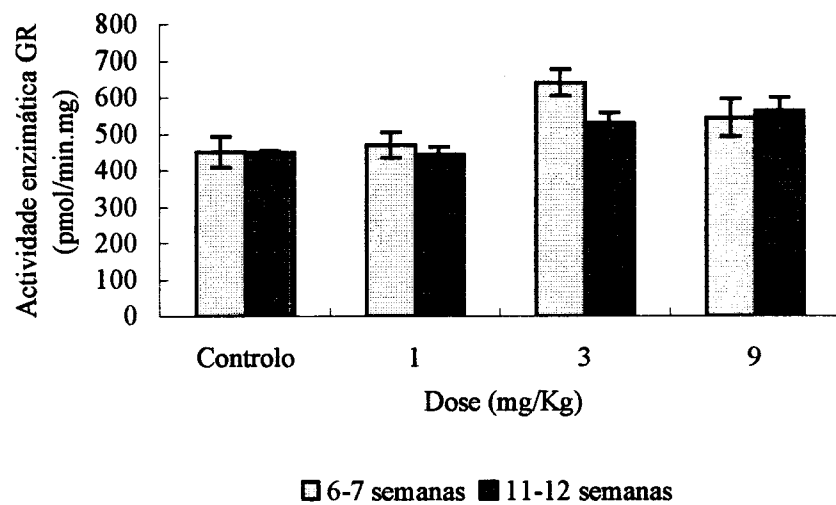
A mesma representação gráfica mostra-nos, ainda, que nos ratos pubertais, o tratamento com isoproturão provocou uma diminuição acentuada desta actividade catalítica, enquanto que, nos ratos adultos, a resposta ao xenobiótico traduziu-se por um aumento dependente da dose injectada.



**Figura 4.63.** Influência da idade e do tratamento com isoproturão na actividade enzimática glutationo *S*-transferase do citosol do timo de ratos machos Wistar. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.

#### 4.5.3.3. Actividade enzimática glutationo redutase

Os valores da actividade enzimática glutationo redutas, determinados no citosol tímico para os ratos controlo de cada idade, são muito semelhantes, como pode ser observado na figura 4.64. Em qualquer das idades, o tratamento com o isoproturão provocou um aumento desta actividade enzimática que nos ratos mais velhos parece ser dependente da dose do xenobiótico que foi injectada.



**Figura 4.64.** Influência da idade e do tratamento com isotretinona na actividade enzimática glutationo redutase do citosol do timo de ratos machos. Cada coluna representa a média de três replicados de um “pool” de 5 animais  $\pm$  desvio-padrão.



## **5. Discussão**





## 5.1. Influência da idade e do tratamento com isoproterurão, no animal inteiro, em ratos machos Wistar

A evolução dos seres vivos enquanto sistemas individualizados decorre por várias etapas importantes. O crescimento constitui uma dessas etapas do desenvolvimento que é comum a todos os organismos vivos e pode ser influenciado por factores endógenos e exógenos, como a acção hormonal ou a exposição a xenobióticos (Calow, 1978, Rothstein, 1986, Falconer, 1989, McClearn, 1997, Hosokawa *et al.*, 1997).

Os estudos efectuados em mamíferos que procuram determinar e compreender as interacções que os xenobióticos com eles estabelecem estão habitualmente dirigidos para um único momento pré-definido do desenvolvimento e não se debruçam sobre a evolução do organismo vivo e dos seus subsistemas em situações de exposição crónica a compostos exógenos (Rothstein, 1986, McClearn, 1997). Por esse motivo, a informação que dispomos na literatura sobre a acção dos xenobióticos nos mamíferos é muitas vezes parcial e escassa.

A maior parte dos trabalhos descritos na literatura para este ou outros xenobióticos foram realizados com mamíferos no período fetal, neo-natal, ou após atingirem a maturidade sexual (Kamataki *et al.*, 1985, Kato, 1986, Shimada *et al.*, 1987, Murray *et al.*, 1987, Diskshit *et al.*, 1990, Behera *et al.*, 1990, Juchau *et al.*, 1991, Sarkar *et al.*, 1993, Itio *et al.*, 1993, Masuda *et al.*, 1995, Srivastava *et al.*, 1995, Agrawal, 1997, Maeda *et al.*, 1997), pelo que, neste trabalho, escolhemos duas idades importantes do crescimento animal, a puberdade e adulto jovem, para avaliarmos a influência do isoproterurão em ratos machos Wistar, uma vez que não encontramos referência a qualquer estudo realizado com o isoproterurão neste período etário e nestes

animais. Além disso este período que decorre entre a puberdade e a idade adulta, a fase final do crescimento é muito importante pois ocorrem profundas alterações hormonais e metabólicas que poderão condicionar o modo e o tipo de interações que um xenobiótico ou uma mistura de compostos exógenos podem estabelecer com um determinado ser vivo (Dannan *et al.*, 1986, Mulder, 1986, Shimada *et al.*, 1987, Skett, 1990, Zarida *et al.*, 1993, Shapiro *et al.*, 1994, Buetler *et al.*, 1995, Zangar *et al.*, 1995, Pinot *et al.*, 1995, Prough *et al.*, 1996, Oinonen e Lindros, 1997, 1998). Como é difícil encontrar marcadores que nos permitam estimar com segurança a idade biológica de um determinado ser vivo, para além do tempo, utilizámos o peso do corpo que é uma medida aproximada que se utiliza com frequência neste tipo de experiências, para estimar a idade dos animais, (Simon, 1973, Warner *et al.*, 1987, Wainforth e Flecknell, 1992, Zarida *et al.*, 1993, Heiskanen *et al.*, 1995, Hiroi *et al.*, 1995, Canivenc-Lavier, 1996, Mclearn, 1997).

O peso corporal médio dos ratos que utilizámos nos ensaios, assim como a variação do mesmo observada entre as 7 e as 12 semanas de vida ajustaram-se ao perfil da curva de crescimento típica dos ratos machos Wistar descrita em Wainforth e Flecknell (1992), pelo que confirmamos os estádios de desenvolvimento animal em que efectuámos o trabalho, ou seja, a puberdade, entre as 6 e as 7 semanas de vida e a fase de adulto jovem, após as 11 semanas de idade (Baker *et al.*, 1980, Chauvet, 1986, Utsuyama e Hirokawa, 1989, Zarida *et al.*, 1993, Hosokawa *et al.*, 1997).

Por outro lado, a quantidade total de alimentos e o volume total de água ingeridos, assim como a quantidade total de fezes e o volume total de urina produzidos pelos grupos controlo durante os ensaios não sofreram alterações significativas com a

idade e estavam igualmente de acordo com os valores tabelados para esta fase do desenvolvimento dos ratos machos Wistar descritos em Wainforth e Flecknell (1992).

A realização de ensaios que permitam estimar a toxicidade de um xenobiótico sobre um determinado organismo, em particular quando esses estudos decorrem em períodos etários como a infância, puberdade, maturação sexual ou senescência, obriga a que seja efectuado um registo do peso do corpo, da quantidade de alimentos e do volume de água ingeridos, assim como do peso das fezes e do volume de urina produzidos por esses animais, para serem utilizados como indicadores primários de perturbações do crescimento ou da rotina diária do ser vivo que indiquem alterações mais profundas ao nível dos órgãos e sistemas que o constituem (Haley, 1987, Popp e Catley, 1991, Sipes e Gandolfi, 1991). Foi com esse objectivo que procedemos a esse controlo em todos os grupos de animais que estudámos. Contudo, o tratamento com isoproturão não afectou significativamente o peso dos animais, a quantidade total de comida e o volume total de água ingeridos, o peso das fezes, e o volume de urina produzidos, pelo que, a este nível, não observámos efeitos relevantes devidos ao tratamento. Assim, passámos a efectuar uma abordagem ao nível dos órgãos e molecular tendo em vista uma avaliação mais pormenorizada da acção daquele composto.

## 5.2. Influência da idade e do tratamento com isoproturão no fígado de ratos machos Wistar

O peso húmido do fígado, a relação peso húmido/peso do corpo registados às 7 e às 12 semanas de vida estão bastante próximos dos valores tabelados em Wainforth e Flecknell (1992). O aumento do peso húmido do órgão, assim como a pequena

diminuição, ainda que significativa, da relação peso do fígado/peso do corpo registada entre as 7 e as 12 semanas de vida, como esperávamos, estão de acordo com os valores tabelados para ratos machos Wistar pubertais e sexualmente maduros (Utsuyama e Hirokawa, 1989).

Estes resultados mostram que, à semelhança do que se passa com o animal inteiro, também a abordagem ao nível do fígado inteiro (enquanto órgão) não parece indicar qualquer acção relevante do isoproturão sobre o animal, pelo que passámos a dedicar a nossa atenção ao estudo das interacções xenobiótico-órgão ao nível molecular.

Os sistemas enzimáticos que participam na biotransformação de xenobióticos e esteróides endógenos estão maioritariamente localizados no fígado, uma vez que, este órgão tem como função principal receber e processar compostos químicos que são maioritariamente absorvidos pelo tracto gastro-intestinal, ou produzidos endogenamente antes da sua distribuição por outros tecidos (Haley, 1987, Sipes e Gandolfi, 1991, Popp e Catley, 1991, Guengerich, 1995, Heiskanen *et al.*, 1995, Meyer, 1996).

No rato, os isoenzimas do sistema citocromo P450 hepático, codificados pelos *CYP1A2* (Wazier *et al.*, 1990, Goldstein e Linko, 1994, Irizar e Ioannides, 1995, Wirkner e Poelchen, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996), *CYP2B1*, *CYP2B2* (Guengerich, 1986, Shaw *et al.*, 1993), *CYP2C11* (Guengerich, 1986, Waxman, 1988, Waxman, 1991, Nelson *et al.*, 1993, Zangar, 1995), *CYP2D1* (Xu *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998), *CYP3A1*, *CYP3A2* (Guengerich, 1986, Gonzalez *et al.*, 1986, Waxman, 1988, Maeda *et al.*, 1997) e *CYP11B1* (Nonaka *et al.*, 1989, Nelson *et al.*, 1996) são constitutivos e, na maior parte dos casos, podemos associá-los a actividades enzimáticas características. Assim, no fígado de animais que não foram tratados com indutores, como aconteceu com os ratos controlo de cada idade, as reacções de *O*-desetilação da 7-

etoxicumarina e da 7-etoxioresorufina envolvem a participação maioritária dos isoenzimas constitutivos codificados pelo *CYP1A2*, uma subfamília que pode igualmente participar na bioativação de compostos pró-cancerígenos como as arilaminas, nitrosaminas e aflotoxinas (Wirkner e Poelchen, 1996, Nelson *et al.*, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996) e pelo *CYP2D1* que pode participar também na *N*-desmetilação da etilmorfina (Xu *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998). Apesar de a subfamília codificada pelo *CYP1A2* expressar-se constitutivamente no tecido hepático, ela pode igualmente ser induzida por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, ou o 3-metilcolantreno, através de um mecanismo modelador da expressão genética que envolve a participação de receptores citosólicos do tipo “Ah” (Chen, e Tukey, 1996, Lindros, 1997, Oinonen e Lindros, 1998).

Na *N*-desmetilação da etilmorfina participam maioritariamente os isoenzimas codificados pela subfamília *CYP3A1* (Sipes e Gandolfi, 1991, Xu *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998), os quais participam ainda na catálise da 6 $\beta$ -hidroxilação da testosterona (Gonzalez, 1990, Ribeiro e Lechner, 1992, Zangar, 1995 *et al.*, Maeda *et al.*, 1997). Apesar de esta ser uma subfamília isoenzimática constitutiva, a sua expressão genética também pode ser induzida pelo fenobarbital (PB), ou por esteróides como a pregnenolona 16 $\alpha$ -carbonitrilo (PCN) e a dexametazoma (DEX), cujo mecanismo de indução poderá envolver a participação de receptores do tipo “PB” e “SRX”, respectivamente (Waxman, 1991, Maeda *et al.*, 1997). Para além do seu papel na conversão metabólica de esteróides endógenos, como a testosterona, em derivados mais facilmente excretáveis, desempenha um papel importante na biotransformação de antibióticos macrólidos (Maeda *et al.*, 1997).

A 6 $\beta$ -hidroxilação da testosterona no tecido hepático é também compartilhada pelos isoenzimas constitutivos codificados pelos *CYP3A2*, outro membro da família 3A, cujo mecanismo regulador da expressão genética parece ser semelhante ao da subfamília *CYP3A1* (Arlotto *et al.*, 1991, Waxman, 1991, Schenkman, 1992, Hiroi *et al.*, 1995, Buetler *et al.*, 1995, Zangar, 1995, Maeda *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998).

A conversão metabólica da testosterona em 2 $\alpha$ - e a 16 $\alpha$ -hidroxitesterona pelo fígado envolve a participação maioritária dos isoenzimas codificados pelo *CYP2C11*, uma subfamília de expressão constitutiva hepática que também está envolvida na biossíntese dos ácidos biliares e que pode ser igualmente induzida pelo fenobarbital (Burke e Mayer, 1974, Waxman, 1991, Isogai, 1993, Zangar, 1995, Xu *et al.*, 1996, Swales *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997, Anderson *et al.*, 1998).

As reacções de *O*-desetilação da 7-etoxicumarina e da 7-etoxiresorufina e a 16 $\alpha$ -hidroxilação da testosterona também podem ser catalisadas pelas proteínas codificadas pelos *CYP2B1* e *CYP2B2*. No entanto, a sua contribuição enquanto isoenzimas constitutivos do tecido hepático é considerada por vários investigadores como vestigial (Guengerich, 1986, Shaw *et al.*, 1993, Biro-Sauveur, 1994, Nelson *et al.*, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, Lindros, 1997).

A 11 $\beta$ -hidroxilação da testosterona é mediada no tecido hepático pelos isoenzimas constitutivos da subfamília codificada pelos *CYP11B1* e, até à data, não lhe foi identificado qualquer outro papel metabólico, nem foi esclarecido o mecanismo regulador da sua expressão genética (Nonaka *et al.*, 1989, Nelson *et al.*, 1996).

Os resultados que obtivemos com os animais controlo de cada idade mostraram-nos que ocorreu um aumento significativo da concentração de proteína microsomal, de citocromo P450 e do hemo hepáticos, entre as 7 e as 12 semanas de idade, o qual foi

acompanhado por aumento significativo das actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, 7-etoxicumarina *O*-desetilase (CYP1A2, CYP2D1, CYP2B1 e CYP 2B2), 7-etoxioresorufina *O*-desetilase (CYP1A2, CYP2D1, CYP2B1 e CYP 2B2), etilmorfina *N*-desmetilase (CYP2D1, CYP3A1), 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase (CYP3A1, CYP3A2), 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase e 2 $\alpha$ -testosterona hidroxilase, (CYP2C11) e 11 $\beta$ -testosterona hidroxilase (CYP11B1), pelo que fomos levados a admitir que ocorreu um aumento da expressão dos enzimas NADPH (P450) redutase, assim como das famílias isoenzimáticas constitutivas CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C11, CYP2D1, CYP3A1, CYP3A2, e CYP11B1 do sistema citocromo P450 de ratos machos Wistar, entre as 7 e as 12 semanas de vida.

As alterações hormonais que ocorrem ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas-timo nesta fase do crescimento, poderão ter condicionado a evolução positiva da capacidade hepática de metabolização de xenobióticos e esteróides endógenos pelo sistema citocromo P450 que observámos em ratos machos Wistar, tendo em conta o papel da acção hormonal na indução destas actividades catalíticas, amplamente descritas na literatura que consultámos (Rebar *et al.*, 1980, McGeogh *et al.*, 1985, Morgan *et al.*, 1985, Kato *et al.*, 1986, Dannan *et al.*, 1986, Shimada *et al.*, 1987, Guzelian *et al.*, 1988, Schuetz *et al.*, 1990, Murayama, *et al.*, 1991, Li *et al.*, 1993, Pinot *et al.*, 1995, Prough *et al.*, Lindros, 1997, Oinonen e Lindros, 1993, 1995, 1998).

No entanto, nesta abordagem, não podemos deixar de assinalar que a concentração de citocromo b5 da fracção microssomal não sofreu qualquer alteração com a idade, contrariamente ao que aconteceu com os outros constituintes microssomais que avaliámos. Por esse motivo, supomos que a sua modelação poderá envolver factores



endógenos diferentes dos que actuaram sobre os outros constituintes da fracção microsomal que abordámos neste estudo.

Os enzimas glutathione *S*-transferase participam maioritariamente em processos de desintoxicação celular, catalisando reacções de conjugação de xenobióticos ou dos seus derivados metabólicos com o glutathione (Sipes e Gandolfi, 1991, Mannervik *et al.*, 1992, Meyer *et al.*, 1993, Nijhoff e Peters, 1994, Monicha *et al.*, 1997, Ouwerkerk-mahadevan, 1997, Dierickx e Noble, 1997).

Os mecanismos reguladores da actividade enzimática glutathione *S*-transferase do citosol são diferentes daqueles que ocorrem na fracção microsomal. Enquanto que no citosol a regulação parece ocorrer maioritariamente ao nível da expressão dos genes que codificam cada subunidade enzimática, segundo mecanismos que envolvem receptores do tipo “Ah” (Prochaska *et al.*, 1985, Rushmore e Pickett, 1990, Prochaska e Talalay, 1988, Friling *et al.*, 1990, 1992, Meyer *et al.*, 1993, Favreau e Pickett, 1993, Jaiswal, 1994, Nguyen *et al.*, 1994, Fernandes *et al.*, 1996), na fracção microsomal a regulação ocorre maioritariamente ao nível pós-transcriptional, envolvendo reacções de *S*-tiolação directa entre os grupos sulfidrilo do resíduo de cisteína de cada subunidade proteica e o glutathione que levam à formação das proteínas diméricas cataliticamente activas (Morgenstern *et al.*, 1980, Dejong, *et al.*, Anyia e Anders, 1989, 1992, Anyia e Naito, 1993, Anyia *et al.*, 1993, Dafré *et al.*, 1996). Este tipo de reacções ocorrem preferencialmente em condições de “stress” oxidativo, como foi observado em ensaios de perfusão com peróxidos, ou quando o sistema P450 da fracção microsomal ao ser activado, comporta-se como gerador endógeno de espécies radicalares de oxigénio (Hildebrandt *et al.*, 1973, Prochaska *et al.*, 1985, Scholtz *et al.*, 1990, Anyia *et al.*, 1993).

Face ao exposto, somos levados a inferir que o aumento da actividade enzimática glutationo *S*-transferase microsomal observado no nosso ensaio entre a puberdade e a idade de adulto jovem, poderá ter ocorrido como resposta à evolução positiva da capacidade de metabolização de xenobióticos e de esteróides pelo sistema citocromo P450, como já referimos.

Os resultados obtidos com o citosol hepático mostram que a concentração proteica e a actividade glutationo redutase não sofreram um aumento significativo entre as 7 e as 12 semanas de vida. No entanto, a actividade glutationo *S*-transferase aumentou significativamente, o que está de acordo com o perfil de distribuição obtido por Weinander *et al.* (1996) para os enzimas GST do citosol, nesta fase do desenvolvimento. Assim, somos levados a admitir que, no período etário referido, ocorreu uma evolução positiva da capacidade dos constituintes enzimáticos dos hepatócitos para a conjugação do glutationo com os xenobióticos ou seus derivados metabólicos, um passo importante para a sua eliminação, sob a forma de mercapturatos, tanto mais importante se estes produtos forem deletérios para o organismo em geral ou para células hepáticas.

As interações que podem ocorrer entre um xenobiótico e um ser vivo são de natureza biunívoca, ou melhor, o xenobiótico pode ser modificado pelos sistemas de resposta desse organismo, ou pode ele próprio ser capaz de modificar esses sistemas de resposta (Sipes e Gandolfi, 1991, Kyle e Farber, 1991, Woodhouse e Wyne, 1992, Wilce Parker, 1994, Guengerich *et al.*, 1994, Douton, 1995, Gulick e Fahl, 1995, Smith *et al.*, 1996, Meyer, 1996). Por esse motivo, nenhum composto está potencialmente isento de provocar um efeito tóxico. No primeiro caso, teremos, por exemplo, os isoenzimas constitutivos do sistema citocromo P450 a actuar sobre um determinado composto exógeno, tornando-o mais polar e por isso mais facilmente excretável (Kyle e Farber,

1991, Guengerich, 1993, Woodhouse e Wymly, 1992, Meyer, 1996). No segundo caso, poderá ocorrer inibição ou indução desses isoenzimas, assim como a indução de novas subfamílias isoenzimáticas. No caso da inibição, o composto actua sobre o sistema tornando-o menos eficaz para a metabolização de compostos endógenos ou de xenobióticos, enquanto que no caso da indução aumenta essa capacidade de resposta (Denison e Whitlock, Jr., 1995).

A maior parte dos investigadores admitem que a indução em determinadas circunstâncias poderá ser vantajosa do ponto de vista evolutivo, pois permite ampliar as vias de desintoxicação após a exposição aos xenobióticos e constituir um mecanismo adaptativo que favoreça a sobrevivência (Guengerich, 1993, Denison e Whitlock, Jr., 1995)

No entanto, as vias de resposta podem não ter evoluído para actuarem exclusivamente sobre constituintes das dietas e xenobióticos. O mais provável é que existam antes do contacto do ser vivo com o xenobiótico e desempenhem um papel essencial na manutenção da homeostase de substratos endógenos como determinado tipo de lípidos ou esteróides (Guengerich, 1986, Shimada, 1987, Waxman, 1988, Sipes e Gandolfi, 1991, Nelson, 1993, Yamazaki *et al.*, 1996, Nelson *et al.*, 1993, 1996, Kroetz, *et al.*, 1997, Okita e Masters, 1997, Oinonen e Lindros, 1998, Anderson *et al.*, 1998).

Considerando o que acabámos de descrever, podemos admitir que a resposta a um xenobiótico nem sempre corresponderá a um efeito benéfico para o ser vivo, pois a resposta a novos compostos de circulação ambiental, poderá por um lado provocar a desregulação de vias endógenas vitais e por outro produzir intermediários reaccionais ou subprodutos capazes de se ligarem a macromoléculas estruturais ou enzimáticas que podem vir a desencadear processos que levem à morte celular. Por esse motivo, é sempre

útil traçar os perfis de concentração e de actividades enzimáticas, de resposta a um determinado composto, que permitam definir estratégias experimentais para identificar ligandos que participem nos mecanismos de regulação das vias bioquímicas pelas quais as células reconhecem e respondem aos estímulos químicos (Buetler *et al.*, 1995, Denison e Whitlock, Jr., 1995, Oinonen e Lindros, 1998).

Assim, para além das famílias citocromo P450 que discutimos anteriormente, é possível induzir em hepatócitos de rato, famílias novas ou de expressão constitutiva fraca, utilizando indutores químicos conhecidos (Hesse *et al.*, 1982, Goldstein e Linko, 1984, Ekstrom e Ingelman-Sendberg, 1989, Anyia *et al.*, 1993, Ramsden *et al.*, 1993, Ryan *et al.*, 1993, Heiskanen *et al.*, 1995, Buetler *et al.*, 1995, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, Chen, Y.-H., 1996 ).

A *O*-desetilação da etoxicumaria e da etoxiresorufina pode, por exemplo, ser mediada, nos hepatócitos de rato, por isoenzimas da subfamília CYP1A1 que não se encontram expressos constitutivamente no tecido hepático (Nelson *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, Walsh *et al.*, 1996, Lindros, 1997, Oinonen e Lindros, 1998). Esta subfamília está envolvida em processos de cancerização como, por exemplo os que envolvem, a bioactivação do benzo [*a*] pireno e pode ser induzida por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina ou o 3-metilcolantreno, através de um mecanismo que envolve a participação de receptores “Ah” (Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, McGuire *et al.*, 1996, Lindros, 1997, Vaziri e Faller, 1997, Oinonen e Lindros, 1998).

A *O*-destilação da etoxicumaria e da etoxiresorufina, assim como a 16 $\alpha$ -hidroxilação da testosterona, podem ser catalisadas pelos produtos de expressão dos genes *CYP2B1* e *CYP2B2*, subfamílias com expressão constitutiva hepática muito fraca,

mas que são induzidas pelo fenobarbital e por glucocorticóides através de mecanismos mal conhecidos que, provavelmente, envolvem a participação de receptores do tipo “PB” e “SRX” (Guengerich, 1986, Shaw *et al.*, 1993, Biro-Sauveur, 1994, Nelson *et al.*, 1996, Lindros, 1997).

Tendo em conta o que acabámos de referir, vamos tentar interpretar o que observámos no fígado, em cada idade, com os animais injectados com isoproturão.

Os resultados que obtivemos na fracção microssomal e no citosol hepático de ratos machos Wistar, mostraram que para cada uma das idades estudadas, o tratamento com isoproturão induziu perfis de concentração e de actividades enzimáticas diferentes.

Nos ratos pubertais, sacrificados às 7 semanas de idade, foi observado um efeito inibitório da capacidade de metabolização de xenobióticos e de esteróides endógenos por alguns constituintes do sistema citocromo P450, assim como por alguns enzimas que participam no metabolismo do glutationo.

Ao compararmos os resultados das fracções subcelulares de ratos pubertais injectados com isoproturão com os das fracções subcelulares dos respectivos ratos controlo, observámos que o tratamento com o xenobiótico provocou nos animais pubertais um decréscimo significativo da concentração de citocromo P450, de citocromo b5 e hemo, com as doses de 1 e 3 mg/Kg, assim como, uma diminuição significativa das actividades NADPHred, ECOD, EROD, catalisadas maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP1A2*, *CYP2B1*, *CYP2B2* e *CYP 2D1* (Wirkner e Poelchen, 1996, Nelson *et al.*, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996), END catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP2D1* e *CYP3A1* (Sipes e Gandolfi, 1991, Xu *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998), e 16 $\alpha$ -T-OH, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP2C11* (Waxman, 1991,

Isogai *et al.*, 1993, Zangar *et al.*, 1995, Swales *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997, Anderson *et al.*, 1998) e *CYP2B1*, *CYP2B2* (Guengerich, 1986, Biro-Sauveur, 1994, Nelson *et al.*, 1993, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, Lindros, 1997). Além disso observou-se ainda uma dependência directa entre a dose de isoproterurão injectada e o efeito provocado na concentração de citocromo P450, citocromo b5, hemo, e na actividade enzimática NADPHred.

No entanto, algumas actividades enzimáticas da fracção microssomal como a 6 $\beta$ -testosterona hidroxilase, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP3A1* (Gonzalez *et al.*, 1986, Sipes e Gandolfi, 1991, Ribeiro e Lechner, 1992, Xu *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997) e *CYP3A2* (Waxman, 1988, 1991, Arlotto *et al.*, 1991, Schenkman, 1992, Hiroi *et al.*, 1995, Buetler, 1995, Zangar *et al.*, 1995, Okita e Masters, 1997, Oinonen e Lindros, 1998) 11 $\beta$ -T-OH, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelo gene *CYP11B1* (Nonaka *et al.*, 1989), 2 $\alpha$ -T-OH catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelo gene *CYP2C11* (Waxman, 1991, Nelson *et al.*, 1993, Isogai *et al.*, 1993, Zangar *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 1996, Swales *et al.*, 1996, Anderson *et al.*, 1998), e cGST, não foram afectadas significativamente pelo tratamento com o xenobiótico.

A interpretação destes resultados não é fácil, uma vez que em alguns casos a actividade enzimática determinada corresponde à contribuição de várias famílias com expressão constitutiva na fracção microssomal e, noutros, a mesma família catalisa mais do que uma actividade enzimática.

No entanto, o decréscimo coincidente das actividades enzimáticas ECOD e EROD, mesmo considerando que no caso da EROD não teve significado estatístico ( $P < 0,01$ ) para todas as doses estudadas, sugere que o tratamento com isoproterurão inibiu

os isoenzimas codificados pelas subfamílias *CYP1A2*, *CYP2B1*, *CYP2B2* e *CYP2D1* hepáticos dos ratos pubertais, uma vez que todos se expressam constitutivamente no fígado, participam nas reacções de *O*-desetilação da etoxicumarina e da etoxiresorufina e para além disso, os *CYP2B1* e *CYP2B2* medeiam  $16\alpha$ -hidroxilação da testosterona, os *CYP2D1* catalisam a *N*-desmetilação da etilmorfina, actividades enzimáticas que também diminuíram.

Embora, por vezes, seja referido por alguns investigadores que a subfamília *CYP3A1* também pode participar na *N*-desmetilação da etilmorfina (Sipes e Gandolfi, 1991, Xu *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998), supomos que, neste caso, o decréscimo da actividade enzimática END está mais relacionado com o *CYP2D1*, pois não observámos qualquer efeito sobre a  $6\beta$ -hidroxilação da testosterona, a actividade enzimática catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelas subfamílias *CYP3A1* e *CYP3A2* (Sipes e Gandolfi, 1991, Xu *et al.*, 1997, Oinonen e Lindros, 1998).

Estes resultados mostram-nos, portanto, que o tratamento de ratos pubertais com isoproterão afectou maioritariamente as actividades enzimáticas cujos substratos são reconhecidos pelos isoenzimas que participam na biotransformação de xenobióticos, uma vez que as actividades catalíticas associadas às famílias que participam preferencialmente na hidroxilação de androgénios não parecem ter sido afectadas significativamente ( $P < 0,01$ ).

O resultado aparentemente contraditório que obtivemos para as actividades enzimáticas  $16\alpha$ - e a  $2\alpha$ -testosterona hidroxilase, catalisadas preferencialmente pelos isoenzimas da subfamília *CYP2C11* (Waxman, 1991, Isogai *et al.*, 1993, Zangar *et al.*, 1995, Swales *et al.*, 1996, Xu *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997, Anderson *et al.*, 1998), parece-nos explicável, se admitirmos que outras subfamílias constitutivas, como a

CYP2B1 ou CYP2B2 (Guengerich, 1986, Biro-Sauveur, 1994, Nelson *et al.*, 1993, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, Lindros, 1997), igualmente capazes de participar em reacções de hidroxilação da testosterona na posição 16 $\alpha$ , foram inibidas pelo tratamento.

O facto de a actividade 11 $\beta$ -testosterona hidroxilase dos ratos pubertais não ter sofrido qualquer variação devido à administração intraperitoneal do isotretinólio, sugere que os isoenzimas codificados pelos *CYP11B1*, outra subfamília que participa no metabolismo da testosterona, também não foram afectados pelo tratamento com o xenobiótico.

Embora seja razoável admitir que o decréscimo da actividade NADPHred possa ter contribuído para os efeitos inibitórios atrás referidos, não podemos esquecer que a maior parte das reacções de hidroxilação da testosterona não foram afectadas, pelo que consideramos mais provável que o isotretinólio esteja envolvido num efeito concertado ao nível da regulação da expressão genética das subfamílias *CYP1A2*, *CYP2B1*, *CYP2B2* e *CYP 2D1*.

O prosseguimento deste trabalho, exige a confirmação do perfil de resposta ao isotretinólio que acabámos de propor utilizando metodologias que nos permitam detectar e quantificar cada forma enzimática específica aqui referida e que contamos vir a realizar num futuro próximo por análise imunoquímica e RT-PCR .

