UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO INDUZIDO POR LINDANO
EM UM MODELO DE HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL

KARIN ARGENTI SIMON-GIAVAROTTI
TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROFA. DRA. VIRGÍNIA B. C. JUNQUEIRA

SÃO PAULO

09/02/2001

Agradecimentos

Muitas pessoas participaram da elaboração deste trabalho, em todo o seu sinuoso percurso, mas a algumas devo minhas considerações especiais:

- À Profa. Dra. Virgínia B. C. Junqueira, por me acolher em seu laboratório e me deixar amadurecer, sempre com muito respeito, carinho e paciência.
- Ao Prof. Dr. Luis A. Videla e toda sua equipe, pela inspiração e exemplo de generosidade no trabalho científico.
- À Lígia A. Azzalis, pela dedicação, além da conta, em me ensinar, tão carinhosamente, o caminho das pedras.
- À Dra. Lígia F. Gomes, por me apresentar novos rumos e novas maneiras de trabalhar.
- Ao Prof. Oswaldo Mora e aos colegas Adriano Mora e Eduardo Garcia, da UNIFESP, pelo auxílio inestimável na análise histológica.
- Ao Fernando L. A. Fonseca, pelo auxílio nos experimentos com as células de Kupffer e por todas as boas risadas...
- À Dra. Maria Antonietta da Silva Leitão, pela amizade e pelo apoio, sempre presentes.
- À Dra. Vânia D'Almeida, pela amizade e pelo auxílio no começo deste trabalho.
- A todos os colegas, que trabalham ou que passaram pelo laboratório, pelo auxílio e apoio constantes: Sandra S. Chan, Sandra C. Poppe, Alessandra F. Lima, Adriana Carvalho, Paula Knox, Alessandra Graziel Pereira, Valéria T. Garran, Andréia L. Thomasi, David Pavanelli, Denise Wanderley, Renata P. M. Coutinho, Grannbathula Sree Vani, André Fonseca, Regina Catarino e Alcione V. S. Moscardi.

- Ao Alessandro De Grande, entre muitas outras coisas, pela confecção dos slides para a apresentação deste trabalho.
- À Ilda de Souza Costa, pelo indispensável apoio técnico.
- Aos funcionários do Biotério, pela presteza dos serviços, e à Sra. Vitória T. Medeiros, pelo cuidado dos animais.
- Aos colegas e professores do Instituto de Química, por facilitarem o uso de instalações e equipamentos, ou por auxiliarem de uma maneira ou outra a realização deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos auxílios e bolsas concedidos.
- Ao Rosalvo Pires, pela clareza de idéias, absolutamente indispensável quando tudo parecia perdido.
- Ao meu pai, Norberto J. Simon, e à minha mãe, Núbia M. A. Simon, pela compreensão das minhas aspirações e por nunca terem deixado de acreditar.
- Ao meu marido, Leandro Giavarotti, pela presença, pelo apoio e pela dedicação, simplesmente incomparáveis.

Resumo

O hipertireoidismo leva o fígado a uma situação de proteção antioxidante limítrofe, que pode aumentar a susceptibilidade do órgão a ações deletérias de xenobióticos ou fenômenos que impliquem em estresse oxidativo. Tal ocorre em ratos Sprague-Dawley tratados simultaneamente com hormônio tireoidiano L-3,3',5-triiodotironina (T_3) e o inseticida lindano (γ -hexaclorociclohexano). Enquanto a dose única de lindano (20 mg/kg peso corpóreo) não alterou a maioria dos parâmetros estudados, a administração de T_3 estabeleceu a condição de estresse oxidativo hepático pelo aumento da atividade da NADPH-citocromo c redutase, acompanhado do aumento nos índices de lipoperoxidação e da produção microsomal de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e da diminuição da atividade de defesas antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase e catalase) e não-enzimáticas (diminuição dos níveis hepáticos de α -tocoferol, β -caroteno e licopeno). A administração de lindano teve seu efeito potenciado pelo hipertireoidismo, como indicado pelo aumento das razões $O_2^{\bullet-}/SOD$ e $SRAT/GSHT$ e pela diminuição dos níveis de α -tocoferol hepático, ambos efeitos maiores do que a soma dos obtidos nos tratamentos isolados. Devido à importância da atividade dos macrófagos residentes no fígado, observada em vários modelos de dano hepático, a função das células de Kupffer (CK) foi estudada neste modelo. Ao contrário do observado em experimentos no fígado íntegro, a luminescência das CK isoladas sofreu decréscimo nos animais tratados com T_3 e lindano separadamente, apresentando uma tendência ao aumento no tratamento conjunto. Todos os tratamentos diminuíram a atividade fungicida das CK. É possível que os tratamentos utilizados estejam prejudicando a ação das CK, sendo restaurada na presença dos dois tratamentos. Por outro lado, a importância das CK no aumento do efeito do lindano no hipertireoidismo experimental foi evidenciada pela supressão dos efeitos acima mencionados após a administração do inativador de CK, o $GdCl_3$. Estudos morfológicos corroboram este dado, mostrando uma supressão de sinais inflamatórios e necróticos nos animais hipertiroídeos tratados com $GdCl_3$.

Summary

Hyperthyroidism elicits a borderline antioxidant protection state in the liver, which may increase its susceptibility to deleterious effects of xenobiotics or situations that cause oxidative stress. This happens to Sprague-Dawley rats treated concurrently with thyroid hormone L-3,3',5-triiodothyronine (T_3) and the pesticide lindane (γ -hexachlorocyclohexane). While a single dose of 20 mg/kg body weight of lindane did not alter most of the assessed parameters, T_3 administration established a hepatic oxidative stress condition by means of an increase in NADPH-cytochrome c reductase activity, with a concomitant increase in lipoperoxidation (increase of thiobarbituric acid reactants) and microsomal generation of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and lower enzymatic (decreased activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase) and non-enzymatic antioxidant defenses (decreased hepatic levels of α -tocopherol, β -carotene, and lycopene). Lindane administration had potentiated effects on hyperthyroid animals, as indicated by the increased $O_2^{\bullet-}$ /SOD ratio and further lowering of α -tocopherol levels in the liver; both effects greater than the sum of the ones observed after isolated treatments. As liver resident macrophages have been shown to play an important role in several hepatic damage models, Kupffer cell (KC) function was also studied in this model. Contrary to what was observed in experiments in the whole liver, Kupffer cell (KC) luminescence was diminished in separately T_3 and lindane treated rats, revealing a tendency to increase after joint treatment. All treatments decreased KC fungicidal activity. It is possible that the separate treatments impair KC function, which is restored after the joint treatment. KC role in the potentiation of lindane-induced oxidative stress was evidenced by the suppression of this effect after KC inactivator, gadolinium chloride, administration. Morphological aspects of liver corroborate these data, showing a suppression of inflammatory and necrotic signals, present in hyperthyroid animals treated with lindane.