O tratamento dos ratos pubertais com isotretinólio, não afectou os enzimas mGST do fígado. Este facto sugere que o tratamento de ratos pubertais com isotretinólio, não provocou alterações no ambiente intracelular hepático que pudessem afectar esta actividade enzimática, como por exemplo o aumento da concentração intracelular de espécies radiculares de oxigénio muitas vezes implicadas na sua indução.



No entanto, o tratamento dos ratos machos pubertais com isoproturão provocou um decréscimo das actividades catalíticas cGST e GR hepáticos. A capacidade do fígado para participar em reacções de conjugação em que participa o glutathione foi, portanto, significativamente diminuída por qualquer das doses administradas. Assim, somos mais uma vez levados a admitir que o tratamento de ratos pubertais com isoproturão poderá diminuir a capacidade de resposta do tecido hepático aos xenobióticos. Este efeito assume importância relevante sob o ponto de vista da toxicidade de outros xenobióticos que penetrem no organismo, juntamente com o isoproturão, uma vez que, a conversão e eliminação hepática destes pode ser alterada, durante a puberdade, expondo os indivíduos mais novos a maiores riscos de toxicidade.

Como nos ratos pubertais, a maior parte das actividades enzimáticas testosterona hidroxilase não foram afectadas pelo tratamento com o isoproturão, admitimos que o metabolismo de biotransformação da testosterona, no tecido hepático não terá sido significativamente afectado pelo xenobiótico neste período etário.

A resposta ao isoproturão observada no fígado de ratos machos Wistar adultos, foi muito diferente da que foi observada nos ratos pubertais. Assim, nos animais com 12 semanas de vida, observámos um aumento significativo da concentração proteica microsomal em todos os grupos de animais injectados, acompanhada por um aumento significativo da concentração de citocromo P450 e de hemo para as doses de 1 e 3 mg/Kg e das actividades catalíticas ECOD, EROD, cGST e GR, para todas as doses. Observámos igualmente uma diminuição significativa da concentração de citocromo b5 e das actividades enzimáticas NADPHred, END,  $6\beta$ ,  $16\alpha$ -,  $11\beta$ -,  $2\alpha$ -T-OH e mGST.

Os aumentos da concentração de proteína, citocromo P450, hemo e de algumas actividades enzimáticas do sistema citocromo P450 observados nos animais com 12

semanas de idade submetidos ao tratamento com o isoproturão traduzem um perfil de indução de alguns isoenzimas desse sistema.

Embora as actividades enzimáticas ECOD e EROD possam ter aumentado devido a indução de várias subfamílias como as que são codificadas pelos *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B1*, *CYP2B2* ou *CYP2D1*, as variações obtidas para outras actividades enzimáticas do sistema P450 levam-nos a considerar, talvez um pouco abusivamente, que a indução isoenzimática afectou preferencialmente as subfamílias *CYP1A1* e *CYP1A2*. Esta opção pode ser justificada, em parte, pelo facto de a indução das subfamílias *CYP2B1* e *CYP2B2* ou da subfamília *CYP2D1* não ter sido confirmada por um aumento das actividades enzimáticas  $16\alpha$ -T-OH, no caso dos membros da família 2B, ou da END no caso da subfamília *CYP2D1*. Pelo contrário, observámos um decréscimo significativo das referidas actividades enzimáticas.

O aumento significativo da actividade enzimática cGST leva-nos a suspeitar que o tratamento com isoproturão poderá ter induzido no fígado de ratos adultos a expressão de genes regulados por receptores do tipo “Ah”, o mecanismo de indução genética comum aos *CYP1A1* e *CYP1A2* microsossomais e às subunidades enzimáticas que constituem as proteínas diméricas, responsáveis por 94% da actividade glutathione *S*-transferase do citosol (Meyer *et al.*, 1991,1993). Este tipo de resposta sugere um efeito metabólico concertado entre alguns dos isoenzimas do tecido hepático que participam nas duas fases de biotransformação de xenobióticos, uma resposta que corresponde a um mecanismo de indução bifuncional (Fernandes *et al.*, 1996) .

Os resultados que obtivemos com os ratos sexualmente maduros mostram-nos ainda que o metabolismo endógeno de esteróides, em particular o da testosterona, no tecido hepático, foi acentuadamente inibido pelo tratamento com isoproturão. Este facto

é evidenciado pelo decréscimo significativo das actividades enzimáticas  $2\alpha$ -T-OH, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelo gene *CYP2C11* (Waxman, 1991, Nelson *et al.*, 1993, 1996, Isogai *et al.*, 1993, Zangar *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 1996, Swales *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997, Anderson *et al.*, 1998),  $16\alpha$ -T-OH, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP2C11* (Waxman, 1991, Nelson *et al.*, 1993, 1996, Isogai *et al.*, 1993, Zangar *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 1996, Swales *et al.*, 1996, Maeda *et al.*, 1997, Anderson *et al.*, 1998), *CYP2B1* e *CYP2B2* (Guengerich, 1986, Shaw *et al.*, 1993, Biro-Sauveur, 1994, Nelson *et al.*, 1993, 1996, Canivenc-Lavier *et al.*, 1996, Lindros, 1997),  $6\beta$ -T-OH, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP3A1* (Gonzalez *et al.*, Sipes e Gandolfi, 1991, Ribeiro e Lechner, 1992, Maeda *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1996) e *CYP3A2* (Gonzalez *et al.*, Guengerich, 1986, Waxman, 1988, 1991, Arlotto *et al.*, 1991, Schenkman, 1992, Hiroi *et al.*, 1995, Buetler, 1995, Zangar *et al.*, 1995, Oinonen e Lindros, 1998) e  $11\beta$ -T-OH, catalisada maioritariamente pelos isoenzimas codificados pelo gene *CYP11B1* (Nonaka *et al.*, 1989, Waxman, 1988, 1991). Estes resultados permitem-nos suspeitar que os mecanismos reguladores da expressão de genes hepáticos que envolvam a participação de receptores do tipo “PB” ou “SRX” foram afectados negativamente pelo tratamento com isoproturão nos ratos machos Wistar que atingiram a maturidade sexual.

É provável que o decréscimo da concentração de citocromo b5 e da actividade enzimática NADPHred possa também ter afectado a transferência de equivalentes redutores do NAD(P)H para as diferentes formas isoenzimáticas de citocromos P450 e, por esse motivo, podia ter contribuído indirectamente para a diminuição das actividades catalíticas mediadas pelas subfamílias *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP2C11*, *CYP3A1*,

CYP3A2 e CYP11B1. No entanto, a hipótese da repressão da expressão genética parece-nos mais provável, uma vez que o efeito inibitório incidiu maioritariamente sobre subfamílias cuja expressão é usualmente afectada pelo fenobarbital (Heiskanen *et al.*, 1995, Lindros, 1997, Maeda *et al.*, 1997, Lohor *et al.*, 1998, Oinonen e Lindros, 1998).

Se tivermos em conta que, muitas vezes, a indução enzimática incide sobre a família ou subfamília de enzimas que reconhece o próprio indutor como substrato, temos motivos para suspeitar que um dos primeiros passos na biotransformação hepática do isoproturão poderá corresponder à perda de um grupo metilo, catalisada eventualmente pelos isoenzimas da família CYP1A1 e, ou CYP1A2, um processo que parece ter sido activado nos hepatócitos de ratos com 12 semanas de idade. De facto, um dos derivados metabólicos do composto detectado em amostras de solo é o monometilisoproturão (Mudd, 1983), pelo que consideramos razoável supor que um processo idêntico possa ter ocorrido no fígado dos ratos adultos.

O aumento da actividade GR do citosol hepático parece estar relacionado com o aumento da actividade enzimática cGST observado na mesma fracção celular do fígado, e pode ser encarado como uma forma de reposição do potencial redutor sob a forma de GSH dispendido nas reacções de conjugação do tripéptido com os xenobióticos ou seus derivados metabólicos. Por vezes, este tipo de resposta providencia equivalentes redutores para a desintoxicação de hidroperóxidos mutagénicos através dos enzimas GPx e mGST e, como tal, pode estar associado ao aumento da concentração intracelular de hidroperóxidos, condição ideal para a indução pós-transcricional dos enzimas mGST. Por esse motivo, não encontramos explicação para o decréscimo da actividade catalítica mGST que observámos nos ratos adultos.

A resposta ao isoproturão dada pelos constituintes que estudámos do sistema citocromo P450 e por alguns enzimas que participam no metabolismo do glutathione de ratos adultos jovens pode ter importância sob o ponto de vista toxicológico, uma vez que a metabolização do composto parece ocorrer através da indução de subfamílias isoenzimáticas como a CYP1A1 e, ou CYP1A2, as quais estão fortemente implicadas em processos de carcinogénese química como a bioactivação do benzo[*a*]pireno, nitrosaminas ou aflotoxinas, bem descritos na literatura (Sipes e Gandolfi, 1991, Irizar e Ioannides, 1995, Oinonen e Lindros, 1998).

O processo poderá, assim, contribuir para a bioactivação do isoproturão, ou de outros compostos de circulação ambiental que penetrem no organismo em simultâneo com o isoproturão (Yang, 1996), gerando espécies químicas capazes de provocar danos nas estruturas moleculares dos hepatócitos. Contudo, a resposta concertada dos enzimas cGST e GR poderá ter contribuído para a minimização desses efeitos traduzindo-se globalmente como uma resposta hepatoprotectora.

Além disso, a acentuada inibição dos isoenzimas que participam na biotransformação hepática da testosterona e de outros esteróides leva-nos a admitir que o tratamento de ratos adultos com o xenobiótico poderá ter afectado a eliminação desses compostos endógenos pelo fígado, efeito que pode provocar alterações fisiológicas importantes, nomeadamente ao nível do sistema imunitário e reprodutor.

Face ao exposto poderemos considerar que a resposta ao isoproturão dada pelos sistemas de biotransformação de xenobióticos e de esteróides endógenos hepáticos de ratos machos Wistar depende da idade em que o tratamento foi efectuado.

Em ratos pubertais a principal perturbação que observámos traduziu-se essencialmente numa diminuição da capacidade de resposta aos xenobióticos, por parte

de alguns constituintes do sistema citocromo P450 e dos enzimas glutatióno S-transferase e glutatióno redutase do citosol, sem que as reacções de bitransformação da testosterona tenham sido afectadas significativamente.

Em ratos adultos jovens ocorreu a indução de alguns enzimas do sistema citocromo P450 que participam no metabolismo de xenobióticos, como as famílias isoenzimáticas microsossomais que catalisam reacções de desalquilação e os enzimas citosólicos que participam em reacções de conjugação com o glutatióno, uma resposta bifuncional, encarada por Buetler (1995) como hepatoprotectora. Apesar de os resultados experimentais sugerirem que no período que vai da puberdade até à maturação sexual, o factor idade, contribuiu para uma evolução positiva da capacidade de resposta dos sistemas hepáticos de biotransformação de xenobióticos e de esteróides endógenos, a perturbação que o tratamento com isoproturão provocou ao nível do metabolismo da testosterona, poderá ter induzido alterações funcionais no fígado e no organismo em geral, com significado toxicológico.

### 5.3. Influência da idade e do tratamento com isoproturão nos rins de ratos machos Wistar

Os rins, como órgão multifuncional que são, desempenham funções importantes na manutenção do conteúdo iónico dos fluidos do organismo e na remoção de produtos de excreção que nele são produzidos ou para lá transportados (Haley, 1987, Jeffery, 1991, Dierickx e Noble, 1997).

O contacto sistemático com uma ampla variedade de xenobióticos, leva a que os rins estejam sujeitos a um risco superior ao da maior parte dos outros órgãos para sofrer

efeitos tóxicos (Haley, 1987, Dierickx e Noble, 1997, Lohr *et al*, 1998). Por esse motivo, o conhecimento das vias renais de biotransformação dos xenobióticos e dos mecanismos que as regulam constitui um campo de trabalho extremamente importante (Agrawal e Shapiro, 1997), tanto mais que alguns estudos tem revelado perfis e mecanismos de indução no tecido renal diferentes dos que são observados no tecido hepático (Dierickx e Noble, 1997, Lohr *et al*, 1998).

Embora os rins participem activamente na eliminação de compostos hidrófilos e na reabsorção de substâncias biologicamente importantes, poucos têm sido os estudos dedicados ao estabelecimento e à caracterização dos mecanismos de indução dos seus sistemas de biotransformação de xenobióticos, pelo que, a informação bibliográfica disponível para este órgão é, em geral, inferior à que existe sobre o fígado. Por esse motivo, considerámos o tecido renal objecto de estudo deste trabalho, apesar das dificuldades que sentimos na optimização dos protocolos experimentais, nomeadamente ao nível da quantidade de tecido disponível, em particular nos ratos mais jovens, e na quantificação de constituintes endógenos ou dos produtos formados pelas fracções subcelulares que preparámos.

O peso húmido dos rins, assim como a relação peso húmido/peso do corpo registados às 7 e às 12 semanas de vida foram, como esperávamos, semelhantes aos valores tabelados para ratos machos Wistar pubertais e sexualmente maduros, respectivamente (Utsuyama e Hirokawa, 1989, Wainforth e Flecknell, 1992).

Os ensaios realizados com a fracção microssomal e o citosol permitiram detectar no tecido renal a presença de citocromo P450 e b5, assim como as actividades enzimáticas NADPH (P450) redutase, 7-etoxicumarina *O*-desetilase, 7-etoxiresorufina *O*-desetilase, 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -testosterona hidroxilase, glutationo *S*-transferase microssomal,

glutathione *S*-transferase e glutathione redutase citosólicas. No entanto, os valores que determinámos foram na maior parte dos casos inferiores aos registados nas respectivas fracções subcelulares do tecido hepático, mas semelhantes aos da literatura (Olivier *et al.*, 1990).

As actividades etilmorfina *N*-desmetilase,  $2\alpha$ - e  $11\beta$ -testosterona hidroxilase não foram detectadas no tecido renal, mesmo quando utilizámos uma concentração proteica microsomal superior à do fígado.

O perfil de expressão constitutiva de citocromos P450 nos rins, não pareceu ser totalmente coincidente com o do tecido hepático. Por exemplo, a ausência das actividades enzimáticas  $11\beta$ -testosterona hidroxilase e etilmorfina *N*-desmetilase, levamos a admitir que as subfamílias CYP11B1 e CYP2D1, respectivamente, não se encontravam constitutivamente expressas, no tecido renal ou então estavam-no tão pouco que foi impossível detectá-las com os métodos que utilizámos.

Por outro lado, a ausência da actividade enzimática  $2\alpha$ -testosterona hidroxilase em qualquer das idades permite-nos supor que as subfamílias CYP2B1 e CYP2B2 poderão ser maioritariamente responsáveis pela  $16\alpha$ -hidroxilação da testosterona (Gonzalez, 1989, Shaw *et al.*, 1993), contrariamente ao que acontece no fígado onde a subfamília CYP2C11 catalisa maioritariamente e em simultâneo a  $16\alpha$ - e a  $2\alpha$ -hidroxilação da testosterona (Lohr *et al.*, 1998).

Embora a expressão do gene *CYP3A1* tenha sido admitida no tecido renal por Parkinson (1996) e Lohr *et al.* (1998) e nós próprios tenhamos detectado a presença da actividade enzimática  $6\beta$ -testosterona hidroxilase na fracção microsomal dos rins, os resultados que obtivemos não confirmam o papel dessa subfamília no tecido renal, uma vez que não detectámos a actividade etilmorfina *N*-desmetilase, outra reacção que lhe é



característica. Parece-nos, pois, razoável admitir que a família CYP21 e a subfamília CYP3A2, descritas por Lohr *et al.* (1998) como constitutivas do tecido renal, participem maioritariamente na hidroxilação da testosterona na posição  $6\beta$ , apesar de a subfamília CYP3A1 poder também encontrar-se expressa.

O aumento acentuado da concentração de citocromo P450, citocromo b5 e hemo, assim como o aumento das actividades enzimáticas NADPHred, ECOD e EROD entre as 7 e as 12 semanas de idade, leva-nos a admitir que alguns constituintes do sistema citocromo P450 renal de ratos machos Wistar aumentaram a sua capacidade de resposta aos xenobióticos neste período etário.

No entanto, mais uma vez as alterações enzimáticas que ocorreram na fracção microssomal renal entre a puberdade e a fase de adulto jovem não foram coincidentes com as que foram observadas para o tecido hepático como aconteceu com as actividades  $6\beta$ - e  $16\alpha$ -T-OH participantes na metabolização da testosterona que diminuíram com a idade no período etário que seleccionámos para o estudo. Assim, somos, uma vez mais, levados a suspeitar que a hidroxilação da testosterona nos rins poderá ser maioritariamente catalisada por isoenzimas citocromos P450 diferentes daqueles que, no tecido hepático, exercem essa função.

O prosseguimento deste trabalho impõe que estes aspectos sejam mais bem esclarecidos, pois é provável que os mecanismos reguladores da expressão dos genes *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A2* e *CYP21* sejam semelhantes, uma vez que o perfil de resposta das actividades enzimáticas  $16\alpha$ -T-OH e  $6\beta$ -T-OH, ao tratamento com isoprotereno foi coincidente nas duas fases do desenvolvimento que estudámos.

O facto de a actividade enzimática mGST nos rins dos ratos controlo adultos ser inferior à dos ratos controlo pubertais, precisa de ser mais bem esclarecido, pois não

temos uma explicação adequada para o efeito observado, tanto mais que a capacidade de resposta aos xenobióticos pelo sistema citocromo P450 parece estar ampliada às 12 semanas de idade. Como a actividade glutathione redutase do citosol não sofreu qualquer alteração entre as 7 e as 12 semanas de vida, podemos admitir que o sistema citocromo P450 respondeu pela via oxidativa clássica sem desencadear as condições de “stress” oxidativo necessárias para a indução das actividades enzimáticas mGST e GR.

A quantificação de subprodutos do sistema P450, como peróxidos, ou a determinação do perfil de outras actividades enzimáticas que participem na sua eliminação como o enzima glutathione peroxidase dependente e não dependente do selénio e superóxido dismutase, poderão dar um esclarecimento complementar sobre alguns destes aspectos.

O facto de o tratamento com o isoprotereno não ter afectado significativamente o o peso dos rins, nem a relação peso do órgão/peso do corpo, levou-nos a concluir que, ao nível do órgão inteiro, não se observaram efeitos relevantes em resultado do tratamento efectuado em qualquer das fases do desenvolvimento animal escolhidas para este trabalho, pelo que, só a abordagem molecular poderá, mais uma vez, contribuir para a avaliação da sua acção nos rins de ratos machos Wistar.

Tal como no fígado, o tratamento com isoprotereno, provocou nos rins, em cada idade efeitos diferentes sobre os sistemas em estudo. Assim, às 7 semanas de vida observámos um aumento da concentração total de proteínas, de citocromo P450 e de hemo microsomal, o que não foi acompanhado pelo aumento das actividades catalíticas que avaliámos. Pelo contrário, com qualquer das doses administradas, observámos um decréscimo das actividades enzimáticas NADPHred, 6 $\beta$ -T-OH que é maioritariamente catalisada pelos produtos dos genes *CYP3A2* e *CYP21* (Lohr *et al.*, 1998), e 16 $\alpha$ -T-OH

maioritariamente catalisada pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP2B1* e *CYP2B2* (Gonzalez, 1989). Além disso, as actividades catalíticas ECOD e EROD mediadas pelos isoenzimas codificados pelos genes *CYP1A1* (Lindamood, 1991) e *CYP1A2* (Ioannides e Park, 1990 e Lohr *et al.*, 1998) também diminuíram nos animais tratados com a dose de 9 mg/Kg.

Os efeitos que referimos poderão, em princípio, ter sido condicionados por diversas causas.

Por um lado, a transferência de equivalentes redutores do NADPH para os citocromo P450 envolvendo a participação dos enzimas NADPHred e a proteína citocromo b5, poderá ter levado a que a resposta em termos de actividade enzimática não corresponda ao aumento da expressão genética sugerida pelo aumento da concentração de proteínas e de citocromo P450 que referimos, uma hipótese que já foi formulada por Isogai (1993) para uma situação experimental semelhante à que descrevemos.

Por outro lado, os substratos sonda que utilizámos poderão não ter sido os mais adequados para detectar a presença dos isoenzimas citocromo P450 renais, cuja expressão possa ter sido induzida pelo isoproteronolol, como por exemplo, os membros da família 4 que participam na  $\omega$ -hidroxilação de ácidos gordos e prostaglandinas (Nelson *et al.*, 1993, 1996, Lohr *et al.*, 1998).

Outra explicação para este facto passa por admitir que o isoproteronolol terá induzido a via oxigenorredutora do sistema citocromo P450 e, como tal, não permitiu que detectássemos um aumento da actividade oxidativa proporcional ao aumento da concentração de citocromo P450. O aumento das actividades enzimáticas mGST e GR do citosol sugerem de facto que poderá ter ocorrido nos rins um incremento do ambiente

oxidante, eventualmente gerado por subprodutos do sistema citocromo P450. Por esse motivo, consideramos que o doseamento do conteúdo intracelular de hidroperóxidos, assim como a determinação das actividades glutathione peroxidase dependente e não dependente do selénio constituem também neste caso, um passo importante para o esclarecimento destes resultados.

A diminuição moderada da actividade cGST pode traduzir um efeito semelhante ao que foi exercido sobre as actividades enzimáticas ECOD e EROD, uma vez que a modelação dos enzimas cGST, manifesta-se prioritariamente ao nível da expressão genética por um mecanismo que envolve a participação de receptores do tipo “Ah”, como acontece com os isoenzimas codificados pelos *CYP1A1* e *CYP1A2* microssomais (DiBiasio *et al.*, 1991, Gandy *et al.*, 1996, Dierickx e Noble, 1997, Jung e Henke, 1996).

Neste quadro, a administração do isoproterurão provocará toxicidade sobre o tecido renal dos ratos pubertais que uma eventual indução de ambiente oxidante intracelular e a inibição simultânea, ainda que moderada, dos isoenzimas regulados por genes “Ah” como os *CYP1A1*, *CYP1A2* e cGST, poderá levar à acumulação de substâncias reactivas nos rins, capazes de inviabilizar algumas funções vitais do órgão.

O tratamento de ratos machos Wistar adultos jovens com isoproterurão provocou um decréscimo da concentração de citocromo P450, citocromo b5 e hemo, assim como das actividades enzimáticas NADPHredutase, ECOD e EROD.

Ao contrário do que aconteceu no tecido hepático, o isoproterurão, comportou-se no tecido renal dos animais com 12 semanas de idade como não indutor de reacções de desalquilação, eventualmente catalisadas pelos isoenzimas codificados pelos *CYP1A1* (Lindamood, 1991) e *CYP1A2* (Ioannides e Park, 1990, Lohr *et al.*, 1998).

A indução da actividade enzimática cGST renal sugere ainda que, em ratos adultos, a modelação dessa actividade catalítica nos rins poderá envolver um mecanismo diferente daquele que se manifestou em ratos pubertais. Enquanto que, às 7 semanas de idade o xenobiótico provocou uma inibição desta actividade catalítica, concertada com a que foi exercida sobre as subfamílias microssomais reguladas por mecanismos que envolvem a participação de receptores “Ah”, às 12 semanas de idade, o mesmo composto comportou-se como um indutor monofuncional (Buetler, 1995), ligando-se eventualmente, a um receptor citosólico diferente do receptor “Ah”, para exercer a sua acção ao nível do genoma.

O aumento das actividades  $6\beta$ - e  $16\alpha$ -T-OH sugere-nos que o isoproturão exerceu uma modelação positiva no metabolismo renal da testosterona, provavelmente ao nível da indução dos genes *CYP3A2*, *CYP21* (Lohr *et al*, 1998), *CYP2B1* e *CYP2B2* (Gonzalez, 1989), cujo mecanismo regulador de expressão poderá depender da participação de receptores do tipo “PB” e, ou “SRX” (Shaw *et al*, 1993, Lindros, 1997).

Este efeito poderá constituir uma alternativa à modelação negativa exercida pelo xenobiótico sobre o metabolismo hepático da testosterona, em ratos adultos jovens. Parece-nos que este tipo de resposta só foi possível por a  $6\beta$ - e a  $16\alpha$ -hidroxilação da testosterona no tecido renal ser maioritariamente mediada por famílias que se encontrem exclusivamente expressas nos rins, como é o caso da *CYP21* (Lohr *et al*, 1998), ou que, sendo também expressas noutros tecidos, o seu papel no tecido renal seja mais destacado do que no fígado, como parece acontecer com as subfamílias *CYP2B1* e *CYP2B2* (Gonzalez, 1989).

O aumento das actividades enzimáticas mGST e GR que observámos pode estar relacionado com a eventual indução das subfamílias *CYP2B1* e *CYP2B2*, isoenzimas que

participam facilmente em reacções de oxigeno-redução geradoras de espécies radicalares de oxigénio no meio intracelular, o ambiente necessário à indução dos enzimas anti-oxidantes que acabámos de referir (Vromans *et al*, 1990, Goeptar *et al.*, 1993).

Embora possamos admitir que o aumento das actividades catalíticas mGST, cGST e GR dos rins constituiu uma resposta concertada à indução do metabolismo da testosterona pelo isotretinólio, não podemos deixar de considerar que factores extrarenais, como, por exemplo, derivados metabólicos produzidos no fígado e transportados para os rins, tenham igualmente responsabilidade nessa indução tendo em vista a sua própria eliminação através da urina sob a forma de mercapturatos.

A inibição de alguns constituintes do sistema P450, como os enzimas NADPH red e os citocromo b5 que participam na transferência de equivalentes redutores para as diferentes formas isoenzimáticas expressas nos rins, assim como a inibição das subfamílias que participam em reacções de desalquilação, como, por exemplo, a CYP1A1 e a CYP1A2, mostram que o isotretinólio poderá ter afectado acentuadamente algumas reacções da primeira fase de biotransformação dos rins de ratos machos adultos. No entanto, a indução monofuncional das reacções de conjugação que observámos nos animais tratados com isotretinólio parece ter um efeito protector do tecido, uma vez que estimula as vias de desintoxicação de químicos potencialmente cancerígenos como é sugerido por Buetler (1995).

Os resultados que obtivemos com as fracções subcelulares do tecido renal foram de difícil interpretação, pelo que algumas das hipóteses formuladas necessitam ainda de ser melhor esclarecidas através de ensaios complementares utilizando ou desenvolvendo técnicas de identificação e quantificação isoenzimática mais específicas, como a análise imunológica ou RT-PCR.

#### 5.4. Influência da idade e do tratamento com isoproturão nos testículos de ratos machos Wistar

Os testículos são um órgão com actividade metabólica muito intensa, por serem o local onde se dá a espermatogénese (Miller *et al.*, 1987, Creasy e Foster, 1991). A informação disponível na literatura acerca da sua participação em processos de activação metabólica ou de desintoxicação, assim como sobre os constituintes moleculares e/ou mecanismos reguladores envolvidos nesses processos é, por vezes, escassa.

A participação do sistema citocromo P450 na biossíntese de esteróides endógenos encontra-se bem descrita na literatura (Miller *et al.*, 1987, Creasy e Foster, 1991). Evitamos discuti-la aqui pois não constituiu objecto de estudo neste trabalho. No entanto, alguns investigadores admitem como provável que as famílias isoenzimáticas envolvidas nos processos biossintéticos possam, igualmente, ser capazes de participar na biotransformação de xenobióticos e/ou da testosterona, levando à formação de metabolitos que podem, por um lado, ser facilmente excretados ou, por outro, serem capazes de desencadear processos toxicológicos (DiBiasio, 1991).

A indução dos citocromo P450 nos testículos por indutores convencionais como o fenobarbital é difícil (Creasy e Foster, 1991, DiBiasio, 1991). No entanto, o tratamento com indutores endógenos como a LH afectam as actividades enzimáticas dependentes dos citocromo P450 dos testículos (DiBiasio, 1991). Por esse motivo, somos levados a admitir que interacções hormonais semelhantes às observadas no fígado ou rins podem modelar a biotransformação testicular de compostos exógenos ou da testosterona neste órgão. Alguns autores detectaram a presença das actividades enzimáticas NADPHred, ECOD e EROD, mediadas pelo sistema citocromo P450 em ratos e murganhos. No

entanto, os valores determinados foram em geral muito inferiores aos do tecido hepático (Aitio, 1978, Sipes e Gandolfi, 1991, Jeffrey, 1991).

O desenvolvimento de barreiras fisiológicas deste tipo estão associadas à protecção do genoma contra danos oxidativos durante a espermatogénese (Creasy e Foster, 1991). Este tipo de protecção justifica também a concentração extremamente elevada do glutatióno, assim como os valores igualmente elevados das actividades catalíticas glutatióno *S*-transferase e glutatióno redutase determinados por vários autores na fracção microsomal e no citosol testicular (Dibiasio, *et al.*, 1991, Gandy, 1996). Este facto sugere que as reacções de conjugação de compostos electrófilos endógenos ou exógenos, assim como de espécies de oxigénio reactivas com o glutatióno GSH, poderão assumir, neste órgão, um papel extremamente importante na biotransformação de xenobióticos ou de intermediários metabólicos reactivos, tornando-os biologicamente inactivos e aquosolúveis e, portanto, facilmente excretáveis (Aitio, 1978, Creasy e Foster, 1991, Dibiasio, *et al.*, 1991).

A determinação das actividades enzimáticas catalíticas mGST e cGST foi, por esse motivo, mais fácil nos testículos do que nos rins ou timo, uma vez que a sua ordem de grandeza nos testículos foi semelhante ou até superior à do tecido hepático, como é referido por Gandy (1996).

O facto de a metabolização de xenobióticos pelos testículos não estar tão bem documentada como para o fígado ou até para os rins incentivou-nos a prosseguir o estudo sobre a influência da idade e do isoproturão na capacidade de metabolização de xenobióticos e da testosterona por este órgão, apesar de algumas dificuldades que sentimos na optimização dos protocolos experimentais, nomeadamente ao nível da quantidade de tecido disponível, em particular nos ratos mais jovens, assim como na



quantificação de constituintes endógenos ou dos produtos formados pelos sistemas de biotransformação que abordámos. A própria análise dos resultados foi menos rica do que a efectuada para o tecido hepático pois fomos obrigados a trabalhar com “pools” de tecido resultantes da contribuição de cada grupo de cinco ratos por o material disponível em cada animal não ter sido suficiente para a realização da totalidade dos ensaios.

O peso húmido dos testículos, a relação peso húmido/peso do corpo registados às 7 e às 12 semanas de vida são, como esperávamos, semelhantes aos valores tabelados para ratos machos Wistar pubertais e sexualmente maduros, respectivamente (Utsuyama e Hirokawa, 1989, Wainforth e Flecknell, 1992).