Abreviaturas

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
ALT	alanina transaminase
AST	aspartato transaminase
ATP	adenosina trifosfato
b_5	citocromo b_5
BHT	hidroxitolueno butilado
Ca^{2+}	íon cálcio
Ca^{2+} -ATPase	bomba de cálcio dependente de ATP
CaCl_2	cloreto de cálcio
CAT	catalase
CC	grupo de animais controle
CC Gd	grupo de animais controle tratados com GdCl_3
CCl_4	tetracloreto de carbono
CK	células de Kupffer
CL	grupo de animais tratados com lindano
CL Gd	grupo de animais tratados com lindano e GdCl_3
CO_2	dióxido de carbono
CoQH_2	ubiquinol
CuZnSOD	superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DHA	dehidroascorbato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTNB	ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilenodiamina tetra acetato de sódio
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
FAPyG	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
FeSOD	superóxido dismutase dependente de ferro
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GABA	γ -ácido aminobutírico
GdCl_3	cloreto de gadolínio

GPx	glutathiona peroxidase
GS [•]	radical glutationila
GSH	glutathiona reduzida
GSHT	glutathiona total
GSSG	glutathiona oxidada
H ⁺	próton
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCH	hexaclorociclohexano (grau técnico)
HCl	ácido clorídrico
HEPES	ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfônico
HO [•]	radical hidroxila
HO ₂ [•] ou HOO [•]	radical peridroxila
HOCl	ácido hipocloroso
HPLC	cromatografia líquida de alta resolução
HPO ₃	ácido metafosfórico
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
KCl	cloreto de potássio
KCN	cianeto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
K ₃ PO ₄	fosfato de potássio tribásico
LDH	lactato desidrogenase
LPS	lipopolissacarídeos
MDA	malonildialdeído
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MnSOD	superóxido dismutase dependente de manganês
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase	bomba de sódio e potássio dependente de ATP
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NaOH	hidróxido de sódio
NO [•]	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂	oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
¹ O ₂	oxigênio singlete
ONOO ⁻	peroxinitrito
P450	citocromo P450
PBS	tampão fosfato de sódio
PKC	proteína quinase C
PMN	leucócitos polimorfonucleares
p/v	peso/volume
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RO [•]	radical alcóxila
ROO [•]	radical peróxila
ROOH	hidroperóxido lipídico
RS [•]	radical tiila
RT	receptores nucleares de hormônios da tireóide
SDS	dodecilsulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
SRAT	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
T ₃	L-3,5,3'-triiodotironina
T ₃ C	grupo de animais hipertiroídeos
T ₃ C Gd	grupo de animais hipertiroídeos tratados com GdCl ₃
T ₃ L	grupo de animais hipertiroídeos tratados com lindano
T ₃ L Gd	grupo de animais hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl ₃
T ₃ R	T ₃ reverso (L-3,3',5'-triiodotironina)
T ₄	tiroxina (L-3,5,3',5'-tetraiodotironina)
t-BOOH	peróxido de ter-butila
TBPA	pré-albumina fixadora de tiroxina (transtirretina)
TCA	ácido tricloroacético

TGB	tireoglobulina
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TNF- α	fator necrosante tumoral- α
U	unidade
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume

Índice

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO.....	IV
SUMMARY	V
ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O FÍGADO.....	1
1.1.1 <i>As células de Kupffer: fagócitos do sinusóide hepático</i>	4
1.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS	10
1.3 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	14
1.4 ALVOS MOLECULARES DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	20
1.5 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	28
1.5.1 <i>Antioxidantes enzimáticos</i>	29
1.5.2 <i>Antioxidantes não-enzimáticos</i>	32
1.5.2.1 Compostos hidrossolúveis de baixo peso molecular.....	32
1.5.2.1.1 Glutathione Total (GSHT)	32
1.5.2.1.2 Ácido Ascórbico (Vitamina C)	33
1.5.2.2 Compostos lipossolúveis de baixo peso molecular	35
1.5.2.2.1 Tocoferóis e Ubiquinona	35
1.5.2.2.2 Carotenóides	38
1.6 OS HORMÔNIOS DA TIREÓIDE	41
1.6.1 <i>Estrutura e atividade biológica dos hormônios da tireóide</i>	41
1.6.2 <i>Metabolismo dos hormônios da tireóide</i>	44
1.6.3 <i>Hipertireoidismo e estresse oxidativo</i>	46
1.6.4 <i>Interação da atividade do T₃ e outros xenobióticos</i>	48
1.7 LINDANO	49
1.7.1 <i>Estrutura, atividade biológica e distribuição tecidual</i>	49
1.7.2 <i>Lindano e estresse oxidativo</i>	51
1.8 AÇÃO CONJUNTA DE LINDANO E T ₃	54
1.8.1 <i>CK nos tratamentos com T₃ e lindano</i>	55
2 OBJETIVOS	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1 MODELO EXPERIMENTAL	59
3.2 PARÂMETROS PRÓ- E ANTIOXIDANTES HEPÁTICOS.....	60
3.2.1 <i>Parâmetros pró-oxidantes</i>	62
3.2.1.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT).....	62
3.2.1.1.1 Método fluorimétrico	62
3.2.1.1.2 Potencial peroxidativo	62
3.2.2 <i>Enzimas antioxidantes</i>	63
3.2.2.1 Superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1)	63
3.2.2.2 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (E.C. 1.1.1.49)	64
3.2.2.3 Glutathione peroxidase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)	65
3.2.2.4 Catalase (E.C. 1.11.1.6)	66
3.2.3 <i>Parâmetros microssomais</i>	66
3.2.3.1 Citocromo P450 e citocromo b ₅	66
3.2.3.2 Produção de ânion superóxido (O ₂ ^{•-})	67
3.2.4 <i>NADPH-citocromo c redutase (E.C. 1.6.2.4)</i>	67
3.2.5 <i>NADH-citocromo c redutase (E.C. 1.6.2.2)</i>	68
3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	68

3.4 ANTIOXIDANTES	69
3.4.1 <i>Glutathiona total hepática (GSHT)</i>	69
3.4.2 <i>Preparo dos padrões</i>	69
3.4.3 <i>Alfa-tocoferol, beta-caroteno e licopeno hepáticos</i>	70
3.4.4 <i>Vitamina C plasmática</i>	73
3.5 ATIVIDADE DAS CÉLULAS DE KUPFFER (CK).....	74
3.5.1 <i>Separação das células de Kupffer</i>	74
3.5.2 <i>Atividade fungicida ("Killing")</i>	75
3.5.3 <i>Luminescência das CK isoladas</i>	76
3.5.4 <i>Tratamento com GdCl₃</i>	78
3.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FÍGADO	78
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
4 RESULTADOS	80
4.1 PESO CORPÓREO E TEMPERATURA RETAL	80
4.2 PARÂMETROS PRÓ- E ANTIOXIDANTES HEPÁTICOS.....	81
4.3 PARÂMETROS MICROSSOMAIIS.....	83
4.4 ANTIOXIDANTES HEPÁTICOS LIPOSSOLÚVEIS	86
4.5 VITAMINA C PLASMÁTICA	87
4.6 ÍNDICE DE ESTRESSE OXIDATIVO	88
4.7 ATIVIDADE DAS CK	89
4.7.1 <i>Índices de fagocitose e "killing"</i>	89
4.7.2 <i>Luminescência</i>	90
4.7.3 <i>Tratamento com GdCl₃</i>	93
4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA	107
5 DISCUSSÃO	112
5.1 EFEITO DO HIPERTIREOIDISMO	112
5.1.1 <i>Efeito calorigênico</i>	112
5.1.2 <i>Parâmetros de estresse oxidativo</i>	113
5.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM LINDANO.....	116
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO DE RATOS HIPERTIROÍDEOS COM LINDANO.....	118
5.4 EFEITO DOS TRATAMENTOS NA FUNÇÃO DAS CK.....	120
6 CONCLUSÕES.....	130
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
8 CURRICULUM VITAE.....	144
9 ANEXO.....	148

1 Introdução

1.1 O fígado

Localizado como um filtro entre o sistema digestivo e o resto do organismo, o fígado, o maior órgão sólido do corpo humano, recebe diariamente um fluxo de nutrientes e de substâncias potencialmente tóxicas, que chegam ao órgão pela circulação sangüínea. Além do sangue arterial, rico em oxigênio, que chega ao fígado pela artéria hepática, o fígado recebe a maior parte do seu sangue por uma segunda via, a veia porta (Figura 1). Pela veia porta, o fígado recebe o sangue proveniente do intestino, baço e pâncreas que, após passar por milhares de sinusóides hepáticos, escoam para as veias hepáticas e volta à circulação geral pela veia cava. Este fluxo de sangue pelo fígado permite que as células retículo-endoteliais dos sinusóides hepáticos removam bactérias e quaisquer outros elementos particulados que possam entrar na circulação pelo trato gastrintestinal. Nutrientes hidrossolúveis, absorvidos pelo intestino, também são levados ao fígado pela veia porta, onde são retidos e, temporariamente, estocados, tanto pelas células retículo-endoteliais como pelas células do parênquima hepático, os hepatócitos (Guyton & Hall, 1996a).