Os resultados obtidos com a fracção microssomal dos testículos de ratos machos Wistar, estão de acordo com o que é descrito na literatura, permitindo-nos confirmar, neste órgão, a presença de alguns constituintes e a manifestação de algumas actividades enzimáticas características do sistema citocromo P450. Assim, os valores obtidos para a concentração de citocromo P450 e de hemo, assim como para as actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, 6 $\beta$ -T-OH e 16 $\alpha$ -T-OH, foram, de facto, bastante inferiores aos determinados no tecido hepático (Aitio, 1978, Sipes e Gandolfi, 1991, Jeffrey, 1991).

Contudo, não conseguimos detectar a presença de citocromo b5 nem as actividades enzimáticas etilmorfina *N*-desmetilase, 11 $\beta$ - e 2 $\alpha$ -T-OH em qualquer das idades estudadas, mesmo quando realizámos ensaios com amostras de fracção microssomal com concentração proteica superior à do fígado ou rins, pelo que somos levados a admitir que, nos testículos, os genes *CYP11B1*, *CYP2C11*, *CYP2D1*, *CYP3A1* e *CYP3A2* não estavam expressos constitutiva ou indutivamente ou estavam-no, em quantidade não mensurável pelos métodos que utilizámos.

A interpretação dos resultados que obtivemos torna-se, portanto, um pouco mais difícil de fazer do que para o tecido hepático, ou até para o tecido renal, pois, na maior parte dos casos, não encontramos trabalhos onde seja descrita uma correspondência entre as actividades enzimáticas e as famílias ou subfamílias isomorfas que lhes estejam associadas.

No entanto, admitimos como provável que, neste tecido, os isoenzimas codificados pelos *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B1* e *CYP2B2* participem na *O*-desetilação da 7-etoxicumarina e 7-etoxiresorufina, como acontece no fígado, embora também não possamos excluir a hipótese de outras formas isoenzimáticas ainda não identificadas poderem participar neste tipo de reacções. Por outro lado, somos igualmente levados a supor que a 16 $\alpha$ -hidroxilação da testosterona pode resultar da participação dos isoenzimas codificados pelos *CYP2B1* e *CYP2B2*, como admitimos para o tecido renal, uma vez que não detectámos de novo a actividade 2 $\alpha$ -T-OH neste tecido. Uma razão semelhante leva-nos também a supor que a 6 $\beta$ -hidroxilação da testosterona poderá resultar da participação do isoenzima codificado pelos *CYP3A2* e *CYP21*, constitutivamente expressos nos rins, uma vez que também não detectámos, na fracção microsomal dos testículos a actividade END, característica da subfamília *CYP3A1* hepática. Esta tentativa de interpretação dos resultados poderá até ser abusiva e carece de confirmação mais detalhada, pelo que em trabalhos futuros tornar-se-à necessária a detecção e quantificação, por análise imunoquímica e/ou por RT-PCR, de cada subfamília ou família isoenzimática expressa neste tecido.

A análise primária dos resultados mostra-nos também que os valores determinados para as actividades mGST e cGST possuem uma ordem de grandeza idêntica à do tecido hepático, mas a actividade enzimática GR, apresentou em alguns

casos, valores superiores aos do fígado. A presença de enzimas antioxidantes tão activos nos testículos parece pois, confirmar a hipótese que há pouco descrevemos nesta secção sobre a existência de um mecanismo molecular endógeno para defesa do genoma, implicitamente relacionado com o facto de os testículos serem o local onde ocorre a espermatogénese.

A continuação deste trabalho exige uma aproximação mais detalhada que permita identificar as famílias e as subunidades glutathione *S*-transferase envolvidas no processo, assim como o esclarecimento dos mecanismos reguladores ou indutivos do mesmo, recorrendo a protocolos experimentais semelhantes aos que propomos realizar para a identificação dos isoenzimas do sistema citocromo P450.

Os resultados que obtivemos com a fracção microsomal e o citosol testicular dos ratos controlo de cada idade mostram-nos, ainda, que ocorreu um aumento da concentração de proteínas microsomais, citocromo P450 e hemo, assim como das actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, mGST e cGST entre as 7 e as 12 semanas de vida.

Se o perfil de expressão constitutiva das diferentes subfamílias de citocromo P450, for semelhante ao que propusemos no início desta secção, poderemos admitir que ocorreu um aumento da expressão constitutiva da subfamília CYP1A1 e/ou CYP1A2 entre as 7 e as 12 semanas de idade traduzido pelo aumento das actividades catalíticas ECOD e EROD.

Como a actividade catalítica 16 $\alpha$ -T-OH não sofreu qualquer variação no mesmo período etário, somos levados a considerar que em ratos machos Wistar que não foram submetidos a qualquer tratamento indutivo, como aconteceu com os ratos controlo de cada idade, esta actividade enzimática, pode ser mediada pelas subfamílias CYP2B1 e

CYP2B2. O facto de actividade enzimática  $6\beta$ -T-OH, não ter variado entre as 7 e as 12 semanas de idade sugere que entre a puberdade e a fase de adulto jovem, também não ocorreu um aumento da expressão constitutiva das subfamílias CYP3A2 ou CYP21 dos testículos. Estes resultados apontam para uma evolução positiva do sistema citocromo P450 constitutivos, na resposta a xenobióticos, e uma minimização do papel dos testículos no catabolismo da testosterona, uma função que parece mais desenvolvida no fígado.

É provável que famílias isoenzimáticas de citocromos P450 diferentes das que aqui descrevemos possam estar envolvidas no processo, pelo que em estudos futuros, à semelhança do que propusemos para o fígado e os rins, deverão ser efectuadas análises imunológicas e por RT-PCR que permitam um melhor esclarecimento acerca das famílias e subfamílias isoenzimáticas envolvidas no processo.

O aumento da actividade catalítica NADPH (P450) redutase parece ser uma resposta adaptativa à evolução positiva da expressão constitutiva de alguns isoenzimas P450 no sentido de dinamizar o fluxo de equivalentes redutores no sistema, optimizando a sua resposta.

O aumento das actividades enzimáticas do citosol que participam na conjugação de substratos electrófilos com o glutathione, que ocorreu entre a puberdade e a fase de adulto jovem, também nos parece uma resposta concertada com a evolução positiva de alguns constituintes do sistema citocromo P450 tendo em vista facilitar a excreção de eventuais intermediários metabólicos, produzidos pelas reacções da primeira fase de biotransformação. Esta evolução positiva com a maturação sexual dos animais exprime igualmente um reforço da resposta antioxidante do tecido testicular descrita para os enzimas do citosol por Gandy (1996) e que poderá ser controlada pelo eixo hipotálamo-

hipófise-gónadas-timo. Parece-nos, pois, que as variações observadas confirmam mais uma vez o papel dos sistema de biotransformação de xenobióticos na protecção do genoma de ataques deletérios durante a espermatogénese (Jeffrey, 1991; Sipes, e Gandolfi, 1991, Gandy, 1996).

O tratamento com o isoproturão não afectou significativamente o peso dos testículos, nem a sua relação com o peso do corpo, pelo que recorremos à abordagem molecular para aflorar a influência do tratamento com isoproturão nos testículos de ratos machos Wistar.

Quando avaliámos a influência do xenobiótico sobre a maior parte dos componentes dos sistemas de biotransformação de xenobióticos e esteróides endógenos que elegemos para estudo, observámos que a resposta foi semelhante em qualquer das idades escolhidas. Este facto traduziu-se, por um lado, num aumento da concentração total de citocromo P450, de hemo e de proteínas do citosol, assim como das actividades ECOD e EROD e, por outro, num decréscimo da concentração proteica microsomal das actividades NADPHred, mGST e cGST.

Constituem excepções a actividade catalítica  $6\beta$ -T-OH microsomal, que em ratos pubertais não foi afectada pelo tratamento, mas que aumentou nos testículos de ratos adultos injectados com a dose de 9 mg/Kg, e a actividade  $16\alpha$ -T-OH, que diminuiu nos ratos pubertais tratados com isoproturão e não foi afectada pelo tratamento em ratos adultos.

Se tomarmos como hipótese fiável o perfil de concentração e de actividades enzimáticas que descrevemos ao longo desta secção para os testículos de ratos machos Wistar, parece-nos razoável admitir que poderá ter ocorrido em qualquer das idades estudadas a indução da expressão dos genes *CYP1A1* e *CYP1A2*, traduzida pelo aumento

das actividades ECOD e EROD, isoenzimas muitas vezes associados à bioactivação metabólica das arilaminas, nitrosaminas e aflotoxinas e cujo mecanismo regulador da expressão genética, envolve a participação de receptores do tipo “Ah”.

O efeito que acabamos de descrever parece-nos de grande importância do ponto de vista toxicológico devido ao facto de ter ocorrido, em simultâneo, um decréscimo acentuado das actividades enzimáticas mGST e cGST que parece contribuir para aumentar o risco de bioactivação de compostos pró-cancerígenos nos testículos e inibe as actividades enzimáticas que participam em reacções de conjugação com o glutathione que os tornaria mais facilmente excretáveis.

De facto bastaria a inibição da resposta dos enzimas antioxidantes observada em qualquer das idades, para que o sistema de defesa do tecido a agressões do genoma durante a espermatogénese pudesse ter sido seriamente afectado.

A diminuição da actividade enzimática  $16\alpha$ -T-OH nos animais injectados com o isoproturão poderá estar relacionada com a diminuição da actividade catalítica NADPHred e conseqüente redução do fluxo de equivalentes redutores para os CYP2B1 e CYP2B2, um processo que poderá ter afectado o débil metabolismo de excreção da testosterona nos testículos.

Os resultados que obtivemos para os testículos, são preocupantes, pois é provável que o isoproturão mesmo em doses tão baixas como as que estudámos possa afectar seriamente a produção de espermatozóides e induzir infertilidade masculina e/ou mutações que possam ser responsabilizadas por malformações fetais.

A continuação deste trabalho merece, por isso, que sejam efectuados estudos complementares que permitam avaliar do ponto de vista quantitativo e qualitativo a influência do isoproturão na espermatogénese de ratos machos Wistar.

## 5.5. Influência da idade e do tratamento com isoproturão no timo de ratos machos Wistar

A natureza dinâmica do sistema imunitário torna-o muito vulnerável à influência dos xenobióticos que circulam no ambiente. O timo, como órgão chave da imunidade, não está de modo algum isento da influência desse tipo de compostos pois, para além de ser o local onde se dá a diferenciação celular dos linfócitos T, desempenha funções importantes ao nível do sistema neuro-endócrino dos mamíferos, participando inclusivamente na modelação dos sistemas de biotransformação hepático dos xenobióticos (Rebar *et al.*, 1981, Fabris *et al.*, 1983, Hall *et al.*, 1985, Geenen *et al.*, 1989, Park *et al.*, 1994, Hirokawa *et al.*, 1994).

O timo é um órgão linfoepiteliais de cor esbranquiçada, localizado no tórax dos ratos machos Wistar, perto do coração. É constituído por dois lóbulos independentes, ligados entre si por tecido conjuntivo que, ao estenderem-se pelo interior do órgão, o dividem em pequenos lóbulos com uma arquitectura semelhante, na qual se podem distinguir facilmente duas zonas características, uma mais externa, mesenquimatosa, com grande quantidade de linfócitos - o córtex - e outra, mais rica em células epiteliais, que se supõe serem de origem endodérmica - a medula - (Kendal, 1988, Schuurman, 1991).

Os linfócitos localizados no timo, também designados por timócitos, são células esféricas com núcleos volumosos ricos em nucleoproteínas, mas com retículo endoplasmático e citoplasma basófilo pequeno e ribossomas livres. Os timócitos são menores do que outros linfócitos e tornam-se ainda mais pequenos durante o processo de maturação, no qual se sobrecarregam com histonas e DNA (Schuurman, H.-J., 1991).

As células epiteliais possuem núcleos grandes, bastantes nucléolos, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático bem desenvolvido, alguns mitocôndrios e citoplasma eosinófilo.

Os constituintes estruturais do órgão são relativamente resistentes aos efeitos produzidos pelos tóxicos ambientais, uma vez que servem de suporte aos processos de activação, proliferação e diferenciação celular que nele ocorrem (Schuurman, H.-J., 1988 1991).

Os efeitos tóxicos podem manifestar-se no tecido tímico, afectando, por um lado, a função de suporte dos constituintes estruturais ao nível da secreção de mediadores metabólicos activos e da interacção célula-célula (Rosenthal, G.J., 1989) ou, por outro lado, afectando os constituintes dinâmicos, como os linfócitos e os macrófagos, ao nível da replicação, transcrição e tradução genética. Por esse motivo, o primeiro sinal de toxicidade corresponde ao desaparecimento de células linfóides do sangue e de outros tecidos. Os constituintes estruturais do timo respondem muitas vezes a este decréscimo celular com atrofia terminal e fibrose, embora por vezes possa manifestar-se persistência celular, mas com inibição funcional (Luster *et al.*, 1989, Schuurman, H.-J., 1991).

Os resultados que obtivemos com o timo dos ratos machos Wistar mostram que o órgão involuiu entre as 7 e as 12 semanas de idade, pois o peso do órgão dos ratos machos adultos era aproximadamente igual ao dos ratos com 7 semanas de vida e, como é óbvio, a sua relação com o peso do corpo diminuiu durante a maturação sexual, de acordo como o que vem descrito em Baker *et al.* (1980), Utsuyama e Hirokawa (1989), Waynforth e Flecknell (1992) e Hirokawa *et al.* (1994).

Os ensaios realizados com a fracção microsomal e o citosol tímicos permitiram-nos detectar a presença de citocromos P450, assim como a manifestação das actividades



enzimáticas ECOD, EROD, mGST, cGST e GR, embora os valores de concentração e das actividades enzimáticas que determinámos em ambas as idades apresentassem valores inferiores aos obtidos com o tecido hepático. No entanto, não conseguimos detectar a presença de citocromos b5 nem a manifestação das actividades enzimáticas etilmorfina *N*-desmetilase, 6 $\beta$ -, 16 $\alpha$ -, 11 $\beta$ - e 2 $\alpha$ -T-OH, em qualquer das idades estudadas, mesmo quando utilizámos amostras da fracção microssomal com concentração proteica elevada, pelo que somos levados a supor que os produtos dos genes *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP2C11*, *CYP2C23*, *CYP2D1*, *CYP3A1*, *CYP3A2*, *CYP11B1* e *CYP21* não estavam expressos no tecido tímico ou existiam em quantidades tão ínfimas que a sensibilidade dos métodos utilizados não foi suficiente para os detectar no período etário que elegemos para este trabalho.

A presença das actividades ECOD e EROD na fracção microssomal tímica sugere ainda que os isoenzimas codificados pelos genes *CYP1A1* e/ou *CYP1A2* poderiam estar expressos no timo, embora não possamos excluir a hipótese de outras famílias isoenzimáticas desconhecidas poderem estar também presentes. Mais uma vez, as diferenças qualitativas e quantitativas observadas na composição do sistema citocromo P450 e dos enzimas glutathione *S*-transferase e glutathione redutase estão de acordo com a literatura, nomeadamente no que diz respeito à presença de citocromo P450 e à manifestação das actividades enzimáticas ECOD e EROD no timo de ratos machos Wistar (Jeffrey, 1991; Sipes e Gandolfi, 1991).

O aumento acentuado da concentração de proteínas, de citocromo P450 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas ECOD, EROD e mGST do timo que observámos nos ratos controlo entre as 7 e as 12 semanas de idade, sugerem-nos que factores endógenos como a acção hormonal, regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-

gónadas-timo, poderão estar envolvidos no aumento da expressão dos genes *CYP1A1* e/ou *CYP1A2*, inzoenzias cujo mecanismo regulador da expressão genética hepática e renal, envolve a participação de receptores “Ah”.

A activação de alguns constituintes do sistema citocromo P450, acompanhado pelo conseqüente ambiente oxidante gerado no meio celular, poderão em parte sugerir que entre a puberdade e a fase de adulto jovem o factor idade pode contribuir para um aumento da capacidade do tecido tímico para participar em reacções de desalquilação de xenobióticos.

A indução da actividade enzimática mGST tímica, que também observámos no mesmo período etário, poderá constituir uma resposta timo-protectora do “burst” oxidativo que algumas células de localização temporária, como os macrófagos, são capazes de desencadear, gerando no meio celular uma quantidade elevada de espécies reactivas de oxigénio, uma propriedade que utilizam na vigilância antitumoral e no combate a microrganismos (Flescher *et al.*, 1984, Chung e Kim , 1988, Park *et al.*, 1994).

O decréscimo da actividade catalítica cGST com a maturação sexual, assim como a ausência de variação da actividade enzimática GR, no mesmo período etário, mostram, numa primeira aproximação, que o tecido tímico de ratos machos adultos possui menos capacidade para participar na conjugação de xenobióticos ou de seus derivados gerados pelo sistema P450 do que o tecido tímico de ratos pubertais. Tal facto poderá ser regulado hormonalmente pelo eixo hipotálamo-gónadas-timo e por esse motivo poderá estar relacionado com a involução do próprio órgão.

A continuação deste trabalho exige, pois, que seja feita a identificação das famílias isoenzimáticas citocromo P450 e das subunidades glutathione *S*-transferase do

citossol, expressas constitutivamente no tecido tímico, tendo em vista, esclarecer o(s) mecanismo(s) tímico(s) regulador(es) que estejam envolvidos na expressão genética destas proteínas, assim como a sua própria evolução com a idade.

Os timócitos são particularmente sensíveis à acção de xenobióticos, pelo que a sua diminuição de tamanho e a consequente involução do órgão, poderão ser um indicador primário de toxicidade. A capacidade de resposta do timo a compostos exógenos e a extensão dos danos que lhe sejam provocados dependem do estado nutricional e da idade do animal. Dado que, no rato, a função que o timo desempenha como local de diferenciação e armazenamento de linfócitos T atinge o seu máximo na puberdade e sofre um declínio acentuado desde essa fase do desenvolvimento até atingir a maturação sexual, a sua sensibilidade aos xenobióticos e os efeitos consequentes sobre a resposta imunitária mediada por células assumem, nesse período da vida, uma importância particular (McConkey e Orrenius, 1989, Semialowcz *et al.*, 1989, Schuurman, 1991).

A natureza dinâmica do sistema imunitário e, em particular, do tecido tímico confere-lhe capacidade regenerativa para reparar, em curto espaço de tempo, os danos provocados por muitos xenobióticos. No entanto, a literatura apresenta cada vez mais exemplos de compostos como a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (Poland e Knutson, 1982, McConkey e Orrenius, 1989), o hexaclorobenzeno (Vos, 1986), os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos não halogenados (Semialowcz *et al.*, 1989) e as hormonas esteróides (Ansar Ahmed *et al.*, 1985) que agredem o tecido tímico irreversivelmente.

Por exemplo, alguns trabalhos têm revelado que a indução provocada por hidrocarbonetos aromáticos halogenados e não halogenados policíclicos envolve a participação de receptores "Ah", enquanto que a indução provocada por hormonas

esteróides e estrogénios envolve outros receptores que, muito provavelmente, poderão ser do tipo “PB” ou “SRX” (Schuurman, H.-J., 1991).

Os efeitos tóxicos sobre o tecido tímico nem sempre desencadeiam degeneração e morte celular. Por vezes, desencadeiam hiperplasia e neoplasia do tecido (Schuurman, 1991).

Os hidrocarbonetos aromáticos halogenados policíclicos são bons exemplos de imunotoxinas ambientais. Por exemplo, o TCDD provoca a involução tímica e um decréscimo da resposta imunitária celular, uma situação em que a causa da atrofia tímica não pôde ser atribuída às hormonas esteróides, pois a adrenalectomia e a hipofisectomia não anularam o efeito produzido pelo xenobiótico (Poland e Knutson, 1982, McConkey e Orrenius, 1989, Schuurman, 1991).

O facto de o tratamento com isotretinona não ter afectado significativamente o peso do timo, nem a relação peso do órgão/peso do corpo, nas duas fases do desenvolvimento escolhidas para este trabalho, leva-nos a admitir que, ao nível do órgão inteiro, o tratamento com o xenobiótico não provocou efeitos indicadores de toxicidade. Por isso, só a abordagem molecular poderá conduzir a um melhor esclarecimento da acção do isotretinona sobre o timo de ratos machos Wistar.

Os resultados obtidos com a fracção microsomal e o citosol tímico mostraram que o isotretinona induziu perfis de concentração e de actividades enzimáticas diferentes para cada uma das idades escolhidas neste estudo.

O tratamento com o xenobiótico provocou nos ratos pubertais um aumento da concentração de proteínas microsomais, de citocromo P450 e de hemo, assim como o das actividades enzimáticas ECOD e EROD, efeito este semelhante ao provocado pelo

TCDD em células epiteliais do cortex e em linfócitos do timo e que os autores associaram à inibição do crescimento e da diferenciação celular (Schuurman, 1991).

Os resultados obtidos com os ratos de 7 semanas de idade mostraram-nos ainda que ocorreu um decréscimo da actividade NADPHred nos animais injectados com as duas doses mais baixas, efeito para o qual não encontramos uma interpretação adequada.

A indução das actividades enzimáticas anti-oxidantes mGST e GR poderão corresponder a uma resposta timo-protectora contra os ataques de espécies radiculares de oxigénio, eventualmente geradas pelos citocromos P450 que participam em reacções de desalquilação, nas quais poderão participar as formas isoenzimáticas codificados pelos genes *CYP1A1* e *CYP1A2*.

Neste contexto, o decréscimo acentuado da actividade cGST só pode ser explicado, se admitirmos que os mecanismos reguladores da expressão genética das subunidades que constituem os enzimas cGST são diferentes daqueles que estiveram envolvidos na indução dos *CYP1A1* e *CYP1A2* que, como já referimos, é mediada no fígado e rins por receptores do tipo "Ah" (Oinonen e Lindros, 1998, Lohr *et al.*, 1998).

Este tipo de resposta tem significado toxicológico, pois pode levar à acumulação de xenobioticos ou dos seus derivados no tecido tímico podendo inviabilizar o seu funcionamento num período tão crítico do desenvolvimento animal.

No entanto, tal como nos rins e nos testículos, os resultados que dispomos não são suficientes para fundamentar *per se*, esta interpretação e, como tal, carecem de confirmação experimental. Para tal, necessitaremos de utilizar métodos mais específicos de detecção e quantificação das formas isoenzimáticas que aqui referimos, assim como proceder ao doseamento de peróxidos e de outras actividades catalíticas anti-oxidantes que já propusemos para outros órgãos.

O tratamento dos ratos adultos com isoproterurão provocou uma diminuição da concentração de citocromo P450 e de hemo, nos animais injectados com a dose de 9 mg/Kg, e da actividade ECOD, em todos os animais em que foi administrado o xenobiótico. Além disso, provocou um aumento das actividades NADPHred e EROD nos animais injectados com as doses mais elevadas.

Estes resultados sugerem que, no tecido tímico, a actividade EROD poderá ser mediada por isoenzima(s) citocromo P450, diferente(s) daquele(s) que catalisam a *O*-desetilação da etoxicumarina.

Os resultados mostram-nos ainda que ocorreu um efeito concertado entre a indução das actividades enzimáticas NADPHred, ECOD e cGST, provavelmente através de um mecanismo regulador da expressão genética comum.

Contudo, não conseguimos compreender a diminuição da actividade enzimática mGST que observámos em qualquer dos grupos com 12 semanas de idade tratados com isoproterurão, tanto mais que ocorreu uma aumento de actividade GR. É provável que o isoproterurão tenha também exercido o seu efeito ao nível do mecanismo regulador da expressão genética das subunidades constituintes dos enzimas mGST por um processo semelhante ao dos isoenzimas que participam na *O*-desetilação da 7-etoxiresorufina. O esclarecimento destas dúvidas passa, como já referimos, pela detecção e quantificação de isoenzimas no tecido tímico semelhantes às que propusemos para os tecidos hepático, renal e testicular, ou seja por análise imunoquímica ou por RT-PCR.



## **6. Conclusões**





Os resultados que discutimos no capítulo anterior, permitem-nos tirar algumas conclusões que passamos a enunciar.

O isoproturão não afectou os marcadores de crescimento e de toxicidade ao nível do animal inteiro e dos órgãos, mas provocou alterações mensuráveis ao nível molecular.

A distribuição dos constituintes e das actividades catalíticas dos sistemas de biotransformação de xenobióticos que estudámos diferiu, qualitativa e quantitativamente, de órgão para órgão. A presença de citocromos P450 e de hemo, assim como a manifestação das actividades enzimáticas NADPHred, ECOD, EROD, mGST, cGST e GR foram detectadas no fígado, rins, testículos e timo, mas os valores determinados nos tecidos extra-hepáticos, exceptuando as actividades enzimáticas mGST cGST e GR dos testículos, foram sempre inferiores aos do fígado. Além disso, as actividades enzimáticas  $6\beta$ - e  $16\alpha$ -T-OH só foram detectadas no fígado, rins e testículos, enquanto que a presença de citocromos b5 foi detectada no fígado e rins e as actividades enzimáticas END,  $11\beta$ -,  $2\alpha$ -T-OH só foram detectadas no fígado.

Os ratos adultos jovens aparentam possuir, ao nível dos tecidos hepático, renal, testicular e tímico, uma capacidade superior à dos ratos pubertais para a metabolização de xenobióticos, como foi evidenciado pelo aumento, com a idade, da concentração total de citocromo P450 e de hemo, assim como das actividades enzimáticas NADPHred, no fígado, testículos e timo; ECOD, no fígado, rins e timo; EROD, nos quatro tecidos referidos; mGST no fígado testículos e timo; cGST no fígado e testículos; e END no fígado.

Os ratos adultos jovens aparentam, igualmente, possuir ao nível do tecido hepático uma capacidade superior à dos ratos pubertais para a biotransformação de esteróides endógenos, como foi evidenciado pelo aumento, com a idade, das actividades

enzimáticas  $6\beta$ -,  $16\alpha$ -,  $11\beta$ - e  $2\alpha$ -testosterona hidroxilase do fígado, evolução contrariada nos rins e nos testículos, onde as actividades catalíticas  $6\beta$ - e  $16\alpha$ -testosterona hidroxilase diminuíram, no primeiro caso, e não sofreram qualquer alteração, no segundo.

Os perfis de concentração e de actividade enzimática que obtivemos para os constituintes do sistema citocromo P450, enzimas GST e GR de ratos machos Wistar, pubertais e adultos, mostram que a resposta ao isoproterão foi diferente em cada um desses órgãos e dependente do estágio de desenvolvimento em que foi administrado, com excepção da actividade enzimática NADPHred que diminuiu sempre, excepto no timo dos ratos adultos, no qual aumentou na sequência do tratamento.

No tecido hepático de ratos pubertais, o tratamento com isoproterão exerceu uma inibição das reacções de desalquilação de xenobióticos mediadas maioritariamente pelos isoenzimas CYP1A2, CYP2B1 e CYP2B2 e das reacções de  $16\alpha$ -hidroxilação da testosterona, mediada maioritariamente pelos isoenzimas CYP2B1 e CYP2B2. Além disso, inibiu as reacções de conjugação mediadas pelos enzimas cGST e as reacções de redução do glutathione mediadas pelos enzimas GR. No entanto, não afectou a maior parte das reacções de hidroxilação de esteróides, como as de formação de  $2\alpha$ -T-OH,  $6\beta$ -T-OH e  $11\beta$ -T-OH, mediadas maioritariamente pelos CYP2C11, CYP3A1, CYP3A2 e CYP11B1, respectivamente.

Podemos, assim, inferir que o tratamento com isoproterão parece ter inibido maioritariamente as reacções catalisadas pelas subfamílias isoenzimáticas cujo mecanismo regulador da expressão genética envolve receptores do tipo "Ah" e "PB" como acontece, no primeiro caso, com o CYP1A2 e a maior parte dos isoenzimas cGST, e, no segundo caso, com os CYP2B1 e CYP2B2.

O perfil de resposta ao isoproturão que obtivemos em ratos pubertais prefigura uma situação de risco elevado, pois, aponta para uma minimização da capacidade de metabolização de xenobióticos pelo tecido hepático, afectando em particular a biotransformação hepática de misturas onde o isoproturão esteja presente.

Em ratos adultos, o tratamento com isoproturão provocou, no fígado, a indução de reacções de desalquilação de xenobióticos mediadas maioritariamente pelos CYP1A1 e CYP1A2, das reacções de conjugação mediadas pelos enzimas cGST e da reacção de redução do glutatióno mediada pelos enzimas GR, mas inibiu a maior parte das reacções de hidroxilação de esteróides mediadas pelos CYP2C11, CYP2B1, CYP2B2, CYP3A1, CYP3A2 e CYP 11B1 e as reacções de conjugação mediadas pelos enzimas mGST. Este perfil de resposta aponta para a activação bifuncional de uma via que envolve a desalquilação do isoproturão, mediada por citocromos P450, e a conjugação dos derivados metabólicos entretanto formados com o glutatióno, mediada pelos enzimas cGST, resposta esta que foi considerada por Buetler (1995) como hepatoprotectora. No entanto, a perturbação que o tratamento com isoproturão exerceu ao nível das reacções de biotransformação da testosterona pode originar alterações funcionais de natureza toxicológica, sobre o organismo em geral e o fígado em particular com consequências imprevisíveis.

No tecido renal de ratos pubertais, o tratamento com isoproturão exerceu um efeito inibitório moderado sobre reacções de desalquilação de compostos exógenos, catalisadas maioritariamente pelos CYP1A1 e CYP1A2. Além disso também inibiu as reacções de conjugação com o glutatióno catalisadas pelos isoenzimas cGST, correspondendo a um efeito modelador bifuncional negativo que parece ter incidido sobre famílias isoenzimáticas cujo mecanismo regulador da sua expressão genética,

envolve a participação de receptores do tipo “Ah”. Tal como no fígado, este tipo de resposta pode potenciar o risco de toxicidade de misturas químicas onde o isoproturão esteja incluído. As reacções de hidroxilação da testosterona, catalisadas maioritariamente pelos CYP2B1, CYP2B2, CYP3A2 e CYP21, subfamílias isoenzimáticas cujo mecanismo regulador da expressão genética parece envolver a participação de receptores do tipo “PB” e “SRX”, foram igualmente inibidas pelo tratamento com isoproturão o qual, surpreendentemente, induziu um aumento das actividades catalíticas mGST e GR, eventualmente como resposta a um possível aumento da concentração de espécies radicalares de oxigénio.

No tecido renal de ratos adultos, o tratamento com isoproturão inibiu as reacções de desalquilação mediadas maioritariamente pelos citocromos CYP1A1 e CYP1A2. No entanto, o xenobiótico induziu reacções de conjugação com o glutatióno, mediadas pelos isoenzimas mGST e cGST, e reacções de redução do glutatióno mediadas pelas enzimas GR. Além disso, induziu ainda as reacções de hidroxilação da testosterona mediadas maioritariamente pelos CYP2B1, CYP2B2, CYP3A2 e CYP21. Este tipo de resposta pode ser considerada como protectora do tecido renal, uma vez que facilita a biotransformação de derivados metabólicos e de esteróides endógenos que eventualmente cheguem aos rins provenientes, por exemplo, do tecido hepático.

Nos testículos, em qualquer das idades, o tratamento com isoproturão exerceu, um efeito indutor das reacções de desalquilação de xenobióticos, eventualmente catalisadas pelas isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2, mas inibiu as reacções de conjugação com o glutatióno catalisadas pelas isoenzimas mGST e cGST, efeito este que poderá levar à acumulação nos testículos de subprodutos reactivos gerados pelo sistema citocromo P450. Parece-nos, pois, que pequenas quantidades de isoproturão poderão

influenciar a quantidade e a viabilidade dos espermatozoides produzidos pelos testículos de ratos machos Wistar. Por esse motivo, estes resultados poderão, de certo modo, contribuir para explicar as aberrações cromossomais que, em 1990, Behera *et al.* detectaram em células germinais de murganhos após administração de isoproturão em doses diárias que variaram entre 100-200 mg/Kg/dia durante cinco dias.

No tecido tímico de ratos pubertais, o tratamento com o isoproturão exerceu um efeito activador das reacções de desalquilação de xenobióticos, eventualmente catalisadas pelos CYP1A1 e CYP1A2, mas inibiu as reacções de conjugação de substratos electófilos com o glutationo catalisadas pelos enzimas cGST, uma via importante de eliminação de xenobióticos. Este tipo de resposta tem significado toxicológico, apesar da indução das actividades catalíticas antioxidantes mGST e GR, dado que ocorre numa fase crítica da formação da resposta imunitária, podendo levar à produção e acumulação no timo de derivados metabólicos do isoproturão ou de outros constituintes de misturas em que ele esteja incluído que inviabilizam o funcionamento normal do órgão.

O isoproturão parece ter-se comportado no tecido tímico de ratos adultos como um indutor bifuncional das actividades enzimáticas EROD e cGST, assistidas pela actividade catalítica NADPHred, promovendo uma via timo-protectora de eliminação do composto. A discrepância dos resultados que observámos sobre o efeito do isoproturão nas actividades enzimáticas EROD e ECOD tímicas sugerem, ainda, que as reacções de *O*-destilação da etoxicumarina e da etoxiresorufina no timo poderão ser catalisadas por famílias isoenzimáticas distintas.

Face ao exposto, poderemos inferir que o risco de toxicidade sobre o fígado e rins é elevado durante a puberdade, devidopor um lado, à inibição das reacções

catalisadas maioritariamente pelos CYP1A1 dos rins, e pelos CYP1A2, CYP2B1 e CYP2B2 do fígado e, por outro lado, devido à inibição em ambos os tecidos das reacções de conjugação catalisadas pelos enzimas cGST. O risco de toxicidade provocada pelo isoproturão sobre o timo parece igualmente elevado durante a puberdade, uma vez que a indução das reacções eventualmente catalisadas pelos CYP1A1 e CYP1A2 não foram seguidas pela indução dos enzimas cGST

A indução bifuncional dos enzima cGST no fígado e no timo, e a indução monofuncional nos rins de ratos machos Wistar adultos, parece-nos constituir uma resposta protectora desses tecidos, sugerindo que o fígado, rins e timo de ratos adultos possuem uma melhor capacidade de resposta ao isoproturão, eliminando-o possivelmente sob a forma de ácidos mercaptúricos, após perda de um grupo metilo e conjugação desse derivado com o glutationo, ou após conjugação directa do xenobiótico com o tripéptido.

Contudo, o risco de toxicidade provocada pelo isoproturão sobre os testículos, devido à possível indução dos CYP1A1 e CYP1A2 e à inibição dos enzimas mGST e cGST, mostrou-se semelhante em qualquer das idades que estudámos e parece ser muito superior àquela que poderemos prever para o fígado, rins e timo, em consequência dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho.

Apesar de o isoproturão ser considerado isento de toxicidade para o Homem, estes resultados mostram que este composto poderá produzir efeitos deletérios nos roedores, particularmente sobre os testículos, provocando uma diminuição da capacidade reprodutora, que assume capital importância na reposição a longo prazo da espécie.

Embora a transposição destes resultados para o Homem tenha de ser feita com cautela, não poderemos excluir a hipótese de o isoproturão poder exercer efeitos

deletérios nos seres humanos, em particular após ingestão a longo prazo de água e alimentos contaminados com o xenobiótico.

No prosseguimento deste trabalho deveremos procurar a confirmação, em cada órgão, dos perfis de resposta ao isoproturão que aqui propusemos. Para esse efeito poderemos utilizar metodologias como a análise imunoquímica e o RT-PCR de modo a detectar e quantificar, com elevada especificidade, a expressão das formas isoenzimáticas do sistema citocromo P450 e enzimas glutatióno *S*-transferase afectadas pelo tratamento. Com base nesses resultados deveremos, ainda, prosseguir no sentido de identificar em humanos isoenzimas congéneres aos que foram afectados pelo tratamento com isoproturão nos ratos machos Wistar, tendo em vista reconhecer eventuais mecanismos reguladores da expressão genética dos genes *CYP* e *GST*, comuns às duas espécies.

Em paralelo deveremos também procurar avaliar a influência do isoproturão na concentração intracelular de hidroperóxidos e nas actividades enzimáticas glutatióno peroxidase dependente e não dependente do Se, assim como na actividade superóxido dismutase tendo em vista detectar possíveis alterações dos sistemas anti-oxidantes celulares e sua possível correlação com um eventual desvio do sistema citocromo P450 para a via de oxigenorredução.

Esperamos que os resultados que vierem entretanto a ser obtidos possam contribuir para o desenvolvimento de ensaios *in vitro* com culturas de tecido de rato e de humanos que permitam estimar a resposta *in vivo* ao isoproturão ou a outros xenobióticos e conseqüentemente prever a sua toxicidade para o Homem.





## **7.Referências bibliográficas**



- ABELL, C. W. e HEIDELBERGER, C. (1962) –Interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues.VIII Binding of tritium-labeled hydrocarbons to the soluble proteins of mouse skin, *Cancer Res.*, 22, 931-946.
- ABRAMOVITZ, M. e LISTOWSKI, I. (1988) –Developmental regulation of glutathione S-transferase, *Xenobiotica*, 18, 1249-1254.
- ADANG, A. E. P, BRUSSE, J., VAN DER GEN e MULDER, G. J. (1990) –The glutathione-binding site in glutathione S-transferases. Investigation of the cysteinyl e  $\gamma$ -glutamyl domains, *Biochem. J.*, 269, 47-54.
- ADANG, A. E. P., BUSSEE, J., MEYER, D., COLES, B., KETTERER, B., VAN DER GEN, A. e MULDER, D. J. (1988) –Substrate specificity of rat glutathione S-transferase isoenzymes for a series of glutathione analogues, modified at the gamma glutamyl moiety, *Biochem. J.*, 255, 721-724.
- AGRAWAL, A.K. e SHAPIRO, B.H. (1997) –Gender, age and dose effects of neonatally administrated aspartate on sexually domorphic plasma growth hormone profiles regulating expression of the rat sex-dependent hepatic CYP isoforms, *Drug Metabol. Dispos.*, 25, 1249-1256.
- AITIO, A. (1978) –A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation, *Anal. Biochem.*, 85, 488-491.
- AKITA, S., KAWAHARA, M., TAKESHITA, T., MORIO, M. e FUJI, K. (1989) –Halothane-induced hepatic microsomal lipid peroxidation in guinea pigs and rats, *J. Appl. Toxicol.*, 9, 9-20.
- ALVARES, A. P., SCHILLING, G., LEVIN, W. e KAUTZMAN, R. (1967) –Studies on the induction of CO-binding pigment in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 521-529.
- AMES, B. N., MCCANN, M. e YAMAZAKI, E. (1975) –Methods for detecting carcinogens and mutagens with salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 31, 347-363.
- ANDERSON, L. M., JONES, A. B., MILLER, M. S. e CHAUHAN, D. P (1989) –Metabolism of transplacental carcinogenesis, in *Transplacental and multigeneration carcinogenesis*, 96, 155-188, IRC Scientific Publications.
- ANDERSON, M.D., BANDIERA, S.M., CHANG, T.K.H. e BELLWARD, G.D. (1998) –Effect of androgen administration during puberty on hepatic CYP2C11, CYP3A e CYP2A1 expression in adult female rats, *Drug Metabol.Dispos.*, 26, 1031-1038.
- ANIYA, Y, SHIMOJI, M. e NAITO, A. (1993) –Increase in liver microsomal glutathione S-transferase activity by phenobarbital treatments of rats, *Biochem.Pharmacol.*, 46, 1741-1747.
- ANIYA, Y. e ANDERS, M.W. (1989) –Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species, *J. Biol. Chem.*, 264,1998-2002.
- ANIYA, Y. e NAITO, A. (1993) –Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione S-transferase in isolated rat liver, *Biochem. Pharmacol.*, 45, 37-42.
- ANSAR AHMED, S., PENHALE, W.J. e TALAL, N. (1985) –Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. Mechanism of sex hormone action, *Am. J. Pathol.*, 121, 531-551.
- ANYIA, Y. e ANDERS, M.W. (1992) –Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by hydrogen proxide: role for protein dimer formation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 296, 611-616.
- ARKING, R. (1991) - *Biology of Aging: Observations and Principles*, 1<sup>st</sup> ed., Prentice Hall, Inc, Englewood Cliffs, New York.

- ARLOTTO, M.P., TRANT, J.M. e ESTABROOK, R.W. (1991) –Measurement of steroid hydroxylation by high-performance liquid chromatography as indicator of P450 identity and function, in: *Methods Enzymology*, 206, 454-462, Academic Press, New York
- ARMSTRONG, R. N. (1991) –Glutathione S-transferase: reaction mechanism, structure, and function, *Hem. Res. Toxicol.*, 4, 131-140.
- ARNOLD, H.H. e HEINZE, H. (1990) –Treatment of human peripheral lymphocytes with concanavalin A activates expression of glutathione reductase, *FEBS Lett.*, 267, 189-192.
- ASHTON, F. M. e CRAFTS, A. S. (1981) –*Mode of action of herbicides*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, New York.
- AWASTHI, Y. C., SHARMA, R. e SINGHAL, S. S. (1994) –Human glutathione S-transferases, *Int. J. Biochem.*, 26, 295-308.
- BABSON, J. R. e REED, D. J. (1978) –Inactivation of glutathione reductase by 2-chloroethyl nitrosourea-derived isocyanates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 754-762.
- BACHUR, N. R., GORDON, S. L., GEE, M. V. e KON, H. (1979) –NADPH-cytochrome P450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 76, 954-960.
- BACKES, W. L. e EYER, C. S. (1989) –Cytochrome P450<sub>LM2</sub> reduction. Substrate effects on the rate of reductase-LM2 association, *J. Biol. Chem.*, 264, 6252-6263.
- BACKES, W. L., SLIGAR, S. G. e SCHENKMAN, J. B. (1982) –Kinetics of hemoatic cytochrome P450 reduction: correlation with spin state of the ferric heme, *Biochemistry*, 21, 1324-1332.
- BACKES, W. L., TAMBURINI, P. P., JANSSON, I., GIBSON, G. G., SLIGAR, S. G. e SCHENKMAN, J. B. (1985) –Kinetics of cytochrome P450 reduction: Evidence for faster reduction of the high-spin ferric state, *Biochemistry*, 24, 5130-5136.
- BAILLIE, T. A. e SLATER, J. G. (1991) –Glutathione: A vehicle for the transport of chemically reactive metabolites in vivo, *Acc. Chem. Res.*, 24, 264-270.
- BAKER, H.J., LINDSEY, J.R. e WEISBROTH, S.H. (1980) –The laboratory rat, Volume II, 1<sup>st</sup> edition, 257-258, Academic Press, London.
- BARDOT, O.; ALDRIGE, T. C.; LATRUFFE, N. e GREEN, S. (1993) –PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 37-45.
- BARKER, C. W., FAGAN, J. B. e PASCO, D. S. (1994) –Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, 269, 3985-3990.
- BARNETT, C. R., FLATT, P. R. e IOANNIDES, C. (1994) –Modulation of the rat hepatic cytochrome P450 composition by long-term streptozotocin-induced insulin-dependent diabetes, *J. Biochem. Toxicol.*, 9, 63-69.
- BARTHOLOMAEUS, A.R., BOLTON, R. e AHOKAS, J.T. (1994) –Inhibition of rat liver cytosolic glutathione S-transferase by silibyn, *Xenobiotica* 24, 17-24.
- BAST, A. (1986) –Is formation of reactive oxygen by cytochrome P450 perilous and predictable?, *TIPS*, 7, 266.
- BATIST, G., TULPUL, A., SINHA, B. K., KATKI, A. G., MEYERS, C. E. e COWAN, K. H. (1986) –Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells, *J. Biol. Chem.*, 261, 15544-15549.

- BECKMAN, K. B. e AMES, B. N. (1998) –The free radical theory of aging matures, *Physiological Rev.*, 78, 547-581.
- BEHERA, B. C. e BHUNYA, S. P. (1990) –Genotoxic effect of isoproturon (herbicide) as revealed by three mammalian in vivo mutagenic bioassays, *Indian J. Exp. Biol.*, 28, 862-867.
- BELL, D. R. e ELCOMBE, C. R. (1991) –Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450IVA1 RNA in primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators, *Biochem. J.*, 280, 249-253.
- BENSON, A. M., BATZINGER, R. P., ON, S.-Y. L., BUEDING, E., CHA, Y.-N. e TALALAY, P. (1978) –Elevation of hepatic glutathione S-transferases activities and protection against mutagenic metabolites of benzo[a]pyrene by dietary antioxidants, *Carcinogenesis Ecotox. Res.*, C10, 4486-4495.
- BERGELSON, S., PINKUS, R. e DANIEL, V. (1994) –Induction of Ap-1(Fos/Jun) by chemical agents mediates activation of glutathione S-transferases and quinone reductase gene expression, *Oncogene*, 9, 565-571.
- BERNARDO, J. M. e SMITH, A. F. M. (1995) –*Bayesian theory*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.
- BHATTACHARYA, A. K., HURLEY, J. K., TOLLIN, G. e WASKELL, L. (1994) – Investigation of the rate limiting step for electron transfer from NADPH: cytochrome P450 reductase to cytochrome b<sub>5</sub>: a laser flash-photolysis study, *Arch. Biochem. Biophys.*, 310, 318-324.
- BIRO-SAUVEUR, B., EECKHOUTTE, C., SUTRA, J.-F., CALLÉJA, C.; ALVINERIE, M. e GALTIER, P. (1994) –Consequences of challenge infections with *Fasciola hepatica* on rat liver P450-dependent metabolism of sex hormones, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 51, 209-217.
- BLACK, S. D. e COON, M. J. (1982) –Structural features of liver microsomal NADPH-cytochrome P450 reductase. Hydrophobic domain, hydrophylic domain and connecting region, *J. Biol. Chem.*, 257, 5929-5936.
- BLACK, S. D., FRENCH, J. S., WILLIAMS, C. H., JR. e COON, M. J. (1979) –Role of a hydrophobic polypeptide in the N-terminal region of NADPH-cytochrome P450 reductase complex formation with P450 LM, *Biophys. Res. Commun.*, 91, 1528-1533.
- BLOUNT, S., GRIFFITHS, H. R. e LUNEC, J. (1989) –Reactive oxygen species induce antigenic changes in DNA, *FEBS Lett*, 245, 100-103.
- BLUM, M. S. (1955) –*Time's Arrow and Evolution*, 1<sup>st</sup> ed., Harper, New York.
- BLUMBERG, B., SABBAGH, W. JR., JUGUILON, H., BOLADO, J. JR., VAN METER, C. M., ONG, E. S. e EVANS, R. M. (1998) –SRX, a novel steroid and xenobioticsensing nuclear receptor, *Genes Dev.* 12, 3195-3205.
- BOLTON, M. G., MUÑOZ, A., JACOBSON, L. P., GROOPMAN, J. D., MAXUITENKO, Y. Y., ROEBUCK, B. D. e KENSLER, T. W. (1993) –Transient intervention with oltripaz protects against aflatoxin-induced hepatic tumorigenesis, *Cancer Res.*, 53, 3499-3505.
- BOOTH, J. BOYLAD, E. e SIMS, P. (1961) –An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione, *Biochem.J.*, 79, 516-525.
- BOX, G. E. P. e TIAO, G. C. (1992) –*Bayesian inference in statistical analysis*, 1<sup>st</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc, New York.

- BOYLAND, E. e CHASSEAUD, L. F. (1969) –The role of glutathione and glutathione *S*-transferase in mercapturic acid biosynthesis, *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, 32, 173-219.
- BRIDGES, A., GRUENKE, L., CHANG, Y.-T., VAKSER, I. A., LOWE, G. e WASKELL, L. (1998) –Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 e cytochrome P450 reductase, *J. Biol. Chem.* 273, 17036-17049.
- BROOKES, P. e LAWLEY, P. D. (1964) –Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: Relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid, *Nature*, 202, 781-784.
- BRUNDRETT, R. B., COWENS, J. W., COLVIN, M e JARDINE, I. (1976) –Chemistry of nitrosoureas. Decomposition of deuterated 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea, *J. Med. Chem.*, 19, 958-961.
- BUCHA, H. C. e TODD, C. W. (1951) –3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea - a new herbicide, *Science*, 114, 493-494.
- BUDAVARI, S., O'NEIL, M.J., SMITH, A., HECKELMAN, P.E. e KINNEARY, J.F. (1996) The Merck Index, 12<sup>th</sup> ed. Merck & Co., New Jersey.
- BUETLER, T. M., GALLAGHER, E. P., WANG, C., STAHL, D. L., HAYES, J. D. e EATON, D. L. (1995) –Induction of phase I and phase II drug-metabolizing enzyme mRNA, protein, and activity by BHA, ethoxyquin, and oltipraz, *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 135, 45-57.
- BUETLER, T. M., SLONE, D. e EATON, D. L. (1992) –Comparison of the aflatoxin B1-9,10-epoxide conjugating activities of two bacterially expressed alpha class glutathione *S*-transferase isozymes from mouse and rat, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 597-563.
- BURGER, H. J., SCHUETZ, J. D., SCHUETZ, E.G. e GUZELIAN, P. S. (1992) –Paradoxical transcriptional activation of rat liver cytochrome P4503A1 by dexamethasone and antigluocorticoid pregnenolone 16 alpha-carbonitrile: analysis by transient transfection into primary cultures of adult rat hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2145-2149.
- BURKE, M. D. e MAYER, R. T. (1974) –Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene, *Drug Metab. Disp.*, 2, 6, 583-588.
- BURNET (1974) –Les origines du vieillissement, *La Recherche*, 5, 626-633
- BURNET, F. M. (1970) –An immunological approach to ageing, *The Lancet*, 358-360.
- BUSH, M. T. e WELLER, H. (1973) –The metabolic fate of hexobarbital, *Drug Metab. Rev.*, 1, 249-257.
- BUZARD, J. A. e KOPKO, F. (1963) –The flavin requirement and some inhibition characteristics of rat tissue glutathione reductase, *J. Biol. Chem.*, 238, 464-468.
- BYLUND, J., KUNZ, T., VALMSEN, K. e OLIW, E.H. (1998) –Cytochrome P450 with bisallylic hydroxylation activity on arachidonic and linoleic acids studied with human recombinant enzymes and with human and rat liver microsomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 51-60.
- CAIRNS-SMITH, A. G. (1971) –The Lyfe puzzle, 1<sup>st</sup> ed., Oliver and Boyd, Edinburg.
- CALOW, P. (1978) –*Lyfe Cycles*, 1<sup>st</sup> ed., Chapman and Hall, London.
- CANIVENC-LAVIER, M.-C., VERNEVAUT, M.-F., TOTIS, M., SIESS, M.-H., MAGDALOU, J. e SUSCHETET, M. (1996) –Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver, *Toxicol.*, 114, 19-27.

- CARRILLO, M. C., MONTI, J. A., FAVRE, C. e CARNOVALE, C. E. (1995) –Acute regulation of hepatic glutathione *S*-transferase by insulin e glucagon, *Toxicol. Lett.*, 76, 105-111.
- CARVALHO, M. J. R. (1988) –*A estatística aplicada à experimentação agrícola*. Nova Agricultura, Porto.
- CERAMI, A., VLASSARA, H. e BROWNLEE, M. (1986) –Glucose and aging, *Sci. Am.*, 6, 82-88.
- CHAGOYA DE SANCHEZ, V., HENÁNDEZ-MUNOZ, R., YANEZ, L., VIDRIO, S. e DÍAZ-MUNOZ, M. (1995) –Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase, *J. Biochem. Toxicol.*, 10, 41-50.
- CHAN, W. K., CHU, R., JAIN, S., REDDY, J. K. e BRADFIELD, C. A. (1994) –Baculovirus expression of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator. Evidence for additional dioxin responsive element. Binding species and factors required for signaling, *J. Biol. Chem.*, 269, 26464-26471.
- CHATTERJEE, S. N., AGARWAL, S., JANA, A. K. e BOSE, B. (1988) –Membrane lipid peroxidation and its pathological consequences, *Indian J. Biochem. Biophys.*, 25, 25-34.
- CHAUVET, G. (1986) –*Traité de Physiologie Théorique*. Tome II, 2<sup>ème</sup> édition, Masson, Paris.
- CHEN, Y.-H. e TURKEY, R.H. (1996) –Protein kinase C modulates regulation of CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor, *J. Biol. Chem.*, 271, 26261-26266.
- CHHABRA, S. K. e RAO, A. R. (1994) –Transmammary modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in liver of mouse pups mace (*Myristica fragrans* Houtt.), *J. Ethnopharmacol.* 42, 169-177.
- CHUNG, T. e KIM, Y.B. (1988) –Two distinct cytotoxic mechanisms of macrophages and monocytes activated by phorbol myristate acetate, *J. Leukoc. Biol.*, 44, 329-336.
- CIACCIO, P. J., TEW, K. D. e LACRETA, F. P. (1990) –The spontaneous and glutathione *S*-transferase reaction of chlorambucil with glutathione, *Cancer Commun*, 2, 279-286.
- CLAPPER, M. L., EVERLEY, L. C., STROBEL, L. A., TOWNSEND, A. J. e ERGSTROM, P. F. (1994) –Coordinate induction of glutathione *S*-transferase  $\alpha$ ,  $\mu$  and  $\pi$  expression in murine liver after a single administration of oltripaz, *Mol. Pharmacol.*, 45, 469-474.
- COHEN, M. B. e DUVEL, D. L. (1988) –Characterization of inhibition of glutathione reductase and the recovery of enzyme activity in exponentially growing murine leukemia (L1210) cells treated with 1,3-bis(2-chloro-ethyl)-nitrosourea, *Biochem. Pharmacol.*, 37, 3317-3320.
- COMMANDEUR, J. N. M., STIJNTJES, G. J. e VERMEULEN, N. P. E. (1995) –Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione *S*-conjugates, *Pharmacol. Rev.*, 47, 271-330.
- CONN, E.E. e VENNESLAND, B. (1951) –Glutathione reductase of Wheat germ, *J. Biol. Chem.*, 192, 17-28.
- COOKE, R. J., BJORNSTEDT, R., DOUGLAS, K. T., MCKIE, J. H., KING, M. D., COLES, B., KETTERER, B. e MANNERVIK, B. (1994) –Photoaffinity labelling of the active site of the rat glutathione transferases 3-3- e 1-1 and human glutathione transferase A1-1, *Biochem. J.*, 302, 383-390.



- COSTET, P., LEGENDRE, C., MORÉ, J., EDGAR, A., GALTIER, P. e PINEAU, T. (1998) – Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis, *J. Biol. Chem.* 273, 29577-29575.
- COWELL, I. G., DIXON, K. H., PEMBLE, S. E., KETTERER, B. e TAYLOR, J. B. (1988) – The structure of the human glutathione *S*-transferase pi gene, *Biochem. J.*, 255, 79-83.
- CREASY, D.M. e FOSTER, P.M.D. (1991) –Male reproductive system, in *Handbook of toxicologic Pathology*, 829-889, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press, London.
- CUTLER, R. G. (1975) –Cross Linkage Hypothesis of Ageing: DNA adducts in Chromatin as a primary ageing source, in *Cell impairment, Ageing and Development*, 1<sup>st</sup> ed., Plum Press, New York.
- CUTLER, R. G. (1991) –Antioxidants and aging, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53 (suppl 1), 373S-379S.
- DAFRÉ, A. L., SIES, H. e AKERBOOM, T. (1996) –Protein *S*-thiolation and regulation of microsomal glutathione transferase activity by the glutathione redox couple, *Arch. Biochem. Biophysics*, 332, 2, 288-294.
- DALY, A. K., CHOLERTON, S., ARMSTRONG, M. e IDLE J.R. (1994) –Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility, *Environ. Health Perspec.*, 102, 55-61.
- DANNAN, G. A., GUENGERICH, F. P. e WAXMAN, D. J. (1986) –Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes, *J. Biol. Chem.*, 261, 23, 10728-10735.
- DANNENBERG, A.J., YANG, E.K. e AHARON, D. (1993) –Dietary lipids induce phase 2 enzymes in rat small intestine, *Biochim. Biophys. Acta* 1210, 8-12.
- DE BETHIZY, J.D. e HAYES, J.R. (1989) –Metabolism: A determination of toxicity, in: *Principles and methods of toxicology*, 29-66, Raven Press, New York.
- DE GROOT, H. e NOLL, T. (1986) –The crucial role of low steady state oxygen partial pressure in haloalkane free radical mediated lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 15-27.
- DECKER, W. J. (1987) –*Introduction and History*, in *Handbook of toxicology*, 1<sup>st</sup> ed., Hemisphere Publishing Corporation, London.
- DEJONG, J.L., MORGENSTERN, R., JORVALL, H., DEPIRRE, J.W. e TU, C.-PD. (1988) – Gene expression of rat and human microsomal glutathione *S*-transferases, *J. Biol. Chem.*, 263, 8430-8436.
- DELEVE, L. D. e KAPLOWITZ, N. (1990) –Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin. Liver Dis.*, 10, 251-266.
- DENISON, M. S. e WHITLOCK JR., J. P. (1995) –Xenobiotic-inducible transcription of cytochromes P450 genes, *J. Biol. Chem.*, 270, 18175-18179.
- DESVERGNE, T. L. B. e WAHLI, W. (1996) –Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 335-363.
- DI BIASIO, K.W., SILVA, M.H., SHULL, L.R., OVERSTECT, J.W., HAMMOCK, B.D. e MILLER, M.G. (1991) –Xenobiotic metabolizing enzyme activities in rat, mouse, monkey and human testes, *Drug Metabol. Dispos.*, 19, 227-232.
- DI SIMPLICIO, P. e MANNERVIK, B. (1983) –Enzymes involved in glutathione metabolism in rat liver and blood after carbon tetrachloride intoxication, *Toxicol. Lett.*, 18, 285-290.

- DIERICKX, P.J. e NOBLE, E. (1997) –Purification and Characterization of the soluble glutathione *S*-transferase isoenzymes in rat kidney derived NRK cells, *Biochem. Mol. Biol. Intl.*, 41, 1013-1023.
- DIERINGER, C. S., LAMARTINIÈRE, C. A. e LUCIER, G. W. (1980) –Neonatal treatment with testosterone propionate or diethylbestrol alters sex differentiation of 5 $\alpha$ -reductase e 16 $\alpha$ -hydroxylase, *J. Steroid Biochem.*, 13, 1449-1453.
- DIKSHITH, T. S. S., RAIZADA, R. B. e SRISVASTAVA, M. K. (1990) –Dermal toxicity to rats of isotretinoin technical and formulation, *Vet.Hum.Toxicol.*, 32, 432-434.
- DOGRA, S. C., DAVIDSON, B. P. e MAY, B. K. (1999) –Analysis of a phenobarbital-responsive enhancer sequence located in 5' flanking region of chicken *CYP2H1* gene: Identification and characterization of functional protein-binding sites, *Mol. Pharmacol.* 1, 14-22.
- DOROSHOW, J. (1986) –Role of hydrogen peroxide and hydroxyl formation in the killing of Ehrlich cancer cell by antitumor quinones, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 4514-4520.
- DREYER, C., KREY, G., KELLER, H., GIVEL, F., HELFTENBEIN, G. e WHALI, W. (1992) –Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors, *Cell.* 68, 879-887.
- DUNCAN, L. R. e DEGROOT (1976) –A mean square error approach to optimal design theory, *Proc. 1976 Conf. information sciences and systems*, John Hopkins University Press, Baltimore.
- DUPAS, S., SCRIBE, P., ETCHEBER, H. SALIOT, A. e ALBAIGES, J. (1995) –Phenylurea and triazine herbicides in Garonne river (France) during high flood and low water periods, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 58, 1-4, 397-409.
- EATON, D. L. e GALLAGHER, E. P. (1994) –Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 135-172.
- EATON, D. L., GALLAGHER, E. P., BAMMLER, T. K. e KUNZE, K. L. (1995) –Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: Implications for human variability in expression and enzyme activity, *Pharmacogenesis*, 5, 259-274.
- EICHELBAUM, M., SPANNBRUCKER, N., STEINCKE, B. e DENGLER, J. J. (1979) –Defective *N*-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 16, 183-187.
- EKSTROM, G. e INGELMAN-SUNDBERG, M. (1989) –Rat liver microsomal NAPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent and ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1), *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1313-1324.
- ELFERINK, C. J. e WHITLOCK, J. P. JR. (1994) –Dioxin-dependent, DNA sequence-specific binding of a multiprotein complex containing the Ah receptor, *Receptor* 4, 157-173.
- EPSTEIN, J. e GERSHON, D. (1972) –The effect of antioxidants on cellular damage and life span, *Mech. Ageing Dev.*, 1, 257-264.
- ESTABROOK, R. W. (1982) –Cytocrome P450 and oxygenations reactions, in *Drug metabolism and drug toxicity*, 1<sup>st</sup> ed., Raven Press, New York.
- ESTABROOK, R. W. e WERRINGLER, J. (1977) –Active oxygen-factor or fantasy, in *Microsomes and Drug Oxidations*, 1<sup>st</sup> ed., Pergamon Press, New York.
- ESTABROOK, R. W., COOPER, D. Y. e ROSENTHAL, O. (1963) –The light reversible carbon monoxide inhibition of the C21-hydroxylase system of the adrenal cortex, *Biochem. Zeit*, 338, 741-747.