Figura 1. Esquema da circulação esplâncnica (Segundo Guyton & Hall, 1996a).

A secreção de bile pelo fígado, que o assemelha funcionalmente a uma glândula exócrina, levou à busca da definição da unidade funcional do fígado. Em 1833, Kiernam descreveu o lóbulo hepático como sendo a unidade de tecido hepático que contém a veia centrolobular em seu centro e espaços porta, contendo ramificações dos dutos biliares, da artéria hepática e da veia porta, na periferia. Muitos anos mais tarde, Rappaport sugeriu o modelo dos “ácinos hepáticos”, onde o ácino é definido como uma porção de parênquima vascularizado por um ramo terminal da veia porta. Este parênquima acinar é então dividido em três zonas, de acordo com o gradiente de oxigênio e nutrientes no sangue sinusoidal: a zona 1 (periportal) a mais próxima ao espaço porta, recebe diretamente sangue rico em oxigênio e nutrientes; ela é circundada pela zona 2, que por sua vez é circundada pela zona 3 (perivenosa

ou centrolobular) a mais periférica das três e, conseqüentemente, a mais pobre em oxigênio e nutrientes (Desmet, 1994). Estes dois conceitos podem ser unidos no esquema representado na Figura 2.

Figura 2. Conceito morfológico e funcional do lóbulo hepático, mostrando o lóbulo hexagonal ancorado pelos espaços porta e a vênula hepática terminal ao centro. Na divisão funcional do lóbulo, o espaço porta, rico em oxigênio e nutrientes, está no centro da zona 1, enquanto a zona 3 circunda a vênula hepática terminal (Segundo Rubin & Farber, 1994).

Apesar de não haver uma divisão morfológica entre as diversas áreas do fígado, o parênquima hepático não é funcionalmente homogêneo. As enzimas do metabolismo de carboidratos, assim como as do metabolismo da amônia, têm localizações preferenciais no parênquima hepático. As enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos (isoformas do citocromo P450) prevalecem na zona centrolobular (zona 3) enquanto os elementos de proteção, como a

glutathiona e a enzima glutathiona peroxidase, são encontrados em níveis mais altos nos hepatócitos periportais (zona 1) (Desmet, 1994).

Estruturalmente, também ocorrem diferenças dependentes da localização no órgão. A forma dos sinusóides e a composição da matriz do espaço de Disse revelam variações zonais. As células endoteliais apresentam maior porosidade na zona 3, as células de Kupffer são maiores e mais numerosas na zona 1 e as células de Ito parecem predominar na zona 3 (Desmet, 1994).

1.1.1 As células de Kupffer: fagócitos do sinusóide hepático

As células de Kupffer (CK) são os macrófagos residentes no fígado. Primeiramente reconhecidas pelo patologista C. von Kupffer, elas estão localizadas no lúmen dos sinusóides hepáticos, por cima das células endoteliais, por vezes apresentando extensões para dentro do espaço existente entre a camada de células endoteliais e os hepatócitos (espaço de Disse) (Figura 3). No fígado de rato, elas representam 15% do número total de células e 3% da massa (Decker, 1990). As populações de CK no fígado apresentam uma considerável heterogeneidade, sendo que as CK presentes nas regiões periportais tendem a ser maiores e mais fagocíticas, enquanto que as CK centrolobulares são menores e mais especializadas na produção de substâncias bioativas e no processamento de antígenos (Bouwens e cols., 1992; Hardonk e cols., 1992).

Figura 3. Representação esquematizada do sinusóide hepático. As células endoteliais formam uma capa fenestrada entre o lúmen e o espaço de Disse. As células de Ito, que estocam gordura, estão neste espaço. As células de Kupffer se localizam no lúmen, por cima das células endoteliais, com extensões ocasionais para dentro do espaço de Disse (Segundo Decker, 1990).

As CK representam o maior conjunto de macrófagos do corpo, sendo as primeiras células do sistema fagocítico a encontrarem material antigênico proveniente do trato gastrointestinal. Apesar de sua capacidade de processamento de antígenos ser bem menor do que a de outros macrófagos, elas são altamente fagocíticas, agindo como potentes seqüestradores na defesa do hospedeiro. As CK são particularmente importantes no clareamento e processamento de endotoxinas (Winwood & Arthur, 1998).

As CK que entram em contato com material fagocitável exibem o fenômeno conhecido como “burst” oxidativo, sendo o principal produto deste processo o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A produção de $O_2^{\bullet-}$ nas CK durante a fagocitose, assim como em outros fagócitos, é catalisada pela enzima NADPH oxidase, que somente torna-se ativa após o estímulo, momento em que o complexo enzimático é montado na membrana plasmática dessas células. A estrutura da NADPH oxidase, representada na Figura 4, refere-se à

enzima presente em neutrófilos, onde ela tem sido mais estudada. É possível que a estrutura da NADPH oxidase presente em CK seja algo diferente deste modelo. De fato, uma subunidade de 22 KDa foi identificada em preparações de membrana de CK; entretanto, anticorpos dirigidos à subunidade de 91 KDa da NADPH oxidase de neutrófilo ligaram-se a uma proteína de 58-60 KDa em CK (Arlt & Dieter, 1993). Qualquer que seja sua conformação, a enzima ativa, tanto em neutrófilos quanto em macrófagos, catalisa a seguinte reação:

O complexo ativo fica associado à membrana, de um lado interagindo com o NADPH e do outro, com o O_2 . A ativação da NADPH oxidase é a responsável pelo aumento de consumo de O_2 por fagócitos ativados.

Figura 4. Representação esquematizada da ativação do complexo da NADPH oxidase na membrana de neutrófilos. Na células em repouso, as proteínas p40^{phox} , p47^{phox} e p67^{phox} existem no citossol como um complexo. Quando a célula é ativada, o componente p47^{phox} é fosforilado e todo o complexo citossólico migra para a membrana, onde se associa ao citocromo b_{558} , uma proteína heterodimérica composta pelos dois outros componentes do complexo ativo: a p22^{phox} e a $\text{gp91}^{\text{phox}}$ (Segundo Babior, 1999).

O aumento no nível de NADP^+ , pela ação da NADPH oxidase, ativa a via das pentoses, onde o NADPH é regenerado. O $\text{O}_2^{\bullet-}$, formado pela NADPH oxidase, é rapidamente convertido em outras espécies reativas, como o H_2O_2 e o $\text{HO}^{\bullet}$, que são, juntamente com proteínas liberadas dos grânulos citoplasmáticos, responsáveis pela injúria a microorganismos e ao tecido circundante (McPhail & Harvath, 1993). O ácido hipocloroso, que é liberado por neutrófilos ativados, não é produzido nas CK pela ausência, em macrófagos, da enzima responsável por sua produção, a mieloperoxidase (Winterbourn e cols., 2000).

No caso das CK, a maior parte da fagocitose é mediada por receptores, principalmente pela região Fc das imunoglobulinas, componentes de complemento e glicoconjugados (Winwood & Arthur, 1998). A ativação da proteína quinase C (PKC) pela regulação da fosfolipase C, e alterações no fluxo intracelular de Ca^{2+} são processos de sinalização celular envolvidos na ativação da NADPH oxidase das CK (Figura 5) (Dieter & Fitzke, 1993).

Figura 5. Sinalização celular da cascata de ativação de CK (Segundo Decker, 1990).