- ESTABROOK, R. W., KAWANO, S., WRINGLER, J., KUTHAN, H., TSUJI, H., GRAF, H. E ULLRICH, V. (1979) –Oxycytochrome P450: its breakdown to superoxide for formation of hydrogen peroxide, *Acta Biol. Med. Ger.*, 38, 423-434.
- EYER, C. S. e BACKES, W. L. (1992) –Relationship between the rate of reductase-cytochrome P450 complex formation and the rate of first electron transfer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 293, 231-239.
- FABRIS, N., MOCCHEGIANI, E., MUZZIOLI, M. e IMBERTI, R. (1983) –Thymus-neuroendocrine network, in Fabris, N., Goraci, E., Hadden, J., Mitchison, N.A.(eds), 41-50, Plenum Press, New York.
- FABRIS, N., MOCCHEGIANI, E., MUZZIOLI, M. e IMBERTI, R. (1983) –Thymus-endocrine network, in *Immunoregulation*, 341-362, Plenum Press, New York.
- FALCONER, D.S. (1989) –*Introduction to quantitative genetics*. 3<sup>rd</sup> eds, John Wiley and Sons, Inc, New York.
- FAVREAU, L. V. e PICKETT, C. B. (1991) –Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H: quinone reductase. Identification of regulatory elements controlling basal level expression and inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants, *J. Biol.Chem.*, 266, 4556-4561.
- FAVREAU, L. V. e PICKETT, C. B. (1993) –Transcriptional regulation of the rat NAD(P)H: quinone reductase gene. Characterization of a DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element and induction by 12-*O*-tetradecanoilphorbol 13-acetate, *J. Biol. Chem.*, 268, 19875-19881.
- FENG, P. C. C. e PATANELLO, J. E. (1988) –Identification of mercapturic acid pathway metabolites of alachlor formed by liver and kidney homogenates of rats, mice and monkeys, *Pest. Biochem. Physiol.*, 31, 84-90.
- FERNANDES, C. L., CHAVAN, S. J., DONG, J.-H.; BORNHANN, W. G., POLSKY, B., CHISARI, F. V., MONTALI, J. A., SCHMIDT, D. E. JR. e PROCHASKA, H. J. (1996) –Regulation of glutathione *S*-transferases: clues from a worm, a virus and a mouse with hepatitis, in *Glutathione S-transferases, structure, function and clinical implications*. 97-109, Taylor and Francis, London.
- FINNEN, M. J. e HASSAL, K. A. (1980) –Testicular neonatal imprinting of sex dependent differences in hepatic foreign compound metabolism in rat, *Biochem. Pharmacol.*, 29, 3133-3137.
- FISCHER, G. R., BROWN, J. R. e PATTERSON, L. H. (1990) –Involvement of hydroxyl radical formation and DNA strand breakage in the cytotoxicity of anthraquinone antitumor agents, *Free Rad. Res. Commun.*, 11, 117-129.
- FLATGAARD, J. E., BAUER, K. E. e KAUVAR, L. M. (1993) –Isozyme specificity of novel glutathione *S*-transferase inhibitors, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 33, 63-70.
- FLESCHER, E., GONEN, P. e KEISARI, Y. (1984) –Oxidative burst-dependent tumoricidal and tumorigenic activities of paraffin oil-elicited mouse macrophages, *J. Natl. Cancer Inst.*, 72, 1341-1347.
- FLETCHER, W. W. e KIRKWOOD, R. C. (1982) –Herbicides and plant growth regulators, 1<sup>st</sup> ed., Granada Publishing, London.
- FOURNIER, T., MEDLOUBI, N., LAPOUMEROLIE, C., HAMELIN, J., ELION, J., DURAN, G. e PORQUET, D. (1994) –Transcriptional regulation of rat alpha 1-acid glycoprotein gene by phenobarbital, *J. Biol. Chem.*, 269, 27175-27178.
- FRANKLIN, M. R. e ESTABROOK, R. W. (1971) –On the inhibitory action of mersalyl on drug oxidation: A rigid organization of the electron transport chain, *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 318-324.

- FREAR, D. S. e SWANSON, H. R. (1972) –New metabolites of monuron in excised cotton leaves, *Phytochemistry*, 11, 1919-1929.
- FRILING, R. S., BERGELSON, S. e DANIEL, V. (1992) –Two adjacent AP-1-like binding sites from the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 668-672.
- FRILING, R. S., BESIMON, A., TICHAUER, Y. e DANIEL, V. (1990) –Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6258-6262.
- FRISCHER, H. e AHMAD, T. (1977) –Severe generalized glutathione reductase deficiency after antitumor chemotherapy with BCNU [ 1,3-(bis(chloroethyl)-1-nitrosourea)], *J. Lab. Clin. Med.*, 89, 1080-1091.
- FUJITA, S., (1990) –Age-associated alterations in diazepam metabolizing enzyme activities in male and female rats, *Drug Metab. Dispos.*, 18, 5, 812-814.
- FUJITA, S., CHIBA, M., OHTA, M., KITANI, K. e SUZUKI, T. (1990) –Alteration of plasma sex hormones levels associated with old age and its effect on hepatic drug metabolism in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253, 369-374.
- FUJITA, S., KITAGAWA, CHIBA, M., SUZUKI, M. OHTA, M. e KITANI, K. (1985) –Age and sex associated differences in the relative abundance of multiple species of cytochrome P450 in rat liver microsomes. A separation of HPLC of hepatic microsomal cytochrome P450 species, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1861-1864.
- FULCO, A. J. (1991) –P450BM-3 and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31, 177-203.
- GANDY, J., PRIMIANO, T., NOVAK, R.F., KELCE, W.R. e YORK, J.L. (1996) –Differential expression of glutathione S-transferase isoforms in compartments of the testis and segments of the epididymis of the rat, *Drug. Metab. Dispos.*, 24, 725-733.
- GEARING, K. L., CRICKMORE, A. e GUSTAFSSON, J.-A. (1994) –Structure of the mouse peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  gene, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 199, 255-263.
- GEARING, K. L., GOTTLICHER, M., WIDMARK, E., BANNER, C.D., TOLLET, P., STROMSTEDT, M., RAFFER, J.J., BERGE, R.K. e GUSTAFSSON, J.A. (1994) –Fatty acid activation of the peroxisome proliferator activated receptor, a member of nuclear receptor gene superfamily, *J. Nutr.*, 124, 1284S-1288S.
- GEBERT, C. A., PARK, S.-H. e WAXMAN, D. J. (1997) –Regulation of signal transducer and activator of transcription (stat) 5 b activation by the temporal pattern of growth hormone stimulation, *Mol. Endocrinol.*, 11, 400-414.
- GEENEN, V., MARTENS, H., CORMANN-GOFFIN, N., VANDERSMISSEN, E., LEGROS, J.-J., DE GROOTE, D., DEFRESNE, M.-P., BONIVER, J. e FRANCHIMONT, P. (1993) –La fonction centrale du thymus dans la reconnaissance des fonctions neuroendocrines par les lymphocytes T au cours de leur développement, *Archv. Intern. Physiol. Biochim. Biophys.*, 101, A19-A22.
- GEENEN, V., ROBERT, F., DEFRESNE, M.P., BONIVER, J., LEGROS, J.J. e FRANCHIMONT, P. (1989) –Neuroendocrinology of the thymus, *Horm. Res.*, 31, 81-85.
- GEISSBUHLER, H., BAUNOK, I. e GROSS, D. (1970) –Radioisotope and Chromatographic techniques for tracing the fate of herbicides in plants and animals, *Proc. Int. Union Pure Appl. Chem. Symp.*, Johannesburg, South Africa., 12-17.
- GÉRARD-MONIER, D. e CHAUDIERE, J. (1996) –Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion, *Pathologie Biologie*, 44, 1, 77-85.

- GOEPTAR, A. R., SCHEERENS, H. e VERMEULEN, N. P. E. (1995) –Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450, *Critical Rev.Toxicol.*, 25, 25-65.
- GOEPTAR, A. R., TE KOPPELE, J. M. e VAN MAANEN, N. P. E. (1992) –One-electron reductive bioactivation of 2,3,5,6-tetramtyl-benzoquinone by cytochrome P450, *Biochem. Pharmacol.*, 43, 343-351.
- GOEPTAR, A. R.; TE KOPPELE, J. M.; LAMME, E. K.; PIQUÉ, J. M. e VERMEULEN, N. P. E. (1993) –Cytochrome P450IIBI-mediated one.electron reduction of adriamycin: a study with rat liver microsomes and purified enzymes, *Mol. Phar-macol.*, 44, 1267-1280.
- GOEPTAR, A. R.; TE KOPPELE, J. M.; NEVE, E. P. A. e VERMEULEN, N. P. E. (1992) –Reductase and oxidase activity of rat liver cytochrome P450 with 2,3,5,6-tetramethylbenzoquinone as substrate, *Chem. Biol. Interact.*, 83, 249-261.
- GOLDBERG, D. M. e SPOONER, R. J. (1987) –Glutathione reductase, in *Methods of enzymatic analysis*, 3<sup>rd</sup> ed., 258-265, Bergmeyer, VCH, New York.
- GOLDBLUM, A. e LOWE, G. H. (1980) –Quantum chemical studies of anaerobic reductive metabolism of halothane by cytochrome P450, *Chem. Biol. Interact.*, 32, 83-90.
- GOLDSTEIN, J.A. e LINKO, D. (1984) –Differential induction of 2,3,7,8,-tetrachlorodiben-zodioxina inducible forms of cytochrome P450 in extrahepatic versus hepatic tissues, *Mol. Pharmacol.*, 25, 185-191.
- GOLDSTEIN, S. (1978) –Human genetic disorders that premature onset and accelerated progression of biological aging, in *The Genetics of Aging*, Plenum Press, New York.
- GOMEZ, K. A. e GOMEZ, A. A. (1984) –*Statistical procedures for agricultural research*. 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- GONZALEZ, F. J. (1988) –The molecular biology of cytochrome P450s, *Pharmacol. Rev.* 41, 91-92.
- GONZALEZ, F. J. (1989) –The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* 40: 243-288.
- GONZALEZ, F. J., SONG, B.-J. e HARDWICK, J. P. (1986) –Pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile-inducible P450 gene family: Gene conversion and differential regulation, *Mol. Cell. Biol.*, 6, 2969-2976.
- GONZALEZ, F.J.(1990) –Molecular genetics of the P450 superfamily - review, *Pharma-col. Ther.*, 45, 1-8.
- GOODING, P. E., CHAVEN, J., SAWYER, B. e SLATER, T.F. (1978) –Cytochrome P450 distribution in rat liver and the effect of sodium phenobarbitone administration, *Chem Biol. Interact.*, 20, 299-312.
- GOTTESMAN, M. M. e PASTAN, I. (1988) –The multidrug transporter, a double-edged sword, *J. Biol. Chem.*, 262, 12163-12166.
- GREENGARD, O. (1975) –Steroids and the maturation of rat tissues, *J. Steroid Biochem.*, 6, 639-642.
- GRIESE, E. U., ZANGER, U. M., BRUDERMANN, U., GAEDIGK, A., MIKUS, G., MORIKE, K., STUVEN, T. e EICHELBAUM, M. (1998) –Assessment of the predictive power of genotypes for in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a german population, *Pharmacogenetics*, 8, 15-26.
- GROSSMAN, C.J. (1985) –Interactions between the gonadal steroids and the immune system, *Science*, 227, 257-261.

- GROVES, J. T. e WATANABE, Y. (1988) –Reactive iron porphyrin derivatives related to the catalytic cycles of cytochrome P450 and peroxidases. Studies of the mechanism of oxygen activation, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 8443-8449.
- GUENGERICH, F. P. (1991) –Reactions an significance of cytochrome P450 enzymes, *J. Biol. Chem.*, 266, 10019-10022.
- GUENGERICH, F. P. (1993) –Cytochrome P450 enzymes. They defend the body against environmental pollutants, detoxify drugs and synthesize several important signaling molecules, *Am. Scientist.*, 81, 440-447.
- GUENGERICH, F. P. e MARTIN, M. V. (1980) –Purification of cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase and epoxide hydratase from single preparation of rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 205, 365-373.
- GUENGERICH, F. P., BALLOU, D. P. e COON, M. J. (1976) –Spectral intermediates in the reaction of oxygen with purified liver microsomal cytochromes P450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 951-966.
- GUENGERICH, F. P., SHIMADA, T., YUN, C.-H., YAMAZAKI, H., RANEY, K. D., THIER, R., COLES, B. e HARRIS, T. M. (1994) –Interactions of ingested food, beverage, and tobacco components involving human cytochrome P4501A2, 2A6, 2E1, and 3A4 enzymes, *Environ. Health Perspec.*, 102, 49-53.
- GUENGERICH, F.P. (1986) –Enzymology of rat liver cytochrome P450, in: *Mammalian cytochromes P450*, 1, 1-54, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- GULICK, A. M. e FAHL, W. E. (1995) –Mammalian glutathione S-transferase: regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy, *Pharmacol. Ther.*, 66, 237-257.
- GULLSTEN, H., AGÚNDEZ, J.A.G., BENITÉS, J., LAARA, E., LADERO, J.M., DÍAZ-RUBIO, M., FERNANDEZ-SALGUERO, P., GONZALEZ, F., RAUTIO, A., PELKONEN, O. e RAUNIO HANNU (1997) –CYP2A6 gene polymorphism and risk of liver cancer and cirrhosis, *Pharmacogenesis*, 7, 247-250.
- GUM, J. R. AND STROBEL, H. W. (1979) –Isolation of the membrane-binding peptide of NADPH-cytochrome P450 reductase: Characterization of the peptide and its role in interaction of reductase with P450, *J. Biol. Chem.*, 254, 4177-4182.
- GUM, J. R. e STROBEL, H. W. (1981) –Isolation of the membrane-binding peptide of NADPH-cytochrome P450 reductase. Characterization of the peptide and its role in the interaction of reductase with cytochrome P450, *J. Biol. Chem.*, 256, 7478-7484.
- GUSTAFSSON, D. L., SWANSON, J. D. e PRISTOS, C. A. (1991) –Role of xanthine oxidase in the potentiation of doxorubicin-induced cardiotoxicity by mitomycin C, *Cancer Comm.*, 3, 299-308.
- GUT, J., RICHTER, C., CHERRY, R. J., WINTHERHALTER, K. H. e KAWATO, S. (1983) –Rotation of cytochrome P450. Complex formation of cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 Reductase in liposomes demonstrated by combining protein rotation with antibody-induced cross-linking, *J. Biol. Chem.*, 258, 8588-8600.
- GUZELIAN, P. S, LI, D., SCHUETZ, E.G., THOMAS, P., LEVIN, W., MODE, A. e GUSTAFSSON, J.-A. (1988) –Sex change in cytochrome P450 phenotype by growth hormone treatment of adult rat hepatocytes maintained in a culture system on matrigel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9783-9787.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. e JAKOBY, W. B. (1974) –Glutathione S-transferase: The first enzyme step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

- HABIG, W. H., PABST, M. J., FLEISCHER, G., GATAINAITAN, Z., ARIAS, I. M. e JAKOBY, W. B. (1974) –The identity of glutathione *S*-transferase B with ligandin a major binding protein of liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3879-3882.
- HALEY, T. J. (1987) –Absorption, distribution, conjugation e excretion of xenobiotics, in *Handbook of toxicology*, 20-43, 1<sup>st</sup> ed., Hemisphere Publishing Corporation, London.
- HALL, D. A. (1976) –Ageing of connective tissue, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press, London
- HALL, N. R. e GOLDSTEIN, A. L. (1983) –Role of thymosin and neuroendocrine system in the regulation of immunity, in *Immunoregulation*, 141-148, Plenum Press, New York.
- HALL, N.R., MCGILLIS, J.P., SPANGELO, B.L. e GOLDSTEIN, A.L. (1985) –Evidence that Thymosins and other biologic reponse modifiers can function as neuroactive immunotransmitters, *J. Immunol.*, 135, 806s-811s.
- HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M. (1989) –Oxygen and Poisons - an introduction to oxygen toxicity and free radicals, in *Free radicals in biology and medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- HARISCH, G. e MEYER, W. (1985) –Studies on tissue distribution of glutathione and on activities of glutathione-related enzymes after carbon tetrachloride-induced liver injury, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 47, 399-414.
- HARMAN D. (1993) –Free radical involvement in aging, *Drugs and Aging*, 3, 60-80.
- HARMAN, D. (1978) –Free radical theory of aging: nutritional implications, *Age*, 1, 145-152.
- HARMAN, D. (1992) –Free radical theory of aging history, in *Free radicals and aging*, 1-10, Emerit & Chance (Ed.), Basel.
- HASSELMAYER, E. G., MEYERS, M. B., CATZ, C. e LONGO, L. D. (1979) –Pregnancy and infant health, in *Smoking and health: A report of the surgeon general*, 1-93, U.S. GPO, Washington, D.C.
- HAYES, J. D. e PULFORD, D. J. (1995) –The glutathione *S*-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30, 445-600.
- HAYES, J. D., MCLEOD, R., PULFORD, D. J., JUDAH, D. J., NGUYEN, T, ARTHUR, J. R. e NEAL, G. E. (1996) –Regulation of rats class alpha glutathione *S*-transferases and the contribution of GST Yc<sub>2</sub> to resistance to aflatoxin B<sub>1</sub>, in *Glutathione S-transferases*, 73-87, Taylor and Francis, Bristol.
- HAYES, J. D.; JUDAH, D. J.; MCLELLAN, L. I. e NEAL, G. E. (1991) –Contribution of the glutathione *S*-transferases to the mechanism of resistance to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Pharmacol Ther.*, 50, 443-472.
- HE, J. S. e FULCO, A. J. (1991) –A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 genes of rodents and bacteria, *J. Biol. Chem.*, 266, 7864-7869.
- HEALY, D. L. (1983) –The thymus-adrenal connection: thymosin has corticotropin-releasing activity in primates, *Science*, 222, 1353-1360.
- HEINMEYER, G., NIGAM, S. e HILDEBRANDT, A. G. (1980) –Hexobarbital-binding, hydroxylation and hexobarbital dependent hydrogen peroxide production in hepatic microsomes of guinea pig, rat and rabbit, *Naunyn, Schmiedeberg's Arc. Pharmacol.*, 314, 201-215.
- HEISKANEN, K., LINDSTROM-SEPPE, P., HAATAJA, L., VAITTINEN, S.-L., VARTIAINEN, T. e KOMULAINEN, H. (1995) –Altered enzyme activities of xenobiotics

- biotransformation in kidneys after subchronic administration of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) to rats, *Toxicology*, 100, 121-128.
- HESSE, S., JERNSTROM, B., MARTINEZ, M., MOLDEUS, P., CHRISTODOULIDES, L. E KETTERER, B. (1982) –Inactivation of DNA - binding metabolites of benzo [ a ] pyrene e benzo [ a ] pyrene-7,8-dihydrodiol by glutathione and glutathione S-transferase, *Carcinogenesis*, 3, 757-760.
- HILDBRANDT, A. G., SPECK, M. e ROOTS, I. (1973) –Possible control of hydrogen peroxide production and degradation on microsomes during mixed function oxidatio reactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 968-976.
- HILDBRANDT, A., SPECK, M. e ROOTS, I. (1973) –Possible control of hydrogen peroxide formation and degradation in microsomes during mixed function oxidation reaction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 968-975.
- HIROI, T., MIYAZAKI, KOBAYASHI, IMAOKA, S. e FUNAE, Y. (1995) –Induction of hepatic P450s in rat by essential wood and leaf oils, *Xenobiotica*, 25, 457-467.
- HIROKAWA, K., UTSUYAMA, M., KASAI, M., KURASHIMA, C., ISHIJIMA, S. e ZENG, Y.-X. (1994) –Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation, *Immunol. Lett.*, 40, 269-277.
- HO, D. e FAHL, W. E. (1984a) –Quantitative significance of glutathione and glutathione S-transferase in regulating benzo[a]pyrene anti diol-epoxide levels in reconstituted C3H/10T1/2 cell lysates, and comparison to rat liver, *Carcinogenesis*, 5, 143-148.
- HO, D. e FAHL, W. E. (1984b) –Modification of glutathione levels in C3H/10TI/2 cell lysates, and comparison to rat liver, *Carcinogenesis*, 5, 143-148.
- HOLMES, J. L. e POLLENZ, R. S. (1997) –Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates, *Mol. Pharmacol.*, 52, 202-211.
- HONG, J., PAN, J., GONZALEZ, F. J., GELBOIN, H. V. e YANG, C. S. (1987) –The induction of a specific form of P450 (P450j) by fasting, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142, 1077-1089.
- HONKAKOSKI, P., MOORE, R., GYNTER, J. e NEGISHI, M. (1996) –Characterization of phenobarbital-inducible mouse cyp2b10 gene transcription in primary hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 271, 9746-9753.
- HONKAKOSKI, P., ZELKO, I., SUEYOSHI, T. e NEGISHI, M. (1998) –The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X recptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene, *Mol. Cell Biol.*, 18, 5652-5658.
- HOSOKAWA, M., FUJISAWA, H., BING-HUA, Z., JUJO, H. e HIGUCHI, K. (1997) –In vitro study of the mechanisms of senescence acceleration. *Experimental Gerontology*, 32, 197-203.
- IMAOKA, S., FUJITA, S. e FUNAE, Y. (1991) –Age-dependent expression of cytochrome P450s in rat liver, *Biochem. Biophys. Acta*, 1907, 187-192.
- IOANNIDES, C. e PARK, D.V. (1990) –The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in metabolic activation of chemicals, *Drug Metab. Rev.*, 22, 1-85.



- IRIZAR, A. e IOANNIDES (1995) –Extrahepatic expression of P450 proteins in insulin dependent diabetes mellitus, *Xenobiotica*, 25, 941-949.
- ISOGAI, M. SHIMADA, N. KAMATAKI, T., IMAOKA, S. e FUNAE, Y. (1993) –Changes in amounts of cytochrome P450 in rat hepatic microsomes produced by cyclosporin A, *Xenobiotica*, 23, 799-807.
- ISSMAN, I. e GREEN, S. (1990) –Activation of a member of steroid hormone receptor superfamilly by peroxisome proliferators, *Nature* (London), 347, 645-650.
- ITIO, M., KAWAGUCHI, H., SAKOTA, Y., OYONARI, J e NITAHARA, H. (1993) –Effects of Polyfenols, including flavonoids, on glutathione S-transferase and glutathione reductase, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 10, 1678-1680.
- IZAWA, S. (1977) –Inhibitors of electron transport, in *Photosynthesis I. Photosynthetic electron transport and photophosphorylation*, Springer-Verlag, New York.
- JAIN, S., DOLWICK, K.M., SCHMIDT, J. V. e BRADFIELD, C. A. (1994) –Potent transactivation domains of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini, *J. Biol. Chem.*, 269, 31518-31524.
- JAISWAL, A. K. (1994) –Antioxidant response element, *Biochemical Pharmacol.*, 48, 439-444.
- JAKOBSSON, P.-J., MANCINI, J. A., RIENDEAU, D. e FORD-HUTCHINSON, A. W. (1997) – Identification and Characterization of a novel microsomal enzyme with glutathione-dependent transferase and peroxidase activities, *J. Biol. Chem.*, 272, 22934-22939.
- JAKOBY, W. B. e ZIGLER, D. M. (1990) –The enzymes of detoxication, *J. Biol. Chem.*, 265, 20715-20718.
- JAKOBY, W. B., KETTERER, B. e MANNERVIK, B. (1984) –Glutathione transferases: nomenclature, *Biochem. Pharmacol.*, 33, 2539-2540.
- JAZWINSKI, S. M. (1996) –Longevity, genes, and aging, *Science*, 273, 54-59.
- JEFFERY, E. H. (1991) –Biochemical basis of toxicity, in *Handbook of toxicologic pathology*, 49-70, Academic Press, Inc, London.
- JERSTROM, B., BABSON, J. R., MOLDEUS, P., HOMGREN, P. e REED, D. J. (1982) – Glutathione conjugation and DNA binding of ( $\pm$ )-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo [a] pyrene e bezo [a] pyrene-7,8-dihydrodiol by glutathione and glutathione S-transferase, *Carcinogenesis*, 3, 757-760.
- JOCHEIM, C. M. e BAILLIE, T. A. (1994) –Selective and irreversible inhibition of glutathione rgductase in vitro by carbamate thioester conjugates of methyl isocyanate, *Biochem. Pharmacol.*, 47, 7, 1197-1206.
- JORDAN, L. S., ZURQIYAH, A. A., CLERX, W. A. e LEASCH, J. G. (1975b) Metabolism of terbacil in orange seedlings, *Arch. Contam. Toxicol.*, 3, 267-277.
- JORDAN, L. S., ZURQIYAH, A. A., MUR, A. R. e CLERX, W. A. (1975a) –Metabolism of siduron in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.), *J.Agric.Food Chem.*, 23, 286-292.
- JUCHAU, M. R., LEE, Q. P. e FANTEL, A. G. (1992) –Xenobiotic biotransformation/ bioactivation in organogenesis-stage conceptual-stage conceptual tissues: Implications for embriotoxicity and teratogenesis, *Drug Metab. Rev.*, 24, 195-238.
- JUCHAU, M.R. (1989) –Bioactivation in chemical teratogenesis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 29, 165-187.
- JUNG, K. e HENKE, W. (1996) –Developmental changes of antioxidant enzymes in kidney and liver from rats, *Free Rad.Biol.Med.* 20, 613-617.

- JUNG, K., KUHLE, S., KLOTZEK, S., BECKER, S. e HENKE, W. (1993) –Effect of storage temperature on the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase in rat liver and kidney homogenates, *Enz. Prot.*, 47, 149-155.
- KADLUBAR, F. F., MORTON, K. C. e ZIEGLER, D. M. (1973) –Microsomal catalyzed hydroperoxide-dependent C-oxidation of amines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54, 1225-1234.
- KAUKAUS, R. M., CHAN, W. K., LYSENKO, N., RAY, N., ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. e BASS, N. M. (1993) –Induction of peroxisomal fatty acid beta-oxidation and liver fatty acid-binding protein by peroxisome proliferators. Mediation via the cytochrome P450 IVA1 omega-hydroxylase pathway, *J. Biol. Chem.*, 5, 9593-9603.
- KALYANARAMAN, B., PEREZ-REYES, E., e MASON, R. P. (1980) –Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs, *Biochem. Biophys. Acta*, 630, 119-131.
- KAMATAKI, T., MAEDA, K., SHIMADA, M., KITANI, K. NAGAI, T. e KATO, R. (1985) –Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrom P450 in liver microsomes from male and female rats, *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 233, 222-228.
- KARARA, A., MAKITA, K., JACOBSSON, H.R., FALCK, J.R., GUENGERICH, F.P., DUBOIS, R.N. e CAPDEVILA, J.H. (1993) –Molecular cloning, expression and enzymatic characterization of the rat kidney-cytochrome P450 arachidonuc acid epoxygenase, *J.Biol.Chem.*, 268, 13565-13570.
- KARPLUS, P. A., KRAUTH-SIEGEL, R. L., SCHIRMER, R. H. e SCHULTZ, G. E. (1988) –Inhibition of human glutathione reductase by the nitrosourea drugs 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and 1-(2-chloroethyl)-3-(2-hydroxyethyl)-1-nitrosourea, A chritalographic analysis, *Eur. J. Biochem.* 171, 193-198.
- KASSAHUN, K., JOCHEIM, C. M. e BAILLIE, T. A. (1994) –Effect of carbamate thioester derivatives of methyl- e 2-chloroethyl isocyanate on glutathione levels and glutathione reductase activity in isolated hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.* 48, 3, 587-594.
- KATO, R., YAMAZOE, Y. e SHIMADA, M. (1986) –Effect of growth hormone and ecotopic transplantation of pituitary gland on sex-spacific forms of cytochrome P450 and testosterone and drug oxidations in rat liver, *J. Biochem.*, 100, 895-902.
- KELLER, H., DREYER, C., MEDIN, J., MAHFOUDI, A., OZATO, K. e WAHLI, W. (1993) –Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation od peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 90, 2160-2164.
- KENDAL, M.D. (1988) –Anatomical and Physiological factors influencing the thymic microenvironment, *Thymus Update*, 1, 27-65.
- KENNEDY, K. A., SLIGAR, S. G., POLONSKI, L. e SARTORELLI, A. C. (1982) Metabolic activation of mitomycin C by liver microsomes and nuclei, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 2011-2018.
- KENSLER, T. W., EGNER, P. A., DOLAN, P. M., GROOPMAN, J. D. e ROEBUCK, B.D. (1987) –Mechanism of oltripaz protection against aflatoxin tumorigenicity in rats fed 5-(2-pyranizyl)-4-methyl-1,2-dithiol-thione (oltripraz) and related 1,2-dithiol-3-thiones and 1,2-dithiol-3-ones, *Cancer Res.*, 47, 4271-4277.

- KESSEL, D. e WILBERDING, C. (1985) –Anthracycine resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists, *Cancer Res.*, 45, 1687-1691.
- KETTERER, B. (1980) –Interactions between carcinogens and proteins. *Brit. Medical Bull.*, 36, 71-78.
- KETTERER, B. (1996) –Fortunate Life, in *Glutathione S-transferase - Structure, function and clinical implications*, 17-24, Taylor and Francis, London.
- KETTERER, B. e MULDER, G. J. (1990) –Glutathione conjugation, in *Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach*, 307-364, Taylor & Francis, London.
- KETTERER, B., ROSS-MANSELL e WHITEHEAD, J. K. (1967) –The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethylaminoazobenzene, *Biochem. J.*, 103, 316-324.
- KIM, S. G., CHO, J. Y., CHUNG, Y. S., AHN, E.-T.; LEE, K.-Y. e HAN, Y.-B. (1998) – Suppression of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in rats by acriflavine, a protein kinase C inhibitor, *Drug Metab. Dispos.*, 26, 66-72.
- KIRBY, M. F. e SHEAHAN, D. A. (1994) –Effects of atrazine, isoproturon, and mecoprop on the Macrophyte *Lemna minor* and Alga *Scenedesmus subspicatus*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53: 120-126.
- KIRKWOOD, R. C. (1987) –Herbicides and plant growth regulators, in *Herbicides-Progress in pesticide biochemistry and toxicology*, vol 6, John Wiley & Sons, Chichester
- KIVISTO, K. T., KROEMER, H. K. e EICHELBAUM, M. (1995) –The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 40, 523-530.
- KLIEWER, S. A., FORMAN, B. M., BLUMBERG, B., ONG, E.S., BORGMAYER, U., MANGELDORF, D. J., UMESONO, K. e EVANS, R. M. (1994) –Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7355-7359.
- KO, K. M., IP, S. P., POON, M. K., WU, S. S., CHE, C. T., NG, K. H. e KONG, Y. C. (1995) –Effect of a lignan-enriched fructus Schisandrae extract on hepatic glutathione status in rats: Protection against carbon tetrachloride toxicity, *Planta Med.*, 61, 134-137.
- KOBAYASHI, Y., TOSHIDA, T., KOTANI, E., AOYAGI, KUROIWA, Y. e TOBINAGA, S. (1994) Involvement of testosterone in the induction of hepatic microsomal cytochrome P450 2B1/2(P4502B1/2) by 1-benzylimidazole in male and female rats: sex-diferentiated induction of P450 2B1/2 species, *Biochim. Biophys. Acta*, 1200, 11-18.
- KOCAREK, T. A., SCHUETZ, E. G. e GUZELIAN, P. S. (1994) –Biphasic regulation of cytochrome P450 2B1/2 mRNA expression by dexamethasone in primary cultures of adult rat hepatocytes maintained on matrigel, *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1815-1822.
- KOGA, N., INSKEEP, P. B., HARRIS, T. M. e GUENGERICH, F. P. (1986) –S-[2-(N<sup>7</sup>-guanyl)ethyl] glutathione, the major DNA adduct formed from 1,2-dibromoethane, *Biochemistry*, 25, 2192-2198.
- KOOP, D. R. (1992) –Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E2, *FASEB J.*, 6, 724-732.

- KOPPENOL, W. H., VAN BUUREN, K. J. H., BUTLER, J. e BRAAMS, R. (1976) –The kinetics of the reduction of cytochrome c by the superoxide anion radical, *Biochim, Biophys, Acta*, 449, 157-166.
- KORE, A.M., JEFFERY, E.H. e WALLIG, M.A. (1993) –Effects of 1-isothiocyanato-3-(methylsulfanyl)-propane on xenobiotic metabolizing enzymes in rats, *Fd. Chem. Toxicol.* 37, 723-729.
- KORTENHOFF, A. (1993) –Developments in the use of pesticides, in *Modern crop protection developments and perspectives*, Wageningen Pers, Wageningen.
- KOYMANS, L. DONNÉ-OP DEN KELDER, G. M.; TE KOPPELE, J. M. e VERMEULEN, N. P. E. (1993) –Cytochromes P450: Their active-site structure and mechanism of oxidation, *Drug Metab. Rev.*, 25, 325-348.
- KROEMER, H. K. e EICHELBAUM, M. (1995) –It's the gene, stupid. molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism, *Life Science*, 56, 2285-2298.
- KROETZ, D. L.; HUSE, L. M.; THURESSON, A. e GRILLO, M.P. (1997) –Developmentally regulated expression of CYP4A in the spontaneously hypertensive rat kidney, *Mol. Pharmacol.*, 52, 362-372.
- KUMATA, H., WAKUI, K., SUZUKY, H., SUGAWARA, T., LIM, I., OTSUKI, M., OZEKI, T. MIURA, K. e YAMAGATA, S. (1975) –Glutathione reductase activity in serum and liver tissue of human and rat with hepatic damage, *Tohoku, J.Exp. Med.*, 116, 127-132.
- KYLE, M. E. e FARBER, J. L. (1991) –Biochemical mechanisms of toxic cell injury, in: *Handbook of toxicologic pathology*, 71-89, Academic Press, Inc, London.
- LAKE, B. G. (1987) –Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism, in *Biochemical Toxicology - A practical approach*, 1<sup>st</sup> ed., IRL Press, Oxford.
- LASH, L. H., QIAN, W., PUTT, D. A.; JACOBS, K., ELFARRA, A. A., KRAUSE, R. J. e PARKER, J. C. (1998) –Glutathione conjugation of trichloroethylene in rats and mice: sex-, species-, and tissue-dependent differences, *Drug. Metab.Dispos.*, 26, 12-19.
- LASH, L.H., XU, Y., ELFARRA, A.A., DUESCHER, R.J. e PARKER, J.C. (1995) – Glutathione-dependent metabolism of trichloroethylene in isolated liver and kidney cells of rats and its role in mitochondrial and cellular toxicity, *Drug Metabol. Dispos.* 23, 846-853.
- LEADER, R.W. (1991) –Toxicologic Pathology: an introduction, in *Handbook of toxicologic pathology*, 1-8, Academic Press, Inc, London.
- LEE, S. S. e FANG, S. C. (1973) –Metabolism of monuron in excised leaves on corn and bean plants, *Weed Res.*, 13, 59-66.
- LEE, P. N. (1988) –*Statistics in: Experimental toxicology*, 377-412, 1<sup>st</sup> ed., Royal Society of Chemistry, London.
- LEE, Q.P., FAUTEL, A.G. e JUCHAU, M.R. (1991) –Human embryonic cytochrome P450s: phenoxazone ethers as probes for expression of functional isoforms during organogenesis, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 2377-2385.
- LEE, S. S. e ISHIZUKA, K. (1976) –A mode of selective action of thiadiazolyl urea herbicides, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 4, 155-165.
- LEVIN, W., THOMAS, P. E., RYAN, D. E. e WOOD, A. W. (1987) –Isozyme specificity of testosterone 7 $\alpha$ -hydroxylation in rat hepatic microsomes: Is Cytochrome P450a the sole catalyst?, *Arch. Biochem. Biophys.*, 258, 630-635.

- LEWIN, B. (1994) *Genes V*, Oxford University Press, Oxford.
- LEWIS, A. D., HICKSON, I. D., ROBSON, C. N., HARRIS, A. L., HAYES, J. D., GRIFFITHS, S. A., MANSON, M. M., HALL, A. E., MOSS, J. E. e WOLF, C. R. (1988) – Amplification and increased expression of alpha class glutathione *S*-transferase-encoding genes associated with resistance to nitrogen mustards, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 8511-8515.
- LEWIS, D. F. V., IONNIDES, C. E PARKE, D. V. (1989) –Molecular orbital studies of oxygen activation and mechanisms of cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of xenobiotics, *Chem. Biol. Interact.*, 70, 263-272.
- LI, H., DONG, L. e WHITLOCK, J. P. JR. (1994) –Transcriptional activation function of the mouse Ah receptor nuclear translocator. *J. Biol. Chem.*, 269, 28098-28105.
- LI, H.-C., MANI, C. e KUPFER D. (1993) –Reversible and time-dependent inhibition of the hepatic cytochrome P450 steroidal hydroxylases by the proestrogenic pesticide methoxychlor in rat and human, *J. Biochem. Toxicol.* 8, 195-206.
- LI, L. ZHOU, J. H., XING, S. T. e LAU, B. H. S. (1993) Thymus-neuroendocrine-liver pathway, *Medical Hypotheses*, 41, 470-472.
- LI, L., ZHOU, J. H., XING, S. T. (1991) –Changes of hepatic microsomal mixed-function oxidase and plasma sex hormone levels in adult thymectomized rats and age rats, *Chinese J. Appl. Physiol.*, 7, 105-111.
- LI, Y. E JAISWAL, A. K. (1992) –Regulation of human NAD(P)H-quinone oxidoreductase gene-role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element, *J. Biol.Chem.*, 267, 15097-15104.
- LIANG, Q., HE, J.-S. e FULCO, A.J. (1995) –The role of barbie box sequences as cis-acting elements invoved in barbiturate-mediated induction of cytochromes P450<sub>BM-1</sub> e P450<sub>BM-3</sub> in *Bacillus megaterium*, *J.Biol.Chem.*, 3, 4438-4450.
- LIN, D., MEYER, D. J., KETTERER, B., LANG, N. P. e KADLUBAR, F. (1994) –Effects of human and rat glutathione *S*-transferases on the covalent DNA binding of the *N*-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: A possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis, *Cancer Res.*, 54, 4920-4926.
- LINDAMOOD, C. (1991) –Xenobiotic biotransformation, in *Hepatotoxicology*, 139-180, CRC Press, Boca Raton, FL.
- LINDROS, K. O. (1997) –Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver, *Gen. Pharmacol.*, 28, 2, 191-196.
- LIPSITZ, L. A. e GOLDBERGER, A. L.(1992) –Loss of “complexity” and Aging, *JAMA*, 267, 1806-1809.
- LIU, Z., MORTIMER, O., SMITH, C. A. D., WOLF, C. R. e RANE, A. (1995) –Evidece for a role of cytochrome P450 2D6 e 3A4, in ethylmorphine metabolism, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 39, 77-83.
- LOHR, J. W., WILSKY, G. R. E ACARA, M. A. (1998) –Renal drug metabolism, *Pharmacol. Rev.*, 50, 107-142.
- LOPEZ-BAREA, J. e LEE, C. Y. (1979) – Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation, *Europ. J. Biochem.* 98, 487-496.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, J., FARR, A. L. e RANDALL, R. J. (1951) –Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Lu, F. C. (1992) –*Toxicologie-Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque*, 2<sup>ème</sup> édition , Masson, Paris

- LUKE, B. T., LOWE, G. H. e MCLEAN, A. D. (1987) –Theoretical investigations of the anaerobic reduction of halogenated alkanes by cytochrome P450. I Structure, inversion barriers, and heats of formation of halomethyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 1307-1315.
- LUSTER, M.I., ACKERMAN, M.F., GERMOLEC, D.R. e ROSENTHAL, G.J. (1989) – Perturbations of the immune system by xenobiotics, *Environ.Health Perspect.*, 81, 157-162.
- LYTTLE, M. H., HOCKER, M. D., HUI, H. C., CALDWELL, C. G., AARON, D. T.; ENGQVIST-GOLDSTEIN, A., FLATGAARD, J. E. e BAUER, K. E. (1994a) Isozyme-specific glutathione *S*-transferase inhibitors: design and synthesis, *J. Med. Chem.*, 37, 189-194.
- LYTTLE, M. H., SATYAM, A., HOCKER, M. D., BAUER, K. E., CALDWELL, C. G., HUI, H. C., MORGAN, A. S., MERGIA, A. e KAUVAR, L. M. (1994b) glutathione *S*-transferase activates novel alkylating agents, *J. Med. Chem.*, 37, 1501-1507.
- MACCALLUM, G. P., HORTON, J. E., FALKNER, K. C. e BEND, J. R. (1993) –Microsomal cytochrome P4501A1 dependent monooxygenase activity in guinea pig heart: induction, and increased activity by addition of exogenous NADPH-cytochrome P450 reductase, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71, 151-156.
- MACGEOCH, C., MORGAN, E. T. e GUSTAFFSON, J.-A. (1985) –Hypothalamo-pituitary regulation of cytochrome p450 15 $\beta$  apoprotein levels in rat liver, *Endocrinology*, 117, 6, 2085-2092.
- Machado, C. (1992) –*Herbicidas para cereais (aveia, centeio, cevada, trigo e triticale)*, Ministério da Agricultura - Divisão de Infestantes, Centro Nacional de Protecção da Produção Agrícola, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Oeiras.
- MAEDA, Y., MORITA, K. TASAKI, T., KASUZAKA, A., IMAOKA, S., FUNAE, Y. e FUJITA, S. (1997) –Strain differences in age-associated change in testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation in Wistar and Dark Agouti rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 3, 1-6.
- MAHGOUB, A., IDLE, J. R., DRING, L. G., LACESTER, R. e SMITH, R. L. (1977) Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man, *Lancet*, II, 584-586.
- MAIER-BODE, H. e HARTEL, K. (1981) –Linuron e monuron, *Res.Rev.*, 77, 3-238.
- MANAHAN, S. E. (1990) –*Hazardous waste chemistry, toxicology*, 1<sup>st</sup> ed., Lewis Publishers, Chelsea.
- MANHORAN, T. H., PULCHALSKY, R. B., BUGESS, J. A., PICKETT, C. B. e FAHL, W. E. (1987) –Promotor-glutathione *S*-transferase Ya cDNA hybrid genes. Expression and conferred resistance to an alkylating agent in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 262, 3739-3745.
- MANNERVIK, B. (1985) –The isoenzymes of glutathione *S*-transferase, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 57, 357-417.
- MANNERVIK, B. e DANIELSON, U. H. (1988) –Glutathione transferases-structure and catalytic activity, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283-337.
- MANNERVIK, B., ALIN, P., GUTHENBERG, C., JENSSON, H., TAHIN, M.K., WARHOLM, M. e JORNVALL, H. (1985) –Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structure data and enzymatic properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 7202-7206.
- MANNERVIK, B., AWASTHI, Y. C., BOARD, P. G., HAYES, J. D., DI ILIO, C. KETTERER, B., LISTOWOSKI, I., MORGENSTERN, R., MURAMATSU, M., PEARSON, W. R.,



- PICKETT, C. B., SATO, K., WIDESTEN, M. e WOLF, C. R. (1992) –Nomenclature for human glutathione *S*-transferases, *Biochem. J.*, 282, 305-308.
- MANNO, M., CAZZARO, S. e REZZADORE, M. (1991) –The mechanism of the suicidal reductive inactivation of microsomal cytochrome P450 by halothane, *Arch. Toxicol.*, 65, 191-202.
- MANNO, M., FERRARA, R., CAZZARO, S., RIGOTTI, P. e ANCONA, E. (1992) –Suicidal inactivation of human cytochrome P450 by carbon tetrachloride and halothane *in vitro*, *Pharmacol. Toxicol.*, 32, 13-28.
- MAPSON, L. W. e GODDARD, D. R. (1951) –The reduction of glutathione by plant tissues, *Biochem. J.*, 49, 592-601.
- MARTIN, C. N. (1981) –Rat liver microsomal azoreductase activity of four azodyes derived from benzidine, 3,3-methylbenzidine or 3,3-dimethoxybenzidine, *Carcinogenesis*, 2, 307-319.
- MASIALOU, E., EKSTROM, G., ADANG, A. E. P. e MORGENSTERN, R. (1993) –Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.*, 45, 1645-1651.
- MASON, G. G., WITTE, A. M., WHITELAW, M. L., ANTONSSON, C., MCGUIRE, J., WILHELMSSON, A., POELLINGER, L. e GUSTAFSSON, J. A. (1994) –Purification of the DNA binding form of dioxin receptor. Role of the Arnt cofactor in regulation of dioxin receptor function, *J.Biol.Chem.*, 269, 4438-4449.
- MASUDA, M., NUKUZUMA, C., KASUZAKA, A. e FUJITA, S.(1995) –Alterations in activation and deactivation of mutagens in aging rat liver, *J.Geront.*, 50A, 5, B303-B306.
- MATERS, B. S. S., MCMILLAN, K., SHETA, E. A., NISHIMURA, J. S., ROMAN, L. J. e MARTASEK, P. (1986) –Neuronal nitric oxide synthase, a modular enzyme formed by convergent evolution: structure studies of a cysteine thiolate-ligated heme protein that hydroxylates L-arginine to produce NO as a cellular signal, *FASEB J.*, 10, 552-564.
- MATHYS, W. (1994) –Pesticide pollution of ground and public drinking waters caused by artificial groundwater recharge or bank filtration: underestimated sources for water contamination. *Zentralblatt-fur-Hygiene und Umweltmedizin*, 196: 4, 338-359.
- MCCALLUM, G.P., HORTON, J.E., FALKNER, K.C. e BEND, J.R. (1992) –Microsomal cytochrome P450 1A1 dependent monooxygenase activity in guinea pig heart.induction, inhibition, and increased activity by addition of exogenous NADPH-cytochrome P450 reductase, *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, 71, 151-156.
- MCCLEARN, G. E. (1997) –Biogerontologic Theories, *Exp. Gerontol.*, 32, 1, 3-10.
- MCCONKEY, D.J. e ORRENIUS, S. (1989) –2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) kills glucocorticoid-sensntive thymocytes *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160, 1003-1008.
- MCCORD, J. M. e FRODOVICH, I. (1988) –Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988), *Free Rad.Biol.Med.*, 5, 363-370.
- MCGUIRE, J., COUMAILLEAU, P., WHITELAW, M. L., GUSTAFSSON, J.-A. e POELLINGER, L. (1996) –The basic helix-loop-helix/PAS factor Sim is associated with hsp90 - implications for regulation by interaction with partner factors, *J .Biol. Chem.*, 270, 31353-31357.

- MCKEE, T. e MCKEE, J. R. (1996) –*Biochemistry - an introduction*, 1<sup>st</sup> ed., WCB Publishers, London.
- MCLEAN, M. e DUTTON, M.F. (1995) –Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update, *Pharmacol. Ther.*, 65, 163-192.
- MEDVEV, Z. A. (1990) –An Attempt at a rational classification of theories of aging, *Biol. Rev.*, 65, 375-398.
- MEYER, D. J., COLES, B., PEMBLE, S. E., GILMORE, K. S., FRASE, G. M. e KETTERER, B. (1991) –Theta, a new class of GST purified from rat an man, *Biochem. J.*, 274, 409-414.
- MEYER, D.J., HARRIS, J.M., GILMORE, K.S., COLES, B., KENSLER, T.W. e KETTERER, B. (1993) –Quantification of tissue-specific and sex-specific induction of rat GSH transferase subunits by dietary 1,2-dithiole-3-thiones, *Carcinogenesis*, 14, 567-572.
- MEYER, U. A. (1996) –Overview of enzymes of drug metabolism, *J. Pharmacokinet. Biopharmaceut.*, 24, 449-459.
- MEYER, U. A. e ZANGER, U. M. (1997) –Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 269-296.
- MILLER, E. C. e MILLER, J. A. (1966) –Mechanisms of Chemical Carcinogenesis: nature of proximate carcinogens and interactions with macromolecules, *Pharmacol. Rev.*, 18, 805-863.
- MILLER, J. F. A. P. (1994a) The Thymus: Maestro of the immune system, *BioAssays*, 16, 7, 509-513.
- MILLER, J. K. e BOLLA, R. (1981) –Influence of steroid hormone-receptor-protein complexes on initiation of ribonucleic acid synthesis in liver nuclei isolated from rats of various ages, *Biochem. J.*, 196, 373-375.
- MILLER, M. S. (1994b) –Transplacental lung carcinogenesis: A pharmacogenetic mouse model for the modulatory role of cytochrome P450 1A1 on lung cancer initiation, *Res. Chem.Toxicol.*, 7, 471-481.
- MILLER, R.A. (1996) –The aging immune system: Primer and prospectus, *Science*, 273, 70-74.
- MILLER, R.K., KELLOGG, C.K. e SALTZMAN, R.A. (1987) –Reproductive and perinatal toxicology, in *Hanbook of toxicology*, 195-309, 1st ed., Hemisphere Publishing Corporation, London.
- MILLER, M. S., JUCHAU, M. R., GUENGERICH, F. P., NEBERT, D. W. e RAUCY, J. L. (1996) –Drug metabolizing enzymes in developmental toxicology, *Fundamental Appl. Toxicol.*, 34, 165-175.
- MIMNAUGH, E. G., TRUSH, M. A. e GRAM, T. E. (1986) –A possible role for membrane lipide peroxidation in anthracycline nephrotoxicity, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 4327-4339.
- MOODY, D. E., REDDY, J. K., LAKE, B. G., POPP, J. A. e ROSE, D. H. (1991) – Peroxisome proliferation and nongenotoxic carcinogenesis: commentary on a symposium, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 16, 233-248.
- MOREL, F., FARDEL, O., MEYER, D. J., LANGOUET, S., GILMORE, K. S., FRASER, G. M. e KETTERER, B. e GUILLOUZO, A. (1993) –Preferential increase of glutathione S-transferase classe  $\alpha$  transcripts in cultured human hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholantrene and dithiole-thiones, *Cancer Res.*, 53, 231-234.



- MORELAND, D. E. e HILTON, J. L. (1976) –*Actions in photosynthetic systems, in Herbicides: physiology, biochemistry, ecology*, 1<sup>st</sup> ed., Vol I, Academic Press, London.
- MORGAN, E. T., MACGEOCH e GUSTAFSSON, J.-A. (1985) –Hormonal and developmental regulation of expression of the hepatic microsomal steroid 16 $\alpha$ -hidroxilase cytochrome P450 apoprotein in the rat, *J. Biol. Chem.*, 260, 11895-11898.
- MORGENSTERN, R., MELJER, J., DEPIERRE, J.W. e ERNESTER, L. (1980) –Characterization of rat-liver microsomal glutathione *S*-transferase activity, *Eur. J. Biochem.*, 104, 167-174.
- MORGENTERN, R. e DEPIERRE, J. W. (1988) –Membrane bound glutathione transferases, in *Glutathione S-conjugation. Mechanisms and biological significance*, 157-174. Academic Press, London.
- MOSCOW, J. A., TOWNSEND, A. J. e COWAN, K. H. (1989) –Elevation of  $\pi$  class glutathione *S*-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of GST  $\pi$  gene and its effects on sensitivity to toxins, *Mol. Pharmacol.*, 36, 22-28.
- MROSOVSKY, N.(1990) –*Rheostasis, The physiology of change*, 1<sup>st</sup> ed., Oxford University Press, New York.
- MUDD, P. J., HANCE, R. J. e WRIGHT, S. J. L. (1983) –The persistence and metabolism of isoproturon in soil, *Weed Research*, 23, 239-246.
- MUKAI, S., MORIO, M., FUJI, K. e HANAKI, C. (1977) –Volatile metabolites of halothane in rabbit, *Anesthesiology*, 47, 248-256.
- MULDER, G. J. (1986) –Sex differences in drug conjugation and their consequences for drug toxicity, sulfation, glucuronidation and glutathione conjugation, *Chem. Biol. Interact.*, 57, 1-15.
- MULDER, G. J. e OUWERKERK-MAHADEVAN, S. (1997) –Modulation of glutathione conjugation in vivo: how to decrease glutathione conjugation in vivo or in intact cellular systems in vitro, *Chem. Biol. Interact.* 105, 17-34.
- MURAYAMA, N., SHIMADA, M. YAMAZOE, Y. e KATO, R. (1991) –Difference in the susceptibility of two phenobarbital inducible forms, P450 IIB1 e P450IIB2, to thyroid hormone and growth hormone-induced P450 IIB2 supression by thyroid hormone acting directly, but not through the pituitary system, *Mol. Pharmacol.*, 39, 811-817.
- MURRAY, M , ZALUZNY, L. , CANTRILL, E. e FARRELL, G. C. (1987) –Different effects of short- and long-term dietary choline-deficiency on hepatic microsomal phospholipids and drug oxidation, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2, 27-33.
- MURRAY, M. (1991) –In vitro and in vivo studies of the effect of vitamin E on microsomal cytochrome P450 in rat liver, *Biochem. Pharmacol.*, 42, 11, 2107-2114.
- MURRAY, M. e HORSFIELD, B. P. (1990) 17 $\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase activity: Age-dependent profile in the rat liver and kinetics properties of the hepatic microsomal enzyme in relation to cytochrome P450-dependent steroid hydroxylation, *J. Steroid Biochem.*, 36, 569-574.
- MURRAY, M., ZALUZNY, L. e FARRELL, G. C. (1987) –Impaired androgen 16- $\alpha$ -hydroxylation in hepatic microsomes from carbon tetrachloride-cirrhotic rats, *Gastroenterology*, 93, 141-147.
- MURRAY, M., ZALUZNY, L., DANNAN, G. A., GUENGERICH, F. P. e FARRELL, G. C. (1986) –Altered regulation of cytochrome P450 enzymes in choline deficient cirrhotic male rat liver: impaired regulation and activity of the male-specific

- androst-4-ene-3,17-dione 16- $\alpha$ -hydroxylase, cytochrome P450<sub>UT-A</sub>, in hepatic cirrhosis, *Mol. Pharmacol.*, 31, 117-121.
- NABER, H. (1993) –*Recent developments in herbicides, in Modern crop protection developments and perspectives*, 1<sup>st</sup> ed., Wageningen Pers, Wageningen.
- NAKAMURA, Y., OHTAKI, S., MAKINO, R., TANAKA, T. e ISHIMURA, Y. (1989) – Superoxide anion in the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, 264, 4759-4777.
- NASH, T. (1953) –The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem. J.*, 55, 416-421.
- NASHED, R. B. e ILNICKI, R. D. (1970) –Absorption, distribution and metabolism of linuron in corn, soybean and crabgrass, *Weed Sci*, 18, 25-28.
- NASTAICZYK, W. e ULLRICH, V. (1978) –Effect of oxygen concentration on the reaction of halothane with cytochrome P450 in liver microsomes and isolated perfused rat, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 387-398.
- NATIO, A., ANIYA, Y. e SAKANASHI, M. (1994) –Antioxidative Action of the nitrovasodilator nicorandil: inhibition of oxidative action of liver microsomal glutathione S-transferase and lipid peroxidation, *Japan. J. Pharmacol.*, 65, 209-213.
- NEBERT, D. W., NELSON, D. R., ADESNIK, M., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., GONZALEZ, F. J., GUENGERICH, F. P., GUNSALUS, I. C., JOHNSON, E. F., KEMPER, B., LEVIN, W., PHILLIPS, I. R., SATO, R. e WATERMAN, M. R. (1989) – The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci, *DNA*, 8, 1-23.
- NEBERT, D. W., NELSON, D. R., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., FEYERREISEN, R., FUJI-KURAIYAMA, GONZALEZ, F. J., GUENGERICH, F. P., GUNSALUS, I. C.; JOHNSON, E. F., LOPER, J. C.; SATO, R., WATERMAN, M. R. e WAXMAN, D. J. (1991) –The superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature, *DNA Cell Biol.*, 10, 1-28.
- NELSON, D. R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D. J., GUENGERICH, F. P., ESTABROOK, R. W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F. J., COON, M. J., GUNSALUS, I. C., GOTOH, O., OKUDA, K. e NEBERT, D. W. (1993) –The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature, *DNA Cell Biol.* 12, 1-51.
- NELSON, D. R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGMAN, J. J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D. J., WATERMAN, M. R., GOTOH, O., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., GUNSALUS, I. C. e NEBERT, D. W. (1996) –P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics*, 6, 1-42.
- NGUYEN, T., RUSHMORE, T. H. e PICKETT, C. B. (1994) –Transcriptional regulation of a rat liver glutathione S-transferase Ya subunit gene, Analysis of the antioxidant response element and its activation by phorbol ester 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetate, *J. Biol. Chem.*, 269, 13656-13662.
- NICOLLI-GRIFFITH, GUPTA, N., TWA, S. P., WILLIAMS, H., TRIMBLE, L. A. e YERGEY, J. A. (1995) –Verkulast (MK-0679) conjugation with glutathione by rat liver and kidney cytosols and excretion in the bile, *Drug. Metab. Dispos.*, 23, 1085-1093.
- NISHIDA, K., OHTA, Y., KONGO, M. e ISHIGURO, I. (1996) –Response of endogenous reduced glutathione through hepatic glutathione redox cycle to enhancement of

- hepatic lipid peroxidation with the development of acute liver injury in mice intoxicated with carbon tetrachloride, *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 93, 2, 198-218.
- NONAKA, Y., MATSUKAWA, N., MOROASHI, K., OMURA, T., OBIGHARA, T., TERAOKA, H. e OKAMOTO, M. (1989) –Molecular cloning and sequence analysis of c-DNA encoding rat adrenal cytochrome P450 11 $\beta$ , *Febs Lett.*, 255, 21-26.
- NUNES, J.C. (1994) -Guia dos produtos fitofarmacêuticos, Ministério da Agricultura, Oeiras.
- O'DWYER, P J., LACRETA, F., NASH, S., TINSLEY, P. W., SCHILDER, R., CLAPPER, M. L., TEW, K. D., PANTING, L., LITWIN, S., COMIS, R. L. e OZOLS, R. F. (1991) – Phase I study of thiotepa in combination with the glutathione transferase inhibitor ethacrinic acid, *Cancer Res.*, 51, 6059-6065.
- ODOM, A.L., HATWIG, C.A., STANLEY, J.S. e BENSON, A.M. (1992) –Biochemical determinants of adriamycin toxicity in mouse liver, heart and intestine, *Biochem. Pharmacol.*, 43, 831-844.
- OHISHI, N., IMAOKA, S. e FUNAE, Y. (1994) –Changes in content of P450 Isozymes in hepatic and renal microsomes of the male rat treated with cis-diaminedichloro-platinum, *Xenobiotica*, 24, 873-880.
- OHITA, Y., SASAKI, N., NISHIDA, K., KOBAYASHI, T., NAGATA, M. e ISHIGURO, I. (1995) Preventive effect of Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang) extract on disrupted hepatic active oxygen metabolism in rats wit carbon tetrachloride-induced liver injury, *Am. J. Clin. Med.*, 23, 53-64.
- OINONEN, T. e LINDROS, K. O. (1995) –Hormonal regulation of the zonated expression of cytochrome P450 3A in rat liver, *Biochem. J.*, 309, 55-61.
- OINONEN, T. e LINDROS, K.O. (1998) –Zonation of hepatic cytochrome P450 expression and regulation, *Biochem. J.*, 329, 17-35.
- OINONEN, T., NIKKOLA, E. e LINDROS, K.O. (1993) –Growth hormone mediates zone-specific gene expression in liver, *FEBS Lett.*, 237, 237-240.
- OKEY, A. B. (1990) –Enzyme induction in the cytochrome P450 system, *Pharmacol. Ther.*, 45, 241-298.
- OKITA, R. T. e MASTERS, B. S. S., (1997) –Biotransformations: The cytochromes P450, in *testbook of Biochemistry with clinical correlations*, 981-998, 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc, New York.
- OLIVIER, M.F., DUTERTRE-CATELLA, THEVENIN, M., MARTIN, C., WARNET, J.-M. e CLAUDE, J.-R. (1990) –Increased reduced glutathione and glutathione S-transferase activity in Chronic cephaloridine nephrotoxicity studies in the rat, *Drug Chem. Toxicol.*, 13, 209-219.
- OMURA, T. e SATO, R. (1964a) –The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, I.Evidence for its hemoprotein nature, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2379.
- OMURA, T. e SATO, R. (1964b) –The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes, II.Solubilization, purification and properties, *J. Biol. Chem*, 237, 1375-1376.
- ORGEL, L. E. (1973) –Ageing of Clones of mammalian cells, *Nature*, 243, 441-445.
- ORLANDO, D., JOUY, L. e CITRON, G. (1994) –*Cereals: late weed control in 1993-1994*. Cultivar-Paris, 368, 32-33.
- ORTIZ DE MONTELLANO (1995) –*Cytochrome P450. Structure, mechamisms and biochemistry*, 1<sup>st</sup> ed., Plenum Press, New York.

- ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. (1986) –Cytochrome P-450, structure, mechanisms and biochemistry. Plenum Press, New York.
- OTIENO, M.A., RAYMOND, B. B., HAYES, J. D. e ANDERS, M. W. (1997) – Immunolocalization of microsomal glutathione S-transferase in rat tissues, *Drug Metab. Dispos.*, 25, 12-27.
- OUWERKERK-MAHADEVAN, S., TIRONA, R. G., RIPPING, R. A., PLOEMEN, J. H. T. M., VAN BLADEREN, P.J., PANG, K. S., VAN BOOM, J. H. e MULDER, G. J. (1997) – Inhibition of glutathione conjugation by glutathione analogues in the perfused rat liver, *Drugs Metab. Dispos.*, 25, 1137-1152.
- OUWERKERK-MAHADEVAN, S., VAN BOOM, J. H. e MULDER, G. J. (1996) –Isoenzyme-selective inhibition of glutathione conjugation in vivo: Selective inhibition of the conjugation of S-2-bromoisovalerylurea in rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276, 923-928.
- OUWERKERK-MAHADEVAN, S., VAN BOOM, J. H., DREEF-TROMP, M. C., PLOEMEN, J. H. T. M., MEYER, D. J. e MULDER, G. J. (1995) –Glutathione analogues as novel inhibitors of rat and human glutathione S-transferases isoenzymes, as well as of glutathione conjugation in isolated rat hepatocytes and in rat in vivo, *Biochem. J.*, 308, 283-290.
- PAINTAUD, G., BECHTEL, Y., BRIENTINI, M.-P., MIGUET, J.-P. e BECHTEL, P. R. (1996) –Effects of liver diseases on drug metabolism, *Thérapie*, 51, 384-389.
- PALMER, C. N., HSU, M. H., MUERHOFF, A. S., GRIFFIN, K. J. e JOHNSON, E. F. (1994) –Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-2-binding site in the CYP4A6 promoter, *J. Biol. Chem.*, 269, 18083-18089.
- PALMER, C. N. A., HSU, M.-H., GRIFFIN, K. J., RAUCY, L. e JOHNSON, E. F. (1998) – Peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  expression in human liver, *Mol. Pharmacol.* 53, 14-22.
- PALMER, G. e REEDIK, J. (1989) –Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) of electron-transfer proteins. Recommendations, *Biochim. Biophys. Acta*, 1060, 599-611.
- PARK, C. S., LI, L. e LAU, B. H. S. (1994) –Thymic peptide modulates glutathione redox cycle and antioxidant enzymes in macrophages, *J. Leuk. Biol.*, 55, 496-500.
- PARK, Y., LI, H. e KEMPER, B. (1996) –Phenobarbital induction mediated by a distal CYP2B2 sequence in rat liver transiently transfected in situ, *J. Biol. Chem.*, 271, 23725-23728.
- PARKINSON, A.(1996) –Biotransformation of xenobiotics, in *Casarett and Doulls Toxicology: The basic Science of Poisons*, 113-186, McGraw-Hill, New York.
- PARKINSON, A., RYAN, D. E., THOMAS, P. E., JERINA, D. M., SAYER, J. M., VAN BLADEREN, P. J., HANIU, M., SHIVELY, J. E. e LEVIN, W. (1986) –Chemical modification and inactivation of rat liver microsomal cytochrome P450c by 2-bromo-4'-nitroacetofenona, *J. Biol. Chem.*, 261, 11478-11489.
- PEARSON, P. G., SLATER, J. G., RASHED, M. S., HAN, D-H. e BAILLIE, T. A. (1991) – Carbamoylation of peptides and proteins in vitro by S-(N-methylcarbamoyl) glutathione and S-(N-methylcarbamoyl) cysteine, two electrophilic S-linked conjugates of methyl isocyanate, *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 436-444.