As CK de rato ativadas por lipopolissacarídeos (LPS) que são endotoxinas de bactérias intestinais Gram-negativas, são também capazes de sintetizar óxido nítrico (NO^*) a partir de L-arginina, pela ação de uma forma induzível de óxido nítrico sintase (NOS). A forma induzível da NOS presente nas CK, diferente da forma constitutiva da enzima encontrada em hepatócitos e células endoteliais, tem sua expressão estimulada, além de LPS, por interferon- γ e pelo fator necrosante tumoral- α (TNF- α) (Decker, 1998). O NO^* produzido dentro do sinusóide hepático exerce uma função na regulação do fluxo sanguíneo hepático, devido à sua ação relaxante do endotélio (Decker, 1990). Por outro lado, esta produção de NO^* pelas CK também tem um caráter citotóxico, uma vez que, em conjunto com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ produzido pela NADPH oxidase, pode formar um poderoso oxidante, o peroxinitrito (ONOO^-). Nesse

sentido, CK, estimuladas com LPS e co-cultivadas com hepatócitos, causam uma diminuição na síntese protéica nestes hepatócitos, efeito este dependente de L-arginina (Billiar e cols., 1989). A formação de ONNO^- pode ser observada como o componente da luminescência, produzida por CK ativadas, sensível a inibidores da NOS (Sies & de Groot, 1992).

Além do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e do $\text{NO}^{\bullet}$, as CK secretam um vasto conjunto de substâncias bioativas. A Tabela 1 mostra os principais grupos de produtos secretados pelas CK.

Tabela 1: Principais produtos de secreção das CK (Segundo Winwood & Arthur, 1998).

Moduladores de funções celulares	
Eicosanoides	Prostaglandinas: PGI_2 , PGE_2 , PGD_2 , PFG_2 , TXA_2 Leucotrienos: LTB_4 , LTE_4
Fator ativador de plaquetas	
Citocinas	IL-1 , IL-6 , $\text{TNF}\alpha$, interferons, $\text{TGF}\beta$, $\text{TGF}\alpha$, HGF
Mecanismos de defesa e citotoxicidade	
Componentes de complemento	
Espécies reativas de oxigênio	$\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\text{HO}^{\bullet}$
$\text{NO}^{\bullet}$	
Lisozima	
Enzimas lisossomais	Catepsinas, β -glicuronidase, β -acetil glicosaminidase, peroxidase, esterases, acetilases
Proteinases neutras	Ativador de plasminogênio, collagenase tipo IV 95 Da/gelatinase B, collagenase intersticial
Outras enzimas	Apolipoproteína E α_1 iduronidase Fosfolipase A_2

Durante o dano hepático, a população de CK sofre aumentos dramáticos. Na necrose hepática, características de ativação incluem liberação de espécies reativas de oxigênio, de prostaglandinas e leucotrienos, de citocinas e enzimas proteolíticas lisossomais, sugerindo que as CK também podem ter um papel

patológico, direto ou indireto, no dano tecidual. Muitos modelos de dano hepático, incluindo aqueles induzidos por endotoxinas, etanol, tetracloreto de carbono, isquemia/reperfusão, galactosamina e acetaminofeno, fornecem evidências desta função (Winwood & Arthur, 1998). No caso da isquemia/reperfusão hepática, há evidências que, não apenas a produção de espécies reativas de oxigênio pelas CK ativadas levam ao estresse oxidativo hepático, mas também outros produtos secretados pelas CK nestas condições, em particular o $\text{TNF-}\alpha$, que podem interagir com o hepatócito e interferir no fluxo de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (Cutrín e cols., 1998).

1.2 Biotransformação de xenobióticos

Além da importante função de captar, estocar e metabolizar nutrientes como aminoácidos, carboidratos, lipídios e algumas vitaminas, cabe também ao fígado a maior parte do metabolismo de produtos endógenos, como esteróides e eicosanóides entre outros, e a biotransformação de xenobióticos no organismo. O termo biotransformação geralmente se refere à conversão enzimática de substâncias hidrofóbicas, estranhas ao organismo, em derivados hidrossolúveis, que possam ser mais facilmente excretados pela bile ou pela urina. Este mecanismo é dividido em duas etapas: a fase I inclui reações de hidrólise, redução e oxidação, onde grupos funcionais específicos ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ ou $-\text{COOH}$) necessários às reações da fase subsequente, são adicionados ou expostos e, a fase II, constituída de reações biossintéticas, geralmente a partir dos produtos da fase I (deBethizy & Hayes, 1994).

Várias são as enzimas participantes da fase I da biotransformação de xenobióticos, mas pode-se dizer que o sistema monooxigenase dependente do citocromo P450, também conhecido como oxidase de função mista, é o sistema enzimático mais conspícuo dessa fase. O termo citocromo P450 engloba um grupo de hemoproteínas que, quando reduzidas e complexadas com monóxido de carbono, exibem um pico de absorção de luz em 450 nm (Omura & Sato, 1964). Em eucariotos, ocorrem várias isoformas do citocromo P450, que se apresentam ligadas à membrana mitocondrial ou, em sua maior parte, ao retículo endoplasmático. No fígado, a presença do citocromo P450 é especialmente abundante, representando cerca de 20% do conteúdo protéico do retículo endoplasmático (Goeptar e cols., 1995).

Além do citocromo P450, o funcionamento deste sistema requer a transferência de elétrons do NADPH para o citocromo P450, que é catalisada pela flavoenzima NADPH citocromo P450 redutase. A estequiometria da reação catalisada por esse conjunto é a seguinte:

A incorporação de um átomo de oxigênio no substrato, a partir do oxigênio molecular, é a origem do termo monooxigenase. O nome oxidase de função mista se refere à oxidação do substrato, concomitante à redução de um átomo de oxigênio a água (deBethizy & Hayes, 1994).

As reações catalisadas pelo sistema monooxigenase dependente de citocromo P450 são, em sua maioria, reações de oxidação (tais como hidroxilações, epoxidações, *N*-desmetilações, desalquilações, *S*-oxidações,

desaminações, sulfoxidações, dessulfurações e desalogenações oxidativas) com a conseqüente conversão de substratos lipofílicos em produtos mais hidrofílicos. Além disso, o citocromo P450 também pode utilizar peróxidos orgânicos como doadores do átomo de oxigênio a ser incorporado no substrato, tendo assim ação peroxidásica. Ainda, em condições de baixa pressão de oxigênio, o citocromo P450 pode, ao invés de oxidar o substrato, reduzi-lo, gerando uma espécie radicalar centrada em um átomo de carbono (Figura 6) (Goeptar e cols., 1995).

O ferro do grupo prostético heme do citocromo P450 está localizado centro de um anel protoporfirínico, com o qual mantém quatro ligações. O ferro também apresenta uma quinta ligação com um resíduo cisteinil da apoproteína, e uma sexta ligação, com um grupo hidroxila de um resíduo de aminoácido ou com uma molécula de água. Este ferro existe no citocromo P450 sob duas conformações, uma de alto spin ($\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{AS}}$) onde o ferro se encontra deslocado do plano delimitado pelo anel protoporfirínico e mais receptivo à transferência de elétrons do NADPH, e outra de baixo spin ($\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{BS}}$) a forma predominante do P450 em repouso, onde o ferro se encontra alinhado com o anel protoporfirínico. Essas duas formas do citocromo P450 se alternam, dependendo da interação do P450 com o substrato. Substratos hidrofóbicos retiram a molécula de água da sexta ligação com o ferro, fazendo com que este saia do plano do anel protoporfirínico e passando o ferro do estado de baixo spin para o de alto spin, tornando a transferência de elétrons do NADPH termodinamicamente favorável; essa interação é descrita como sendo do tipo I. Uma interação do tipo II atua de maneira contrária, fazendo com que a conformação $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{AS}}$ passe para $\text{Fe}^{3+}\text{-P450}_{\text{BS}}$ (Goeptar e cols., 1995).