- PELKONEN, O. (1985) –Fetoplacental biochemistry - xenobiotic metabolism and pharmacokinetics, in *Occupational hazards and reproduction*, 113-126, Hemisphere, Washington, DC.
- PEMBLE, S. E. e TAYLOR, J. B. (1994) –An evolutionary perspective on glutathione transferase inferred from class - Theta glutathione transferase cDNA sequences, *Biochem. J.*, 287, 957-963.
- PEMBLE, S. F., TAYLOR, J. B., CRAIG, R. K. e KETTERER, B. (1986) –Differential tissue expression of the glutathione S-transferase multigene family, *Biochem. J.*, 238, 373-378.
- PENNINCKX, M. J. e ELSKENS, M. T. (1993) –Metabolism and function of glutathione in micro-organisms, *Adv. Mic. Physiol.*, 34, 239-301.
- PÉREZ, J. M., GARCIA, B. e TADEO, J. L. (1991) –Determination of Chloroturon, isoproturon and metoxuron in soil by GLC-NPD and confirmation using GLC-MS, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 339: 413-416.
- PETERSON, J. A., EBEL, R. E. e O'KEEFFE, D. H. (1978) –*Methods in Enzymology*, 52, Academic Press, New York.
- PETERSON, J. A., EBEL, R. E., O'KEEFFE, D. H., MATSUBARA, T. e ESTABROOK, R. W. (1976) –Temperature dependence of cytochrome P450 reduction. A model for NADPH-cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 interaction, *J. Biol. Chem.*, 251, 4010-4015.
- PHILLIPS, T. J. (1997) –Behavior genetics of drug sensitization, *Crit. Rev. Neurobiol.*, 11, 1, 21-33.
- PINKUS, R., WEINWER, L. M. e DANIEL, V. (1995) –Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression, *Biochemistry*, 34, 81-88.
- PINOT, F., GRANT, D. F., SPEAROW, J. L., PARKER, A. G. e HAMMOCK, B. D. (1995) –Differential regulation of soluble epoxide hydrolase by clofibrate and sexual hormones in the liver and kidneys of mice, *Biochem. Pharmacol.*, 50, 4, 501-508.
- PINTO, M. C., MATA, A. M. e LOPEZ-BAREA, J. (1985) –The redox interconversion mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase, *Europ. J. Biochem.*, 151, 275-281.
- PITOT, H.C. e HEIDELBERGER, C. (1964) –Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis, *Cancer Res.*, 23, 1694-1700.
- POLAND, A. e KNUTSON, J.C. (1982) –2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity, *Ann. Rev. Pharmacol., Toxicol.*, 22, 517-554.
- POPP, J.A. e CATLEY, R.C. (1991) –Hepatobiliary system, in *Handbook of toxicologic Pathology*, 279-314, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press, London.
- POULOS, T.L. (1988) –Cytochrome P450: molecular architecture, mechanism and prospects for rational inhibitor design, *Pharmac. Res.*, 5, 67-73.
- POWIS, G. (1987) –Metabolism and reactions of quinoid anticancer agents, *Pharmac. Ther.*, 35, 57-65.
- Powis, G. (1989) –Free radical formation by antitumor quinones, *Free Rad. Biol. Med.*, 6, 63-70.
- PRESTERA, T., HOLTZCLAW, W.D., ZHANG, Y.S. e TALALAY, P. (1993) –Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2965-2969.

- PROCHASKA, H. J. e TALALAY, P. (1988) –Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers: Markers for a chemoprotected state?, *Carcinogenesis*, 14, 2441-2445.
- PROUGH, R. A., LINDER, M. W., PINNAIRE, J. A., XIAO, G.-H. e FALKNER, K. C. (1996) –Hormonal regulation of hepatic enzymes involved in foreign compound metabolism, *The FASEB J.*, 10, 1369-1377.
- PUCHALSKY, R. B. e FAHL, W. E. (1990) –Expression of recombinant glutathione S-transferase  $\pi$ ,  $\gamma$ ,  $\chi$  confers resistance to alkylating agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2443-2447.
- RAHIMTULA, A.D. e O'BRIEN, P. J. (1974) –Hydroperoxide catalyzed liver microsomal aromatic hydroxylation reactions involving cytochrome P450, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 440-444.
- RALL, T. W. e LEHNINGER, A. L. (1952) –Glutathione reductase of animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 194, 119-130.
- RAM, P. A. e WAXMAN, D. J. (1990) –Pretranslational control by thyroid hormone of rat liver steroid 5 alpha-reductase and comparison on the thyroid dependence of two growth hormone-regulated CYP2C mRNAs, *J. Biol. Chem.*, 265, 19223-19229.
- RAM, P. A. e WAXMAN, D. J. (1994) –Dehydroepiandrosterone 3-beta.sulphate is an endogenous activator of the peroxisome-proliferation pathway: induction of cytochrome P4504A e acyl-CoA oxidase m-RNAs in primary rat hepatocyte culture and inhibitory effects of Ca(2+)-channel blockers, *Biochem.J.*, 301, 753-758.
- RAM, P. A., PARK, S.-H., CHOI, H. K. e WAXMAN, D. J. (1996) –Growth hormone activation of stat1, stat3 e stat5 in rat liver, *J. Biol. Chem.*, 271, 5929-5940.
- RAMSDEN, R., SOMMER, K. M. e OMIECINSKI, C. J. (1993) –Phenobarbital induction and tissue-specific expression of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice, *J. Biol. Chem.*, 268, 21722-21726.
- RANNIO, H., HUSGAFVEL-PURSIANEN, K., ANTTILA, S., HIETANEN, E., HIRVONEN, A. e PELKONEN, O. (1995) –Diagnosis of polymorphism carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review, *Gene*, 159, 113-121.
- RAO, M. S. e REDDY, J. K. (1987) –Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis, *Carcinogenesis*, 8, 631-636.
- RAUCY, J. L. e CARPENTER, S. J. (1993) –The expression of xenobiotic metabolizing cytochrome P450 in fetal tissues. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 29, 121-128.
- REBAR, R. W., MIYAKE, A., LOW, T. L. K. e GOLDSTEIN, A. L. (1981) –Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor, *Science*, 214, 669-774.
- REBAR, R. W., MORANDINI, I. C., BERNISCKE, K. e PETZE, J. E. (1980) –Reduced gonadotropins in athymic mice: prevention by thymic transplantation. *Endocrinology*, 107, 2130-2137.
- REBAR, R.W., MIYAKE, A., LOW, T.L.K. e GOLDSTEIN, A.L. (1981) –Thymosin stimulates secretion of luteinizing hormone-releasing factor, *Science*, 214, 669-671.
- REDDY, J. K. e RAO, M. S. (1989) –Oxidative DNA damage caused by persistent peroxisome proliferation: its role in hepatocarcinogenesis, *Mutat. Res.*, 214, 63-68.
- REIS, C. J. (1997) –*Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos - Produtos com venda autorizada*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Oeiras.

- REISZ-PORSASZ, S., PROBST, M. R., FUKUNAGA, B. N. e HANKINSON, O. (1994) – Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT), *Mol. Cell Biol.*, 14, 6075-6086.
- RIBEIRO, V. e LECHNER, M. C. (1992) –Cloning and characterization of a novel CYP3A1 allelic variant: analysis of CYP3A1 and CYP3A2 sex-hormone-dependent expression reveals that yhe CYP3A2 gene is regulated by testosterone, *Arch. Biochem. Biophys.*, 293, 147-152.
- RICCI, M. S., TOSCANO, D. G., MATTINGLY, C. J. E TOSCANO J. W. A. (1999) – Estrogen receptors reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells, *J. Biol. Chem.*, 274, 3430-3438.
- RIKANS, L E. e NOTLEY, B. A. (1982) –Age-related changes in hepatic microsomal drug metabolism are substrate selective, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220, 574-578.
- RIKANS, L. E. (1989) –Hepatic drug metabolism in female fischer rats as a function of age, *Drug Metab. Dispos.*, 17, 3,114-116.
- ROBERTSON, I. G. C. e JERNSTROM, B. (1986) –The enzymatic conjugation of glutathione with bay-region diol epoxides of benzo [a] pyrene, benzo [a] anthracene e crysene, *Carcinogenesis*, 7, 1633-1636.
- ROGERS, R. e FUNDERBURK, H.H. (1968a) –Fluorometuron degradation in cotton, *Proc. 21st S.Weed Conf.*, 341-344.
- ROGERS, R. e FUNDERBURK, H.H. (1968b) –Physiological aspects of fluorometuron in cotton and cucumber, *J. Agric. Food Chem.*, 16, 434-440.
- ROSE, M. R. (1991) –*Evolutionary Biology of Aging*, 1<sup>st</sup> ed., Oxford University Press, New York
- ROTHSTEIN, M. (1986) –Biochemical studies of aging, *Chem. Engineering News*, 64, 26-39.
- ROWE, J. D., PATSKOVSKY, Y. V., PATOVSKA, L. N., NOVIKOVA, E. e LITOWSKY, I. (1998) –Rationale for reclassification of a distintive subdivision of mammalian class  $\mu$  glutathione S-transferases that are primarily expressed in testis, *J. Biol. Chem.*, 273, 9593-9601.
- RUBIN, B. E ESHEL, Y. (1971) –Phytotoxicity of fluorometuron and its derivatives to cotton and weeds, *Weed Sci.*, 19, 592-594.
- RUMYANTESEVA, G. V., WEINER, L. M., FROLOVA, E. I. e FEDOROVA, O. S. (1989) – Hydroxyl radical generation and DNA strand scission mediated by natural anticancer and synthetic quinones, *FEBS Lett.*, 242, 397-404.
- RUMYANTSEVA, G. V. e WEINER, L. M. (1988) –Redox tranformations of quinone antitumor drugs in liver microsomes, *FEBS Lett.*, 234, 459-461.
- RUSHMORE, T. H. e PICKETT, C. B. (1990) –Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants, *J. Biol. Chem.*, 265, 14648-14653.
- RUSHMORE, T. H., MORTON, M. R. e PICKETT, C. B. (1991) –The antioxidant responsive-element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity, *J. Biol. Chem.* 266, 11632-11639.
- RUSHMORE, T.H. e PICKETT, C.B. (1991) –Xenobiotic responsive elements controlling inducible expression by planar aromatic compounds and phenolic antioxidants, *Methods Enzymol.*, 206, 409-420.

- RUSHMORE, T.H. e PICKETT, C.B. (1993) –Glutathione S-transferases structure, regulation and therapeutic implications, *J. Biol. Chem.*, 268, 11475-11478.
- RYAN, R., GRIMM, S., KEDZIE, K., HALPERT, J. e PHILPOT, R. (1993) –Cloning, sequencing and functional studies of phenobarbital-inducible forms of cytochrome P450 2B e 4B expressed in rabbit kidney, *Arch. Biochem. Biophys.*, 304, 454-463.
- SADZUKA, Y. SHIMIZU, Y., TAKINO, Y. e HIROTA, S. (1994) –Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase, *Biochem. Pharmacol.* 48, 453-459.
- SAITO, L., MATSUMARA, T. e INOUE, K. (1982) –Formation of superoxide ion via one-electron transfer from electron donors to singlet oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 3200-3220.
- SARKAR, S. N. e GUPTA, P. K. (1993) –Fetotoxic and teratogenic potential of substituted phenylurea herbicide, isoproturon in rats, *Indian J. Exp. Biol.*, 31: 3, 280-282.
- SAWADA, M. e CARLSON, J. C. (1987) –Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during the lifetime of the rat, *Mech. Ageing Dev.*, 41, 125-137.
- SAXENA, M. e HENDERSON, G. B. (1995) –ATP-dependent efflux of 2,4.dinitrophenyl-S-glutathione, *J. Biol. Chem.*, 10, 5312-5319.
- SCHACTER, R. L., WOO, A., DUONG, M. e BATIST, G. (1991) –In vivo and In vitro mechanisms of drug resistance in a rat mammary carcinoma model, *Cancer Res.*, 51, 1434-1442.
- SCHENKMAN, J. B. e GIBSON, G. G. (1981) –Status of the cytochrome P450 cycle, *TIPS*, 150, 1981-1982.
- SCHENKMAN, J. B., REMMER, H. e ESTABROOK, R. W. (1967) Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome P450, *Mol. Pharmacol.*, 3, 113-121.
- SCHENKMAN, J. B., SLIGAR, S. G. e CINTI, D. L. (1982) –Substrate interaction with cytochrome P450, in: *Hepatic Cytochrome P450 monooxygenase system*, Pergamon Press, Oxford.
- SCHMIDT, J. V. e BRADFIELD, C. A. (1996) –Ah receptor signaling pathways, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 55-89.
- SCHMUCKER, D. L. e WANG, R. K. (1980) –Age-related changes in liver drug metabolizing enzymes, *Exp. Gerontol.* 15, 321-329.
- SCHOLTZ, W., SCHUTZE, K., KUNZ, W. e SCHWARZ, M. –( 1990) Phenobarbital enhances the formation of reactive oxygen in neoplastic rat liver nodules, *Cancer Res.*, 50, 7015-7022.
- SCHUETZ, E. G., SCHUETZ, J. D., MAY, B. e GUZELIAN, P. S. (1990) –Regulation of cytochrome P450b/c and P450p gene expression by growth hormone in adult rat hepatocytes cultured on a reconstituted basement membrane, *J. Biol. Chem.*, 265, 1188-1192.
- SCHUETZ, E. G., SCHUETZ, J. D., STROM, S. C., THOMPSON, M. T., FISHER, R. A., MOLOWA, D. T., LI, D. e GUZELIAN, P. S. (1993) –Regulation of human liver cytochromes P450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes, *Hepatology* 18, 1254-1262.
- SCHUPMAN, I. e EBING, W. (1975) –Metabolism of Phenylurea herbicides, V. Metabolism of hydroxylated monolinuron in spinach, *Chemosphere*, 5, 265-273.



- SCHUURMAN, H.-J. (1988) –Biological functions of the thymic microenvironment, *Thymus Update*, 1, 67-69.
- SCHUURMAN, H.-J., KRAJNC-FRANKEN, M.A.M., KUPER, C.F., VAN LOVEREN, H. e VOS, J.G. (1991) –Immune System, in *Handbook of toxicologic pathology*, 421-487, Academic Press, London.
- SHAPIRO, B. H., NISAR, A. P., LAPENSON, D. P. e WAXMAN, D. J. (1994) –Growth hormone and independent sexually dimorphic regulation of phenobarbital-induced hepatic cytochromes P450 2B1 e 2B2, *Arch. Biochem. Biophys.*, 312, 1, 234-239.
- SHAW, G.-C.; SUNG, C.-C.; LIU, C.-H. e LIN C.-H. (1998) – Evidence against the Bm1P1 protein as a positive transcription factor for barbiturate-mediated induction of cytochrome P450<sub>B<sub>M</sub>-1</sub> in *Bacillus megaterium*, *J. Biol. Chem.*, 14, 7996-8002.
- SHAW, P. M., ADESNIK, M., WEISS, M. C. e COECOS, L. (1993) –The fenobarbital-induced transcriptional activation of cytochrome P450 genes is blocked by glucocorticoid-progesterone antagonist RU486, *Mol. Pharmacol.*, 44, 775-783.
- SHEN, A. L. e KASPER, C. B. (1995) –Role of acidic residues in the interaction of NADPH-cytochrome P450 and cytochrome c, *J. Biol. Chem.*, 270, 27475-27480.
- SHEPARD, E. A., PHILLIPS, I. R., BYNEY, R. M., PIKE, S. F. e RABIN, B. R. (1983) Quantification of NADPH-cytochrome P450 reductase in Liver, *Biochem. J.*, 211, 333-338.
- SHIMADA, M., MURAYAMA, N., YAMAZOE, Y, KAMATAKI, T. e KATO R. (1987) – Further studies on the persistence of neonatal androgen imprinting on sex-specific cytochrome P450, testosterone and drug oxidations, *Japan J. Pharmacol.*, 45, 467-478.
- SHIMOJO, N., ISHIZAKI, T., IMAOKA, S., FUNAE, Y., FUJI, S. e OKUDA, K. (1993) – Changes in amounts of cytochrome P450 isozymes an levels of catalytic activities in hepatic and renal microsomes of rats with streptozocin-induce diabetes, *Biochem. Pharmacol*, 46, 621-667.
- SHYAM, K., PENKETH, P.G., DIVO, A.A., LOOMIS, R.H., ROSE, W.C. e STORELLI, A.C. (1993) –Synthesis and evaluation of 1-acyl-1,2-bis(methylsulfonyl)-2-(2-chloroethyl) hydrazines as antineoplastic agents, *J. Med. Chem.*, 36, 3496-3502.
- SIDDIQUI, M.K.J., MAHBOOB, M. e MUSTAFA, M. (1990) –Hepatic and extrahepatic glutathione depletion and glutathione S-transferase inhibition by monocrotophos and its two thiol analogues, *Toxicology* 64, 271-279.
- SIEGEL, A. F. e MORGAN, C. J. (1996) –*Statistics and data analysis - an introduction*, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc, New York.
- SIMON, H. A. (1973) –The organization of complex systems, in: Hierarchy theory: The challenge of complex systems, Pattee H.H. Editor, New York.
- SIMPSON, E. R., MICHAEL. M. D., AGARWAL, V. R., HINSHELWOOD, M. M., BULUN, S. E. e ZHAO, Y. (1997) –Expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promotor usage, *FASEB J.*, 11, 29-36.
- SIMULA, T. P., GLANCEY, M. J. e WOLF, C. R. (1993) –Human glutathione S-transferase-expressing Salmonella typhimurium tester strains to study the activation/destoxication of mutagenic compounds: studies with halogenated compounds, aromatic amines and aflotoxin B1, *Carcinogenesis*, 14, 1371-1376.

- SINHA, B. K. (1989) –Free Radical in anticancer drug pharmacology, *Chem. Biol. Interact.*, 69, 293-315.
- SIPES, G. e GANDOLFI, A.J. (1991) –*Biotransformation of toxicants, in Toxicology*, 4<sup>th</sup> ed., Pergamon Press, Oxford.
- Skett, P. (1990) –Role of hormones in the control of mixed-function oxidases, *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 24-26.
- SLATER, J. G., RASHED, M. S., PEARSON, P.G., HAN, D-H. e BAILLIE, T. A. (1991) – Biotransformation of methyl isocyanate in the rat. Evidence for glutathione conjugation as a major pathway of metabolism and implications for isocyanate-mediated toxicities, *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 157-161.
- SLIGAR, S. G. e MURRAY, R. I. (1986) –Cytochrome P450cam and other bacterial P-450 enzymes, in *Cytochrome-P450: structure, mechanism, and biochemistry*, 429-441, Plenum Press, New York.
- SMIALOWICZ, R.J., ANDREWS, J.E., RIDLLE, M.M., ROGERS, R.R., LUEBKE, R.W. e COPELAND, C.B. (1989) –Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat, *Toxicology*, 56, 197-211.
- SMITH, D. A, JONES, B. C. e WALKER, D. K. (1996) –Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics, *Med. Res. Rev.*, 16, 3, 243-266.
- SMITH, J. R. e PEREIRA-SMITH, O. M. (1996) –Replicative senescence: Implications for in vivo aging and tumor supression, *Science*, 273, 63-67.
- SOHAL, R. S. e WEINDRUCH, R. (1996) –Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273, 59-63.
- SOKAL, R. R. e ROHLF, F. J. (1981) –*Biometry*. 2<sup>nd</sup> ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- SOKAL, R.R. e ROHLF, F.J. (1997) –*Biometry*. 3<sup>rd</sup> ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- SOUCEK, P. e GUT, I. (1992) –Cytochrome P450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms, *Xenobiotica*, 22, 83-93.
- SPEARMAN, M. E. e LEIBMAN, K. C. (1984) –Aging slectively alters glutathione S-transferase isozyme concentrations in liver and lung cytosol, *Drug Metab. Dispos.*, 12, 661-671.
- SRIVASTAVA, M. K. e RAIZADA, R. B. (1995) –Developmental toxicity of the substituted phenylurea herbicide isoproturon in rats, *Vet. Hum. Toxicol.*, 37: 3, 220-223.
- STIER, A. (1964) –Trifluoroacetic acid as metabolite of halothane, *Biochem. Pharmacol.*, 13, 1544-1556.
- STOLTZ, C., VACHON, M.-H., TROTTIER, E., DUBOIS, S. , PAQUET, Y. e ANDERSON, A. (1998) –The CYP2B2 phenobarbital response unit contains an accessory factor element and a putative glucocorticoid response element essential for conferring maximal fenobarbital responsiveness, *J. Biol. Chem.*, 14, 8528-8536.
- STREHELER, B. L. (1962) –*Time cells and ageing*, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press, London.
- SUGIMOTO, Y., OHTA, Y., MORIKAWA, T., YAMASHITA, T., YOSHIDA, M. e TAMAOKI, B.-I. (1990) –In vitro metabolism of testosterone on hepatic tissue of chicken (*Gallus domesticus*), *J. Steroid Biochem.*, 35, 271-279.
- SWALES, N.J., JOHNSON, T. e CALDWELL, J. (1996) –Cryopreservation of rat and mouse hepatocytes, *Drug Metabol.Dispos.*, 24, 1224-1230.

- SWANSON, H. I., TULLIS, K. e DENISON, M. S. (1993) –Binding of transformed Ah receptor complex to a dioxin responsive transcriptional enhancer: evidence for two distinct heteromeric DNA-binding forms, *Biochemistry.*, 32, 12841-12849.
- SWANSON, H. I. e BRADFIELD, C. A. (1993) –The Ah-receptor: genetics, structure and function, *Pharmacogenetics* 3, 213-230.
- TALALAY, P.; DE LONG, M. J. e PROCHASKA, H. J. (1988) –Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8261-8265.
- TAMBURINI, P. P., GIBSON, G. G., BACKES, W. L., SLIGAR, S. G. e SCHENKMAN, J. B. (1984) –Reduction kinetics of purified rat liver cutochrome P450. Evidence for a sequential reaction mechanism dependent on the hemoprotein spin state, *Biochemistry*, 23, 4526-4532.
- TANIGUCHI, H., IMAI, Y. e SATO, R. (1984) –Role of electron transfer system in microsomal drug momooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P450, *Arch. Biochem. Biophys.*, 232, 585-593.
- TAYLOR, J. B., CRAIG, R. K., BEALE, D. e KETERER, B. (1984) –Construction and characterization of a plasmid containing complementary DNA to mRNA encoding the N-terminal aminoacid sequence of the rat glutathione S-transferase Ya subunit, *Biochem. J.*, 219, 223-231.
- TESTAI, E. e VITTOZZI, L. (1986) –Biochemical alterations elicited in rat liver microsomes by oxidation and reduction products of chloroform metabolism, *Chem. Biol. Interact.*, 59, 157-169.
- TEW, K. D., BOMBER, A. M. e HOFFMAN, S. J. (1988) –Ethacrinic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines, *Cancer Res.*, 48, 3622-3625.
- THOMPSON, J. A., HO, B. e MASTOVICH, S. C. (1984) –Reductive metabolism of 1,1,1,2-tetrachloetane and related chloroetanes by rat liver microsomes, *Chem. Biol Interact.*, 51, 321-330.
- THREADGILL, M. D., AXWORTHY, D. B., BAILLIE, T.A., FARMER, P.B., FARROW, K.C., GESCHER, A., KESTELL, P., PEARSON, P. G. e SHAW, A. J. (1987) –Metabolism of N-methylformamide in mice: Primary kinetic deuterium isotope effect and identification of S-(N-methylcarbamoil) glutathione as ametbolite, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242, 312-319.
- TOMASI, A., BILLING, S., GARNER, A., SLATER, T. F. e ALBANO, E. (1983) –The metabolism of halothane by hepatocytes: acomparison between fre radical spin trapping and lipid peroxidation in relation to cell damage, *Chem. Biol. Interact.*, 46, 353-362.
- TOSKULKAO, C, DEECHAKAWAN, W., LEARDKAMOLKARN, V. e GLINSUKON, T. (1994) –The low calories natural sweetener stevioside: nephrotoxicity and its relationship to urinary enzyme excretion in the rat, *Phytotherapy Research*, 8, 281-286.
- TRAVER, R. D., HORIKOSHI, T., DANENBERG, K. D., STADLBAUER, T. H. W., DANNENBERG, P. V., ROSS, D. e GIBSON, N. W. (1992) –NAD(P)H:quino oxiredutase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutant which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity, *Cancer Res.*, 52, 797-810.
- TUGWOOD, J. D., ISSEMAN, I., ANDERSON, R. G., BUNDELL, K. R., MCPHEAT, W. L. e GREEN, S. (1992) –The mouse peroxisome proliferator activated receptor re-

- cognizes response element in the 5'flanking sequence of the rat acyl-CoA oxidase gene, *EMBO J.*, 11, 433-439.
- TYSON, C. A., LIPSCOMB, J. D. e GUNSALUS, I. C. (1972) –The roles of putidaredoxina and P450cam in methylene hydroxilation. *J. Biol. Chem.*, 247, 5777-5789.
- ULLRICH, V. e WEBER, P. (1972) –Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 1171.♣
- UTSUYAMA, M e HIROKAWA, K. (1989) –Hypertrophy of the thymus and restoration of immune functions in mice and rats by gonadectomy, *Mech. Ageing Dev.*, 47, 175-185.
- VAN DER GRAAF, M. e VERMEULEN, N. P. E. (1988) –Disposition of hexobarbital : 15 years of an intriguing model substrate, *Drug Metab. Rev.*, 19, 109-124.
- VARGAS, M., LAMB, J. G. e FRANKLIN, M. R. (1998) –Phase II-selective induction of hepatic drug-metabolizing enzymes by oltipraz, *Drug Metab. Disp.*, 26, 91-97.
- VAZIRI, C. e FALLER, D. V. (1997) –A benzo [a] pyrene-induced cell cycle checkpoint resulting in p53-independent G<sub>1</sub> arrest in 3T3 fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 272, 2762-2769.
- VAZIRI, C., SCHNEIDER, A., SHERR, D. H. e FALLER, D. V. (1996) –Expression of the aryl hydrocarbon receptor is regulated by serum and mitogenic growth factors in murine 3T3 fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 271, 25921-25927.
- VERMILLION, J. L. e COON, M. J (1978) –Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-Cytochrome P45 reductase, *J. Biol. Chem.*, 253, 8812-8820.
- VILLARIAS, J. L. (1981) –*Guia de aplicacion de herbicidas*, 1ª ed., volume II, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- VOS, J.G. (1986) –mmunotoxicity of hexachlorobenzene, in “*Hexachlorobenzene*”, 347-356, International Agency for research on cancer, Lyon.
- VOSS, G. e GEISSBUHLER, H. (1966) –The uptake, translocation and metabolism of fluorometuron and metobromuron in plants, *Proc 8<sup>th</sup> Br Weed Control Conf.*, 266-268.
- VOZNESENSKY, A. L. e SCHENKMAN, J. B. (1992) –The cytochrome P450B4-NADPH-cytochrome P450 reductase electron transfer is not formed by charge-pairing, *J. Biol. Chem.*, 267, 14669-15677.
- VROMANS, R. M., VAN DE STRAAT, R., GROENVELD, M. e VERMEULEN, N. P. E. (1990) –One -electron reduction of mitomycin C by rat liver role of cytochrome P450 e NADPH-cytochrome P450 redutase, *Xenobiotica*, 20, 967-975.
- WADDINGTON, C. H. (1957) –The strategies of the genes, McMillan Co., New York.
- WALSH, A. A., TULLIS, K., RICE, R. H. e DENISON, M. S. (1996) –Identification of a novel cis-acting negative regulatory element affecting expression of the CYP1A1 gene in rat epidermal cells, *J. Biol. Chem.*, 271, 22746-22753.
- WANG, M., ROBERTS, D. L., PASCHEKE, R., SHEA, T.M., MASTERS, B. S. S. e KIM, J.-J. P. (1997) –Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8411-8416.
- WARNER, H. R., BUTLER, R. N., SPROTT, R. L. e SCHNEIDER, E. L. (1987) –*Modern biological theories of aging*, Aging series, 31, Raven press, New York.
- WATANABE, A. e NAGASHIMA, H. (1983) –Glutathione metabolism and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in experimental liver injury, *Acta Med. Okayama*, 37, 463-470.

- WAXMAN, D. J. (1988) –Interactions of hepatic cytochromes P450 with steroid hormones. regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P450 enzyme expression, *Biochem. Pharmacol.*, 37, 71-84.
- WAXMAN, D. J. (1990) –Glutathione S-transferases: Role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy: a review, *Cancer Res.*, 50, 6449-6454.
- WAXMAN, D. J., KO, A. e WALSH, C. (1983) –Regioselectivity and stereoselectivity of androgen hydroxylations catalyzed by cytochrome P450 Isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver, *J. Biol. Chem.*, 253, 19, 11937-11947.
- WAXMAN, D. J., RAM, P. A., PAMPORI, N. A. e SHAPIRO, B. H. (1995) –Growth hormone regulation of male-specific rat liver P450s 2A2 e 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate, *Mol. Pharmacol.* 5, 790-797.
- WAXMAN, D. J., RAM, P. A., PARK, S.-H. e CHOI, H. K. (1995) –Intermittent plasma growth hormone triggers tyrosine phosphorylation and nuclear translation of a liver-expressed, stat5-related DNA binding protein, *J. Biol. Chem.*, 270, 13262-13270.
- WAXMAN, D. J., ZHAO, S. e CHOI, H. K. (1996) –Interaction of novel sex-dependent, growth hormone-regulated liver nuclear factor with CYP2C12 promoter. *J. Biol. Chem.*, 271, 29978-29987.
- WAXMAN, D.J., PAMPORI, N.A., RAM, P.A., AGRAWAL, A.K. e SHAPIRO, B.H. (1991) –Interpulse interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic P450, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88, 6868-6872.
- WAYNFORTH, H.B. e FLECKNELL, P.A. (1992) –Experimental and surgical technique in the rat, 341-358, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press, London.
- WAZIER, I., CUGNENC, P.H., YANG, C.S., LEROUX, J.P. e BEANNE, P.H. (1990) –Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues, *J. Pharmacol.*, 253, 387-394.
- WEBER, G.F. e WAXMAN, D.J. (1993) –Denitrosation of the anti-cancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea catalyzed by microsomal glutathione S-transferase and cytochrome P450 monooxygenases, *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 369-378.
- WHITE, R. E. e COON, M. J. (1980) –Oxygen activation by cytochrome P450, *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 315-325.
- WHITLOCK, J. P. JR. (1993) –Mechanistic aspects of dioxin action, *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 754-763.
- WICKRAMASINGH, R. H. e VILLEE, C. A. (1975) –Early role during chemical evolution for cytochrome P450 in oxygen detoxification, *Nature*, 256, 509-511.
- WILBERT, H. M. P. e ROELOFS, H. M. J. (1997) –Effect of long time storage on cytosolic glutathione S-transferases, *Biochem. Mol. Biol. Intl.*, 41, 5, 913-917.
- WILCE, M. C. J. e PARKER, M. W. (1994) –Structure and function of glutathione S-transferases, *Biochem. Biophys. Acta*, 1205, 1-18.
- WILLIAMS, R. J. P. (1974) –*Haem-proteins and oxygen in iron biochemistry and medicine*, 1<sup>st</sup> ed., Academic Press, New York.
- WIRKNER, K. e POELCHEN, W. (1996) –Influence of long-term ethanol treatment on rat liver aniline and p-nitrophenol hydroxylation, *Alcohol*, 13, 69-74.

- WOODHOUSE, K. e WYNNE, H. A. (1992) –Age-related changes in hepatic function. Implications for drug therapy, *Drugs Aging*, 2, 243-255.
- XU, B.Q., AASMUNDSTADT, T.A., CHRISTOPHERSEN, A.S., MORLAND, J. e BJORNEBOE, A.(1997) –Evidence for CYP2D1-mediated primary and secondary O-dealkylation of ethymorphine and codeine in rat liver microsomes, *Biochem. Pharmacol.*, 53, 603-609.
- YAMAZAKI, H. e SHIMADA, T. (1997) –Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, e 3A4 in human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 346,161-169.
- YAMAZAKI, H., JOHNSON, W. W., UENG, Y.-F., SHIMADA, T. e GUENGERICH, F. P. (1996) –Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. *J. Biol.Chem.*, 271, 27438-27444.
- YANG, C. S. (1975) –The association between cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase in microsomal membrane, *FEBS Lett.*, 54, 61-65.
- YANG, R.S. (1996) –Some Ccurrent approaches for studying combination toxicology in chemical mixtures, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 1037-1044.
- YATES, F. E., MARSH, D. J. e IBERALL, A. S. (1972) –Integration of the Whole organism-A foundation for a theoretical biology, in Challenging biological problems: Directions toward their solution, 110-132, Oxford University Press, Fairlawn.
- YU, B. P. (1996) –Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction, *Free Rad. Biol. Med.*, 21, 651-668.
- ZANGAR, R. C., BUHLER, D. R. e SPRINGER, D. L. (1995) –Neonatal exposure to xenobiotics alters adult hepatic protein kinas C alpha levels and testosterone metabolism: Differential effects by diethylstilbestrol e fenobarbital, *J. Toxicol. Environ. Health*, 45, 47-58.
- ZARIDA, H., NGAH, W. Z. W. e KHALID, B. (1993) –Effect of gonadectomy and sex hormones replacement on glutathione related enzymes, *Asia Pacific J. Pharmacol.*, 8, 223-230.
- ZARIDA, H., NGAH, W. Z. W. e KHALID, B. (1993) –Effect of gonadectomy and sex hormones replacement on glutathione related enzymes in rats, *Asia Pacific J. Pharmacol.*, 8, 223-230.
- ZELDIN, D. C., MOOMAW, C. R., JESSE, N., TOMER, K. B., BEETHAM, J., HAMMOCK, B. D. E., WU, S. (1996) –Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway, *Arch. Biochem. Biophys.*, 330, 87-96.
- ZEMAN, W. (1971) –The neuronal ceroid-lipofuscinosis-baton-vogt syndrome: A model for ageing, in *Advances in gerontologic research*, Academic Press, New York.
- ZEUTHEN, E. (1947) –Body size and metabolic rate in the animal kingdom, *Cr. Trav. Lab.Carlsberg, Ser.Chem.*, 26, 15-161.
- ZHANG, K. e DAS, N. P. (1994) –Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases, *Biochem. Pharmacol.*, 47, 11, 2063-2068.

**Apêndices**

**ApêndicesA.**

**Resultados da análise de variância (modelo “ANOVA I”)**



QuadroI - Peso do corpo e dos órgãos, relação peso do órgão/ peso do corpo de ratos machos Wistar, controle e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isotretinona, às 7 e às 12 semanas de idade.

Peso do corpo ou P. do órgão/P. do corpo	Origem da variância					
		Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Peso do corpo (g)	Entre grupos	266648,920	7	38092,703	33,531	,000
	Dentro dos grupos	36352,897	32	1136,028		
	Total	303001,817	39			
Peso do fígado (g)	Entre grupos	100,361	7	14,337	10,121	,000
	Dentro dos grupos	45,333	32	1,417		
	Total	145,694	39			
Peso dos rins (g)	Entre grupos	5,575	7	,796	14,485	,000
	Dentro dos grupos	1,759	32	,055		
	Total	7,334	39			
Peso dos testículos (g)	Entre grupos	6,990	7	,999	11,350	,000
	Dentro dos grupos	2,815	32	,088		
	Total	9,805	39			
Peso do timo (g)	Entre grupos	,133	7	,019	2,037	,081
	Dentro dos grupos	,299	32	,009		
	Total	,433	39			
P. do fígado/P. do corpo (%)	Entre grupos	3,686	7	,527	13,109	,000
	Dentro dos grupos	1,285	32	,040		
	Total	4,971	39			
P. dos rins/P. do corpo (%)	Entre grupos	,368	7	,053	23,263	,000
	Dentro dos grupos	,072	32	,002		
	Total	,440	39			
P. dos testículos/P. do corpo (%)	Entre grupos	,837	7	,120	24,943	,000
	Dentro dos grupos	,153	32	,005		
	Total	,991	39			
P. do timo/P. do corpo (%)	Entre grupos	,151	7	,022	18,584	,000
	Dentro dos grupos	,037	32	,001		
	Total	,188	39			

QuadroII -Quantidade de ração e de água ingerida, quantidade de urina e fezes produzidas por ratos machos Wistar, controle e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isotretinona, às 7 e às 12 semanas de idade

Quantidade	Origem da variância					
		Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Ração (g)	Entre grupos	6035,424	7	862,203	5,935	,000
	Dentro dos grupos	4648,882	32	145,278		
	Total	10684,307	39			
Água (cm3)	Entre grupos	9984,875	7	1426,411	,972	,468
	Dentro dos grupos	46946,100	32	1467,066		
	Total	56930,975	39			
Urina (cm3)	Entre grupos	8984,344	7	1283,478	1,278	,292
	Dentro dos grupos	32144,400	32	1004,513		
	Total	41128,744	39			
Fezes (g)	Entre grupos	2303,806	7	329,115	3,772	,004
	Dentro dos grupos	2791,750	32	87,242		
	Total	5095,556	39			

QuadroI - Peso do corpo e dos órgãos, relação peso do órgão/ peso do corpo de ratos machos Wistar, controle e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isotroturão, às 7 e às 12 semanas de idade.

Peso do corpo ou P. do órgão/P. do corpo	Origem da variância					
		Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Peso do corpo (g)	Entre grupos	266648,920	7	38092,703	33,531	,000
	Dentro dos grupos	36352,897	32	1136,028		
	Total	303001,817	39			
Peso do fígado (g)	Entre grupos	100,361	7	14,337	10,121	,000
	Dentro dos grupos	45,333	32	1,417		
	Total	145,694	39			
Peso dos rim (g)	Entre grupos	5,575	7	,796	14,485	,000
	Dentro dos grupos	1,759	32	,055		
	Total	7,334	39			
Peso dos testículos (g)	Entre grupos	6,990	7	,999	11,350	,000
	Dentro dos grupos	2,815	32	,088		
	Total	9,805	39			
Peso do timo (g)	Entre grupos	,133	7	,019	2,037	,081
	Dentro dos grupos	,299	32	,009		
	Total	,433	39			
P. do fígado/P. do corpo (%)	Entre grupos	3,686	7	,527	13,109	,000
	Dentro dos grupos	1,285	32	,040		
	Total	4,971	39			
P. dos rins/P. do corpo (%)	Entre grupos	,368	7	,053	23,263	,000
	Dentro dos grupos	,072	32	,002		
	Total	,440	39			
P. dos testículos/P. do corpo (%)	Entre grupos	,837	7	,120	24,943	,000
	Dentro dos grupos	,153	32	,005		
	Total	,991	39			
P. do timo/P. do corpo (%)	Entre grupos	,151	7	,022	18,584	,000
	Dentro dos grupos	,037	32	,001		
	Total	,188	39			

QuadroII -Quantidade de ração e de água ingerida, quantidade de urina e fezes produzidas por ratos machos Wistar, controle e tratados com as doses de 1, 3 e 9 mg/Kg de isotroturão, às 7 e às 12 semanas de idade

Quantidade	Origem da variância					
		Soma de quadrados	Graus de liberdade	Variância	F	Sig. (99%)
Ração (g)	Entre grupos	6035,424	7	862,203	5,935	,000
	Dentro dos grupos	4648,882	32	145,278		
	Total	10684,307	39			
Água (cm3)	Entre grupos	9984,875	7	1426,411	,972	,468
	Dentro dos grupos	46946,100	32	1467,066		
	Total	56930,975	39			
Urina (cm3)	Entre grupos	8984,344	7	1283,478	1,278	,292
	Dentro dos grupos	32144,400	32	1004,513		
	Total	41128,744	39			
Fezes (g)	Entre grupos	2303,806	7	329,115	3,772	,004
	Dentro dos grupos	2791,750	32	87,242		
	Total	5095,556	39			

Apêndice B.

Resultados obtidos por cromatografia líquida de elevada eficácia

## B.1. Alguns cromatogramas

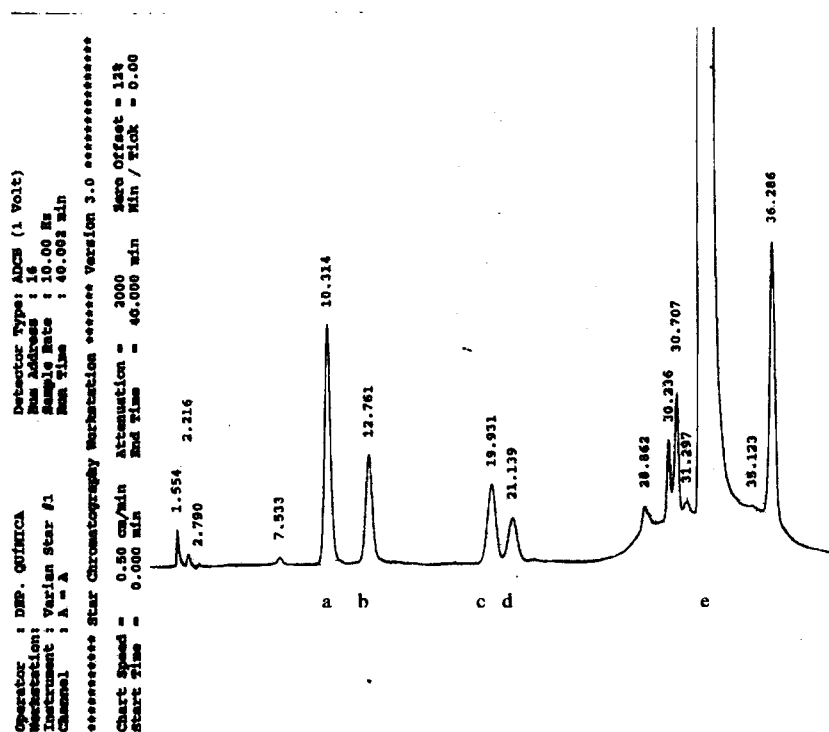


Figura I. Cromatograma de uma mistura padrão de  $6\beta$ -T-OH ( $3 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) a,  $16\alpha$ -T-OH ( $1 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) b,  $11\beta$ -T-OH ( $1 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) c,  $2\alpha$ -T-OH ( $1 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) d e testosterona ( $20 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) e.

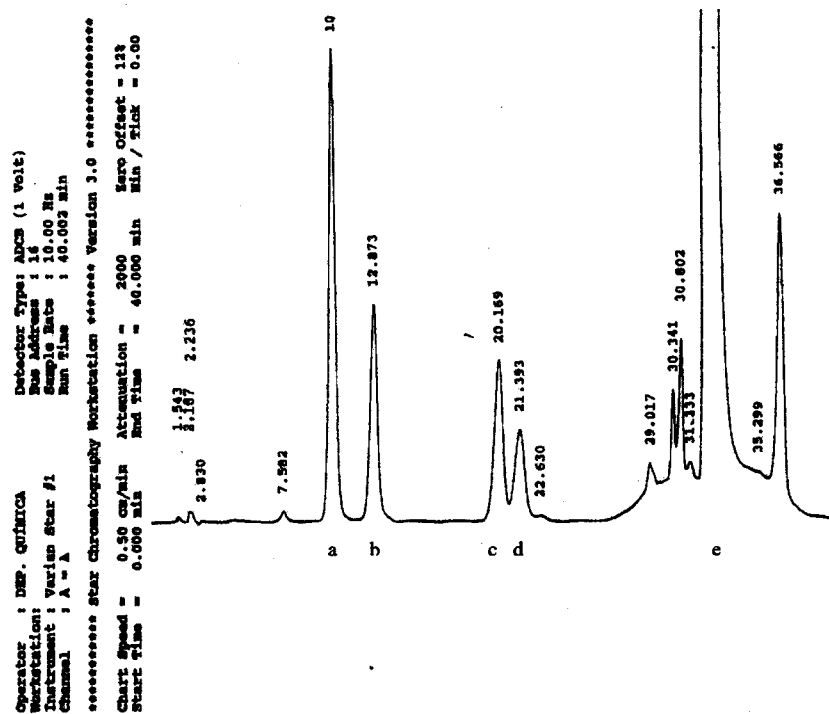


Figura II. Cromatograma de uma mistura padrão de  $6\beta$ -T-OH ( $30 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) a,  $16\alpha$ -T-OH ( $10 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) b,  $11\beta$ -T-OH ( $10 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) c,  $2\alpha$ -T-OH ( $10 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) d e testosterona ( $20 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) e.

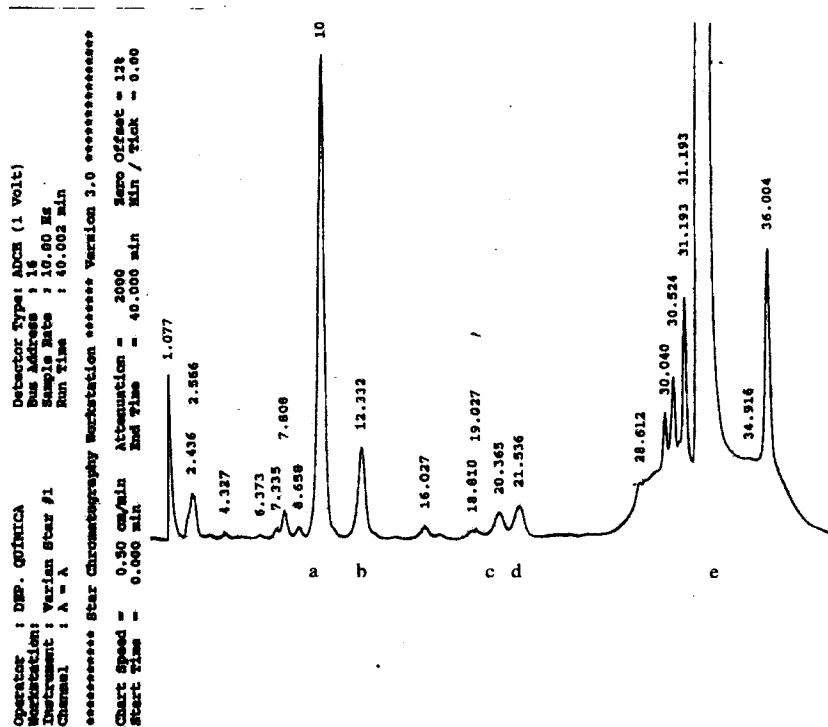


Figura III. Cromatograma de uma amostra de fígado de ratos machos Wistar controle com 7 semanas de idade, onde estão assinalados os picos  $6\beta$ -T-OH (a),  $16\alpha$ -T-OH (b),  $11\beta$ -T-OH (c),  $2\alpha$ -T-OH (d) e testosterona (e).

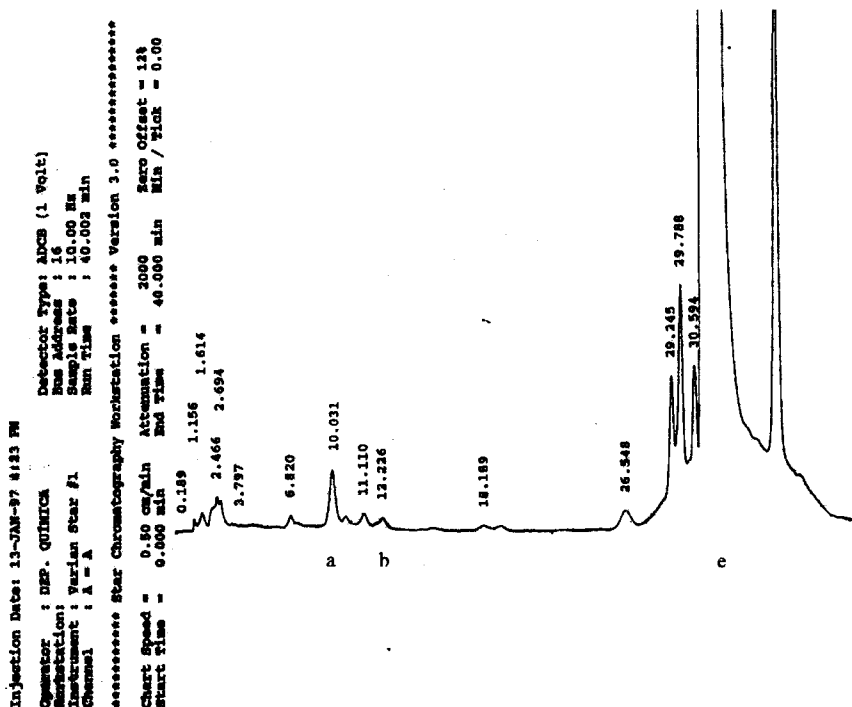


Figura IV. Cromatograma de uma amostra de rins de ratos machos Wistar controle com 7 semanas de idade, onde estão assinalados os picos  $6\beta$ -T-OH (a),  $16\alpha$ -T-OH (b) e testosterona (e).

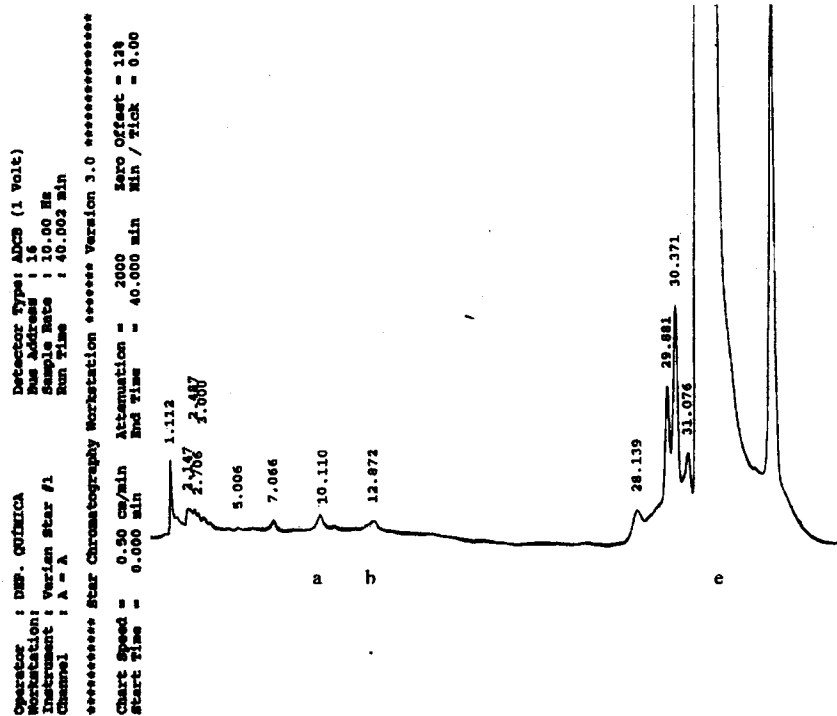


Figura V. Cromatograma de uma amostra de testículos de ratos machos Wistar controle com 7 semanas de idade, onde estão assinalados os picos  $6\beta$ -T-OH (a),  $16\alpha$ -T-OH (b) e testosterona (c).

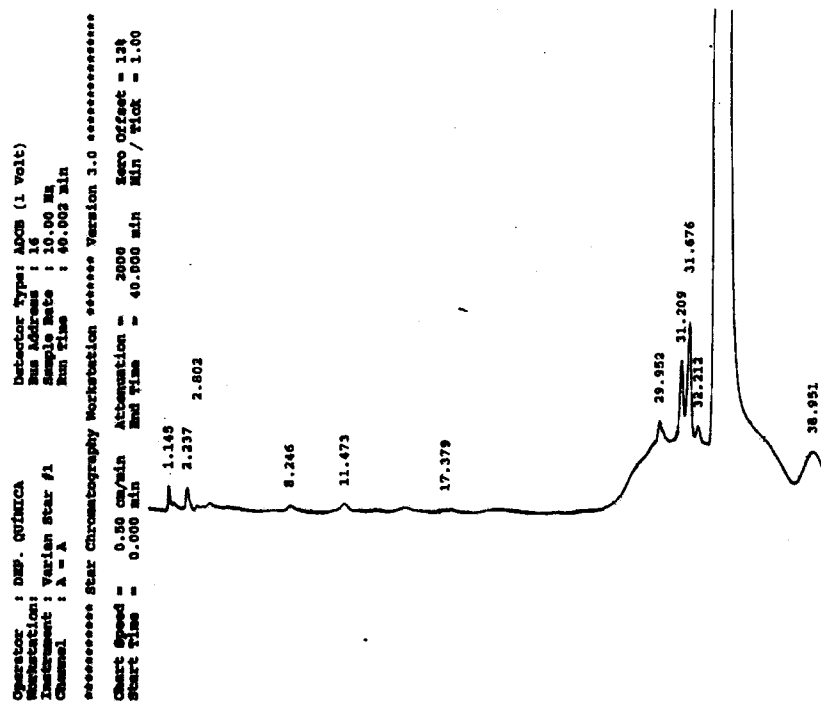
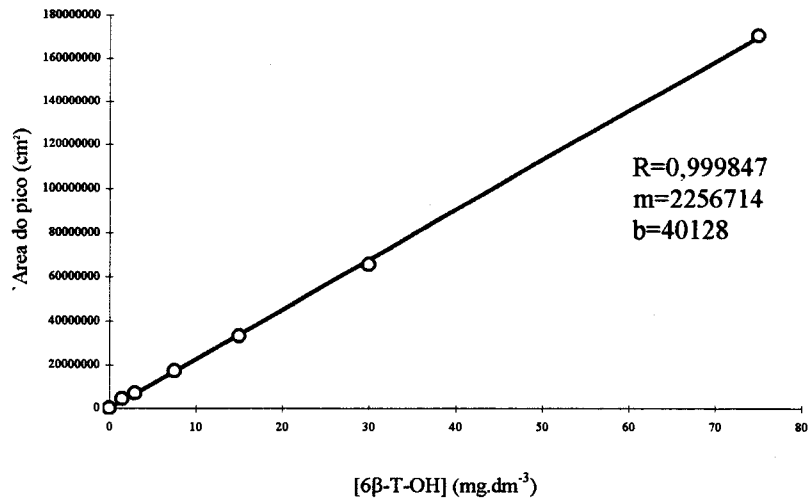
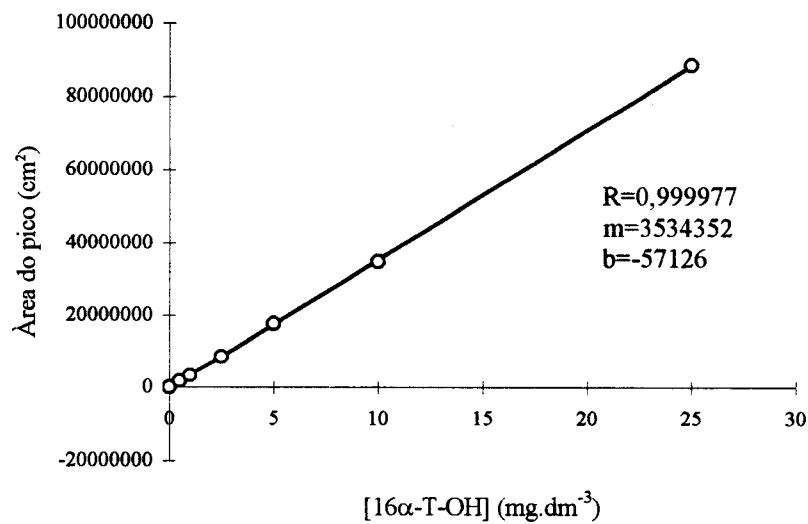


Figura VI. Cromatograma de uma amostra de timo de ratos machos Wistar controle com 7 semanas de idade.

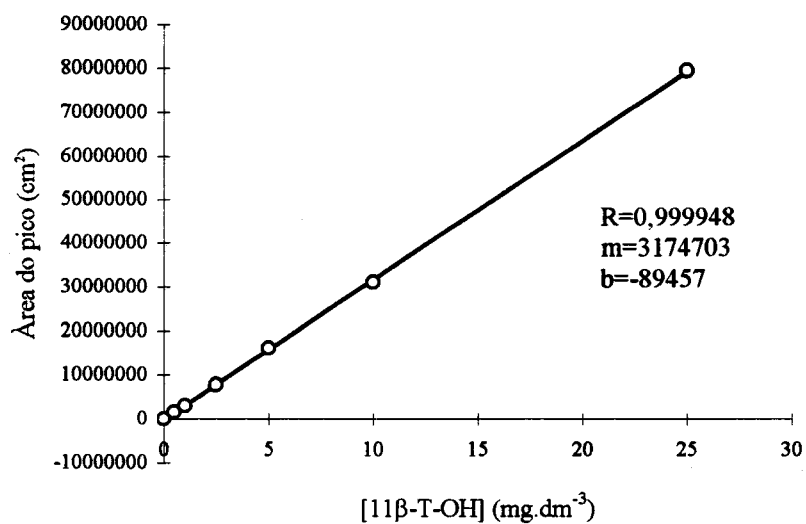
## B.2. Curvas de calibração



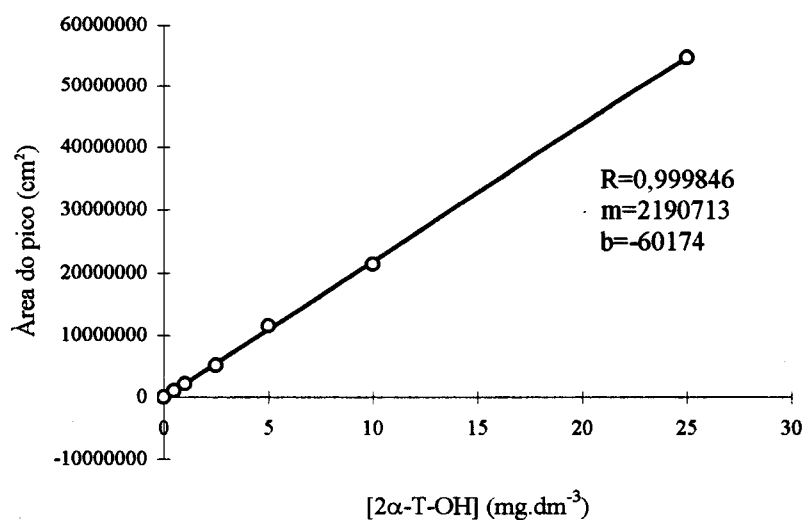
**Figura VII.** Curva de calibração para 6 $\beta$ -T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 1,5; 3,0; 7,5; 15,0; 30,0 e 75,0 mg.dm<sup>-3</sup> de 6 $\beta$ -hidroxitesterona.



**Figura VIII.** Curva de calibração para 16 $\alpha$ -T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0 mg.dm<sup>-3</sup> de 16 $\alpha$ -hidroxitesterona.



**Figura IX.** Curva de calibração para 11β-T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0 mg.dm<sup>-3</sup> de 11β-hidroxitesterona.

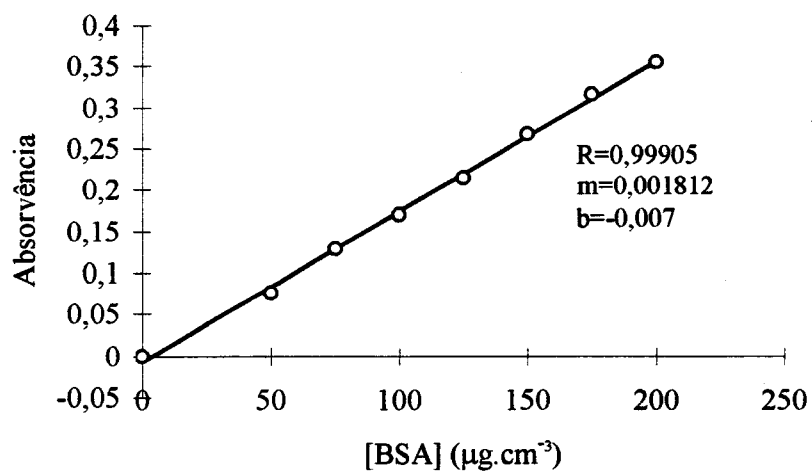


**Figura X.** Curva de calibração para 2α-T-OH. Utilizaram-se 6 soluções com mistura dos quatro esteróides contendo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 25,0 mg.dm<sup>-3</sup> de 2α-hidroxitesterona.



Apêndice C.

Curva de calibração para a proteína total (método de Lowry)



**Figura XI.** Curva de calibração utilizada na determinação da concentração de proteína total, construída com 7 soluções contendo 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  de albumina do soro bovino, respectivamente.