Durante a função monooxigenásica do citocromo P450, pode ocorrer o desacoplamento da reação, fazendo com que o O_2 , ao invés de ser utilizado na oxidação do substrato, seja reduzido a $O_2^{\bullet-}$ e/ou H_2O_2 e liberado da reação. Neste caso, o citocromo P450 atua como oxigênio redutase (Figura 6). Quando o O_2 se liga ao Fe^{2+} -P450, este se encontra na conformação de alto spin. A ligação do O_2 provoca uma alteração no equilíbrio de spin do Fe^{2+} -P450, tornando-o de baixo spin, enquanto o O_2 , de seu estado triplete basal, se torna uma espécie singlete (1O_2). O 1O_2 , após receber a doação de um elétron do Fe^{2+} -P450_{BS}, torna-se $O_2^{\bullet-}$ enquanto o ferro passa para Fe^{3+} -P450_{AS}, desacoplando a reação de oxidação do substrato. Ambas as isoformas induzíveis por fenobarbital (CYP 2B) e por etanol (CYP 2E1) exibem altas taxas de desacoplamento na ausência de seus substratos (Goeptar e cols., 1995). O desacoplamento do CYP 2E1 tem um papel importante no processo de peroxidação lipídica em microsossomos hepáticos de ratos pré-tratados com etanol ou acetona, uma vez que o $O_2^{\bullet-}$ gerado pode produzir, na presença de ferro, o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) uma potente espécie reativa capaz de iniciar o processo de peroxidação lipídica (Ekström & Ingelman-Sundberg, 1989). A atividade oxigênio redutásica do citocromo P450 é estimulada por compostos específicos, como os pseudo-substratos perfluoro-n-hexano, perfluoro-ciclohexano e 1,1,1-tricloroetano; por desacopladores parciais como hexobarbitalbenzfetamina, barbiturados, N-acetil-p-benzoquinonas e 2,3,5,6-tetra-metilbenzoquinona; e pelo agente alquilante 2-bromo-4'-nitroacetopenona (Goeptar e cols., 1995).

Radical livre, por definição, é qualquer espécie capaz de existência independente e que possua pelo menos um elétron desemparelhado, ou seja, pelo menos um elétron isolado em um orbital atômico ou molecular (Halliwell & Gutteridge, 1999). Esse tipo de elétron pode reagir com átomos isolados

(hidrogênio, íons metálicos, etc.) ou com moléculas (açúcares, proteínas, lipídios, DNA, etc.) sendo esta propriedade biologicamente relevante (Slater, 1984; Halliwell, 1987; Sies, 1993).

Usualmente, os seres aeróbios reduzem a maior parte do oxigênio absorvido a água pelas enzimas da cadeia respiratória e do retículo endoplasmático. Na mitocôndria, o sistema enzimático envolvido no transporte de elétrons reduz o oxigênio diretamente a água, fornecendo 4 elétrons ao mesmo. Entretanto, cerca de 1 a 3% deste oxigênio é parcialmente reduzido, gerando elementos intermediários reativos, chamados de espécies reativas de oxigênio. Este vazamento de elétrons da cadeia respiratória (pois os mesmos não chegam até a citocromo oxidase, para a redução total do oxigênio) se dá em dois níveis: do complexo I, envolvendo a NADH coenzima Q redutase (Turrens & Boveris, 1980) e do complexo III, mais precisamente da coenzima Q na sua forma radicalar (Turrens e cols., 1985).

As quatro etapas envolvidas neste processo e que dão origem aos intermediários mencionados estão indicadas a seguir:

Espécies reativas de oxigênio (ERO) impropriamente chamadas de radicais livres durante muito tempo, além de serem produzidas pela cadeia de elétrons mitocondrial e durante a biotransformação de xenobióticos que utilizam o sistema do citocromo P450, conforme descrito em capítulo anterior, podem ser produzidas, também, após exposição à radiação UVA e UVB (Gerschman e cols., 1954) no processo de fagocitose (Babior, 1999) durante o metabolismo

de compostos da dieta (Ames, 1983) no processo de isquemia-reperfusão, envolvendo a participação de enzimas solúveis como a xantina oxidase (McCord, 1987) na oxidação de catecolaminas (Thomas e cols., 1976) entre outros.

O radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é produzido por outros sistemas biológicos endógenos, além dos já citados: pela ação de certas enzimas citossólicas (xantina oxidase, triptofano dioxigenase e aldeído oxidase) e durante a autooxidação de pequenas moléculas, tais como tióis, flavinas, quinonas, catecolaminas e pterinas (Cross & Jones, 1991). Apesar de apresentar baixa reatividade, esta espécie reativa de oxigênio é capaz de inativar enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase (Fridovich, 1986). Por outro lado, por sua ação indireta, danos a macromoléculas podem ser causados, como a peroxidação de lipídios, resultando na destruição de membranas e células (Fridovich, 1978), ou a quebra de fita de DNA (Meneghini, 1988). Isto se deve ao fato do radical ânion superóxido ser um precursor de espécies oxidantes mais potentes, cuja produção depende da presença simultânea de peróxido de hidrogênio pela reação de Haber-Weiss:

Esta reação na verdade ocorre em duas etapas e é catalisada por íons Fe^{3+} . O radical superóxido participa da redução do ferro à sua forma ferrosa ($Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$) que pode, por sua vez, reduzir o peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1978). É o que ocorre na reação de Fenton:

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido no organismo, principalmente por dismutação, espontânea ou catalisada pelas superóxido dismutases (SOD) do $\text{O}_2^{\bullet-}$, de acordo com a seguinte reação:

Além da atividade das superóxido dismutases, atividades de outras enzimas, como a monoamina oxidase, a urato oxidase e a D-aminoácido oxidase, também dão origem a H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1999). Outra contribuição importante para a produção de H_2O_2 no organismo é dada por fagócitos ativados, onde o H_2O_2 é produzido pela dismutação não-enzimática do $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzido pela NADPH oxidase (Russo e cols., 1989; Lunec, 1990).

O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim uma espécie reativa de oxigênio, uma vez que não possui elétrons desemparelhados no orbital mais externo. Apesar de não ser uma espécie particularmente reativa, o H_2O_2 é capaz de inativar enzimas, principalmente pela oxidação de grupos tíois essenciais. O seu maior potencial oxidante, entretanto, é exercido de forma indireta (Floyd & Lewis, 1983) pela geração de radical hidroxila na reação de Fenton. O H_2O_2 , nessas condições, torna-se um bom oxidante: quando em concentração suficiente, sua toxicidade é aumentada de 10 a 100 vezes em presença de ferro, podendo, desta forma, destruir estruturas celulares (Eaton, 1991). O H_2O_2 atravessa membranas facilmente, atinge o interior de outras células e, até mesmo, o núcleo da células no qual foi gerado, levando, assim, à formação de

espécies mais reativas, a distância. Este fato foi demonstrado, por exemplo, em experimentos onde quebras de fita simples no DNA foram observadas, *in vivo*, como resultado de uma reação de Haber-Weiss ocorrida no interior do núcleo celular (Mello-Filho & Meneghini, 1984).

O radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) é uma das espécies químicas mais reativas que se conhece; ele tem a capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de moléculas biológicas, modificando suas funções. O $\text{HO}^\bullet$ é produzido, biologicamente, na reação de Fenton, ou ainda, pela exposição da célula à radiação ionizante, devido à radiólise da água no seu interior. A velocidade de reação deste radical é muito alta, combinando-se praticamente com qualquer molécula *in vivo* assim que gerado, numa reação controlada pela velocidade de difusão do radical (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Outra espécie reativa importante, o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) teve seu papel biológico identificado como sendo o fator de relaxamento derivado do endotélio no final da década de 1980 (Ignarro e cols., 1987). O $\text{NO}^\bullet$ é produzido a partir de L-arginina, NADPH e O_2 pela enzima NO sintase (NOS) da qual pelo menos três formas já foram identificadas. Uma, constitutiva, citossólica, é dependente de Ca^{2+} e calmodulina e libera $\text{NO}^\bullet$ por curtos períodos de tempo, em resposta a um receptor ou estímulo físico; essa isoenzima está presente em células endoteliais e epiteliais. O $\text{NO}^\bullet$ produzido constitutivamente atua como mecanismo de transdução de sinal em respostas fisiológicas. A outra forma de NOS é a neuronal, que também é constitutiva e dependente de Ca^{2+} , mas que está presente em células neuronais e de músculo esquelético. A terceira isoenzima é a NOS induzida após estímulo, geralmente inflamatório, em macrófagos, hepatócitos, astrócitos, células musculares lisas e vários outros

tipos celulares, e sintetiza $\text{NO}^\bullet$ por longos períodos de tempo. A NOS induzível é independente de Ca^{2+} e requer tetrahydrobiopterina como cofator (Moncada e cols., 1991; Hemmens & Mayer, 1998).

O $\text{NO}^\bullet$, que apesar de ser um radical livre é uma espécie pouco reativa, tem uma química bastante complexa, exercendo efeitos diretos e indiretos sobre as moléculas biológicas. Os efeitos diretos, que predominam em baixas concentrações de $\text{NO}^\bullet$ ($< 1 \mu\text{M}$) incluem: 1) reações com complexos metálicos, tendo como resultado, entre outros efeitos, a inibição da catalase e dos citocromos c e P450, a ativação da guanilato ciclase e da hemoxigenase e a oxidação da oxihemoglobina a metahemoglobina; e 2) reações com espécies radicalares, tais como radicais alcoxila e peroxila, onde o $\text{NO}^\bullet$ pode ter um papel protetor, inibindo a peroxidação lipídica e apresentando um efeito inibitório da ciclooxygenase no metabolismo do ácido aracdônico. Os efeitos indiretos do $\text{NO}^\bullet$ envolvem a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e tornam-se significantes em concentrações mais altas de $\text{NO}^\bullet$ ($> 1 \mu\text{M}$). Para tanto, O $\text{NO}^\bullet$ reage primeiramente com O_2 ou $\text{O}_2^{\bullet-}$, formando dióxido (NO_2) e trióxido de nitrogênio (N_2O_3) no primeiro caso, ou peroxinitrito (ONNO^-) no segundo. Os efeitos das ERN podem ser subdivididos em nitração (ex. formação de nitrotirosina) oxidação (produzindo quebra de fita de DNA ou peroxidação lipídica) e nitrosilação (ex. formação de nitrosamina e S-nitrosotiol) (Wink & Mitchell, 1998).

1.4 Alvos moleculares das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As ERO e as ERN são capazes de interferir em vários processos biológicos, onde o dano causado está relacionado com o tipo da espécie reativa e a molécula atacada. Os principais alvos moleculares das espécies reativas são lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares.

A peroxidação de lipídios é iniciada pelo ataque de qualquer espécie suficientemente reativa, capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) de uma molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos poliinsaturados são particularmente sensíveis a esse ataque, o que apresenta grande importância biológica, uma vez que a maior parte dos ácidos graxos presentes em membranas de células animais e em lipoproteínas são poliinsaturados. A presença da ligação dupla na cadeia carbônica do ácido graxo enfraquece a ligação do átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente, especialmente se houver dupla ligação de um ou de ambos os lados do $-\text{CH}_2-$. O $\text{HO}^\bullet$ pode iniciar, com muita facilidade, a cascata de lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Contrastando com o $\text{HO}^\bullet$, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ apresenta pouca reatividade para abstrair o hidrogênio da molécula de ácido graxo; ainda que sua reatividade fosse alta, o fato deste radical apresentar carga representa um impedimento para entrar em ambientes hidrofóbicos. A forma protonada do $\text{O}_2^{\bullet-}$, o radical

peridroxila ($\text{HO}_2^\bullet$) é mais reativo e pode abstrair um hidrogênio de ácidos graxos isolados, como os ácidos araquidônico, linoleico e linolênico. Entretanto, o $\text{HO}_2^\bullet$ parece preferencialmente estimular um processo de peroxidação lipídica já iniciado, pela reação com hidroperóxidos de lipídio (ROOH) (Aikens & Dix, 1991).

O radical de carbono formado após a abstração do próton é estabilizado, formando um dieno conjugado. A seguir, este composto reage com oxigênio, produzindo o radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) de acordo com a seguinte reação:

O radical peroxila pode então reagir com uma nova molécula de ácido graxo poliinsaturado, formando novo radical centrado no carbono, que, por sua vez, reage com oxigênio, dando origem a novos radicais peroxila, propagando desta forma a peroxidação de lipídios.

O radical peroxila, ao abstrair o hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo poliinsaturado, se transforma em um peróxido de lipídio (ROOH). O termo peróxido de lipídio se refere também a peróxidos cíclicos, produtos intermediários da lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Figura 7. Esquema geral da peroxidação de lipídios (Segundo Halliwell & Gutteridge, 1999).

A Figura 7 mostra, resumidamente, as principais etapas da peroxidação de lipídios. Os efeitos gerais, decorrentes da peroxidação de lipídios são: diminuição da fluidez de membranas, facilidade na troca de fosfolipídios entre

as duas monocamadas da membrana, aumento da permeabilidade da bicamada da membrana a substâncias que habitualmente não atravessam a mesma, a não ser através de canais específicos, e inativação de sistemas enzimáticos ligados à membrana (Richter, 1987).

A decomposição dos peróxidos de lipídios marca a terminação da peroxidação lipídica. Alguns peróxidos se decompõem na presença de metais de transição, como, por exemplo, o ferro, produzindo pentano. Os gases etano e etileno são produzidos em reações similares, a partir de ácido linoleico. Ainda como produtos finais da peroxidação de lipídios podemos enumerar i) o malonildialdeído (MDA) que em pH fisiológico reage rapidamente com proteínas e ii) o 4-hidroxi-2-trans-nonenal, formado durante a peroxidação de ácidos graxos, como o ácido linoleico e araquidônico. Entretanto, considera-se que a terminação efetiva da peroxidação lipídica envolva reações entre duas espécies reativas, com a formação de espécies de menor reatividade (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A geração de radicais peroxila e alcoxila, aldeídos e outros produtos da peroxidação lipídica, em sistemas de membranas e em partículas de lipoproteínas, pode causar dano severo às proteínas aí presentes (Richter, 1987; Refsgaard e cols., 2000). Está bem demonstrado que receptores de superfície celular, que permitem às células responder aos hormônios e citocinas, podem ser inativados durante a peroxidação de lipídios, da mesma maneira que o são enzimas como a Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático e a $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase, envolvidas na manutenção do balanço iônico das células. Na mitocôndria, tanto as enzimas da matriz como os componentes da cadeia

respiratória podem ser danificados, como a destruição da ubiquinona (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A exposição de proteínas à ação de ERO ou ERN pode levar à oxidação de resíduos de aminoácidos, à formação de ligações cruzadas entre proteínas e à oxidação do núcleo estrutural, levando à fragmentação da proteína. A oxidação de uma proteína pode, desta forma, levar à perda de sua função (Berlett & Stadtman, 1997).

Todos os resíduos de aminoácidos de proteínas são suscetíveis à oxidação por $\text{HO}^\bullet$; entretanto, os grupos tióis, presentes nos aminoácidos cisteína e metionina, são especialmente oxidáveis pelo ataque de vários ERO/ERN. Além disso, pela reação direta destes grupos com metais de transição, pode haver a formação de radicais tiila ($\text{RS}^\bullet$):

A metionina é rapidamente oxidável por $\text{HO}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , HOCl , cloraminas e ONOO^- . Os resíduos de metionina são, em geral, essenciais para a atividade de proteínas, como por exemplo, a habilidade da α_1 - antiproteínase de inibir a atividade da elastase. A oxidação da metionina na molécula da α_1 - antiproteínase, pela ação de ONOO^- , $\text{RO}_2^\bullet$ e outras espécies reativas, causa uma diminuição da capacidade inibidora da elastase desta proteína. Os resíduos de triptofano em proteínas são sensíveis ao dano pelo radical hidroxila e alguns outros radicais de oxigênio, gerando radicais peroxila e, eventualmente, N-formilquinurenina e quinurenina, produtos fluorescentes, característicos do processo oxidativo desse aminoácido. O triptofano é um potente sequestrador

de oxigênio *singlet* e pode ser fragmentado, em proteínas expostas a estas espécies. O triptofano pode, também, ser nitrado pelo $\text{NO}_2^\bullet$ e sofrer reação de adição com o peroxinitrito. A ação de espécies reativas sobre resíduos dos aminoácidos prolina e arginina, em proteínas, pode levar à formação do semialdeído glutâmico. A oxidação de resíduos de histidina em proteínas pode ser particularmente importante nas reações de ligação cruzada em proteínas, assim como marcadores protéicos para proteólise. A histidina tem alta velocidade de reação com oxigênio singlet, formando vários produtos de oxidação, que podem ser detectados em proteínas expostas ao $^1\text{O}_2$ (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os resíduos de tirosina em proteínas podem ser atacados por ERO, por ERN, sofrendo nitração, e por HOCl, levando à cloração. O ataque de radicais $\text{OH}^\bullet$ pode hidroxilar a tirosina a dihidroxifenilalanina. Os resíduos de tirosina são importantes no sítio ativo de diversas enzimas, além de participarem do processo de transdução de sinal; a nitração, a cloração ou a ligação cruzada de resíduos de tirosina podem bloquear a fosforilação da tirosina, comprometendo assim processos dependentes da transdução de sinal, tais como proliferação, diferenciação e transformação celular (Berlett e cols., 1998).

Além dos efeitos indiretos que as ERO e as ERN têm sobre o DNA, por alterações nos processo de transdução de sinal, ativação de endonucleases devido ao aumento da concentração de íons Ca^{2+} , ou inativação de proteínas de reparo por dano oxidativo, a molécula de DNA também pode sofrer o ataque direto de espécies reativas em células submetidas a condições de estresse oxidativo. A exposição de células a radiação ionizante, a concentrações

elevadas de oxigênio, a fumaça de cigarro, a ozona, a substâncias que sofrem ciclo redox como a adriamicina, a drogas que sofrem autooxidação, como a dopamina, noradrenalina e adrenalina, e ao fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são algumas condições onde se tem observado aumento na quebra da fita de DNA. As principais conseqüências do dano oxidativo às bases do DNA são o aparecimento de mutações, diretamente pela ação de espécies reativas, ou durante as tentativas da células de replicar ou reparar o DNA danificado (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Além do efeito de quebra de fita, que se dá pela abstração de um átomo de hidrogênio, o ataque do DNA pelo $\text{HO}^\bullet$, a mais reativa das ERO, gera uma diversidade de produtos de adição, uma vez que este radical reage com açúcares e bases purínicas e pirimidínicas do DNA, formando adutos. Por exemplo, o $\text{HO}^\bullet$ pode se adicionar à guanina nas posições 4, 5 ou 8 do anel purínico. A adição ao C-8 produz um radical aduto de OH em C-8, que eventualmente pode produzir tanto 8-hidroxiguanina como 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, usualmente abreviada como FAPyG. De maneira similar, o $\text{HO}^\bullet$ pode se adicionar ao C-4, C-5 ou C-8 da adenina, ou reagir com as bases pirimidínicas, timina e citosina, gerando uma série de produtos (Cadet e cols., 1999).

O açúcar desoxiribose também é fragmentado pelo radical $\text{HO}^\bullet$. Todas as posições do açúcar são susceptíveis à abstração de hidrogênio realizada pelo $\text{HO}^\bullet$, com a subsequente formação de radicais centrados no carbono. Na presença de oxigênio, há uma conversão rápida destes em radicais peroxila, que sofrem uma série de reações, incluindo desproporção, rearranjo,

eliminação de água e fragmentação da ligação C-C, produzindo uma razoável variedade de produtos carbonila (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Enquanto o ataque do radical $\text{HO}^\bullet$ sobre o DNA é quase totalmente indiscriminado, o do $^1\text{O}_2$ é muito mais seletivo. Ele produz, com eficiência, quebra da fita do DNA e gera, principalmente, produtos derivados da guanina, incluindo 8-hidroxiguanina e FAPyG (Devasagayam e cols., 1991).

Os radicais gerados durante a peroxidação de lipídios ($\text{RO}_2^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$) também podem causar dano ao DNA. Entretanto, parecem não ser tão eficientes quanto o $\text{HO}^\bullet$, sendo seu alvo preferido, novamente, a guanina. As espécies reativas de nitrogênio também podem atacar as bases do DNA, produzindo derivados nitrados, nitrosados e desaminados como, por exemplo, a 8-nitroguanina (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O DNA também pode ser modificado pelo H_2O_2 . Entretanto esta espécie, assim como o $\text{O}_2^\bullet$, não reage diretamente com o DNA. O mecanismo proposto para explicar este fato é que, no núcleo, em região bem próxima ao DNA, o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxila na reação de Fenton, catalisada por íons de metais de transição (Lloyd & Phillips, 1999).

O DNA mitocondrial, assim como o DNA genômico, pode ser atacado por ERO/ERN. O dano ao DNA mitocondrial tem sido sugerido como evento importante em algumas patologias e no envelhecimento. Uma boa prova disto é o encontro de muito mais bases lesadas no DNA mitocondrial, medida como 8-hidroxideoxiguanosina, em fígado de ratos e cérebros humanos, do que no DNA nuclear. Este aparente aumento no dano oxidativo ao DNA mitocondrial, comparado ao nuclear, pode ser devido à proximidade do DNA mitocondrial ao sítio de geração de ERO durante o transporte de elétrons na cadeia

respiratória, somado ao fato do DNA mitocondrial não apresentar proteção pelas histonas (Yakes & van Houten, 1997).

1.5 Defesas antioxidantes

A nível fisiológico, a defesa contra o dano provocado por ERO/ERN é realizada pela utilização de reservas antioxidantes celulares. A função primária dos antioxidantes é reduzir a velocidade de iniciação e/ou de propagação dos processos radicalares, suprimindo a geração de espécies reativas ou, eliminando-as, diminuindo, ou até inibindo, o dano oxidativo a uma molécula alvo. Um antioxidante é, então, qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas de um substrato oxidável, atrasa, significativamente, ou ainda evita, a oxidação deste substrato. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A defesa antioxidante inclui:

a) agentes que removem, cataliticamente, ERO/ERN. Exemplos disso são as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutational peroxidase;

b) proteínas que minimizam a biodisponibilidade de catalisadores de reações que produzem ERO/ERN, tais como os íons ferro e cobre. Exemplos disso são a transferrina, as haptoglobinas, a hemopexina e a metalotioneína. Esta categoria inclui, também, proteínas que oxidam íons ferrosos, como a ceruloplasmina;

c) proteínas que protegem biomoléculas contra dano (inclusive dano oxidativo) por outros mecanismos, como por exemplo as proteínas de choque térmico e,

d) substâncias de baixo peso molecular que seqüestram ERO e ERN. Exemplos incluem a glutathione, os tocoferóis, os carotenóides, o ácido ascórbico e, possivelmente, a bilirrubina e o ácido úrico. Alguns destes antioxidantes vêm da dieta, especialmente o ácido ascórbico e o α -tocoferol, havendo uma relação estreita entre a nutrição e o processo de defesa antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A composição da defesa antioxidante difere de tecido para tecido e de tipo celular para tipo celular (até mesmo de célula para célula do mesmo tipo) em um dado tecido. Os fluidos extracelulares possuem mecanismos protetores diferentes daqueles do ambiente intracelular. A defesa antioxidante pode, freqüentemente, ser induzida pela exposição do organismo a ERO e ERN e a moléculas de sinalização celular, tais como as citocinas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

O equilíbrio entre a atividade das três principais enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) é de extrema importância para a remoção dos intermediários tóxicos de oxigênio dos sistemas biológicos. A atividade da SOD, que consiste na dismutação de íons superóxido formando peróxido de hidrogênio, deve ser complementada pela CAT e GPx, gerando água e oxigênio molecular (CAT) ou água e glutathione oxidada (GPx).

A superóxido dismutase pode ser encontrada em diferentes formas já identificadas: a forma que contém cobre e zinco (CuZnSOD) (McCord &

Fridovich, 1969) outra forma que usa manganês (MnSOD) e ainda uma terceira que possui ferro em sua composição (FeSOD) (Wanders & Denis, 1992). A CuZnSOD é mais comumente encontrada no citoplasma das células eucarióticas, enquanto a FeSOD é encontrada em bactérias e a MnSOD na matriz das mitocôndrias (Halliwell & Gutteridge, 1999). As três formas catalisam a mesma reação, nominalmente:

A glutathione peroxidase é encontrada em vários tecidos animais, mas não é comumente encontrada em vegetais e bactérias, existindo em duas formas: uma contendo selênio e outra que não contém selênio. Algumas algas e fungos também apresentam esta enzima (Halliwell & Gutteridge, 1999). A GPx catalisa a redução do H_2O_2 , com oxidação conjunta da glutathione reduzida, segundo a reação:

Além de H_2O_2 , a GPx que contém selênio pode utilizar hidroperóxidos orgânicos como substrato (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A GSSG produzida pela atividade da glutathione peroxidase é economicamente recuperada pelas células na sua forma reduzida, através da atividade da glutathione redutase, que utiliza como doador de poder redutor o NADPH produzido na via das pentoses:

A catalase faz parte do grupo das hemoproteínas e, em animais, encontra-se principalmente no fígado e eritrócitos (Halliwell & Gutteridge, 1999). Catalisa uma reação de duas etapas, esquematizada como se segue:

É importante notar que o desequilíbrio entre as atividades das enzimas antioxidantes pode ser tanto causa como consequência de certos processos patológicos.

1.5.2 Antioxidantes não-enzimáticos

1.5.2.1 Compostos hidrossolúveis de baixo peso molecular

1.5.2.1.1 Glutathione total (GSHT)

Além de seu papel como cofator da glutathione peroxidase, a GSH está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo de ácido ascórbico, manutenção da comunicação entre células e impedindo a oxidação e ligação cruzada de grupos –SH protéicos. A GSH pode quelar íons de cobre e diminuir sua capacidade de gerar ERO ou, pelo menos, de liberá-los em solução. A GSH também é um agente radioprotetor e é um cofator para várias enzimas em diferentes vias metabólicas, incluindo as glioxilases e enzimas envolvidas na síntese de leucotrienos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

In vitro, a GSH pode reagir com $\text{OH}^\bullet$, HOCl , peroxinitrito, $\text{RO}^\bullet$, $\text{RO}_2^\bullet$, radicais centrados no carbono e $^1\text{O}_2$. Sua reação com espécies reativas gera radicais glutathionil ($\text{GS}^\bullet$) os quais, por sua vez, podem gerar $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela reação:

Os radicais glutathionil podem, também, reagir com ácido ascórbico (AsCH^-) recuperando a GSH no seu estado reduzido (Wardman & von Sonntag, 1995).

A reação de GSH com peroxinitrito (ONOO^-) parece levar à formação de um nitrosotiol (GSNO) que pode se decompor para regenerar óxido nítrico;

desta forma, a glutathiona pode, até certo ponto, reciclar o ONOO^- para $\text{NO}^\bullet$ (Villa e cols., 1994).

1.5.2.1.2 Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico puro é um sólido cristalino branco, muito solúvel em água. O ácido ascórbico possui dois grupos $-\text{OH}$ ionizáveis (Figura 8). Como o $\text{pK}_{\text{a}1}$ é de 4,25 e o $\text{pK}_{\text{a}2}$ é de 11,8, em pH fisiológico a forma monoiônica é favorecida. As plantas e a maioria dos animais podem sintetizar ascorbato a partir de glicose. Os seres humanos, outros primatas, cobaias e morcegos frugívoros, entretanto, perderam a enzima requerida para o passo final da síntese, necessitando assim de ascorbato na dieta (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O ascorbato é requerido, *in vivo*, como cofator de pelo menos oito enzimas, das quais as mais conhecidas são a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. O ascorbato também é requerido pela enzima dopamina- β -hidroxilase, que converte dopamina em noradrenalina (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Figura 8 - Estrutura do ácido ascórbico, do radical ascorbil e do ácido dehidroascórbico

A propriedade química mais notável do ascorbato é sua capacidade de agir como um agente redutor. Exemplos importantes são i) sua capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , importante na captação de ferro pelo intestino e, ii) a observação que o ascorbato dietário inibe a ação carcinogênica de diversos nitroso-compostos, administrados na alimentação de animais, que pode ser, em parte, atribuída à sua capacidade de reduzi-los a formas inativas. O ascorbato é, de fato, requerido por certas enzimas hidroxilásicas para manter o ferro ou cobre em seu sítio ativo na forma reduzida, necessária para que ocorra a hidroxilação. O potencial de redução do ascorbato o coloca próximo ao fim da lista de espécies oxidantes, isto é, ele tende a reduzir espécies mais reativas como $\text{HO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A doação de um elétron pelo ascorbato dá origem ao radical ascorbil (Figura 8) que pode ser oxidado adicionalmente para gerar dehidroascorbato (DHA). O radical ascorbil é, relativamente, não-reativo e parece não ser capaz de reduzir O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$. A fraca reatividade do ascorbil é a essência de muitos dos efeitos antioxidantes do ascorbato: um radical reativo interage com ascorbato e uma espécie muito menos reativa (ascorbil) é formada. O radical ascorbil sofre uma reação de desproporção, regenerando uma parte do ascorbato (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.5.2.2 Compostos lipossolúveis de baixo peso molecular

1.5.2.2.1 Tocoferóis e ubiquinona

O principal seqüestrador de radicais do interior das membranas humanas é o d- α -tocoferol, mais conhecido como vitamina E (Urano e cols., 1992). Na natureza, oito substâncias possuem atividade de vitamina E: d- α , d- β , d- γ e d- δ tocoferóis e d- α , d- β , d- γ e d- δ tocotrienóis. A forma mais eficiente como antioxidante, presente nas membranas biológicas, é a d- α -tocoferol (Figura 9) muitas vezes chamada de RRR- α -tocoferol. Os outros tocoferóis são menos importantes para o ser humano porque, apesar de atuarem como antioxidantes, eles são pobremente absorvidos pela mucosa intestinal e pouco retidos nos tecidos do organismo. Sabe-se também que o α -tocoferol pode estimular a resposta imunológica, reduzir a severidade das alterações mediadas por prostaglandinas e inibir a conversão de nitritos a nitrosaminas, que são fortes promotores de tumor (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Figura 9 - Isômeros da vitamina E

Os tocoferóis inibem a peroxidação lipídica porque eles seqüestram radicais peroxila ($ROO^\bullet$) muito mais rapidamente do que este radical pode

reagir com as cadeias laterais de ácidos graxos ou com proteínas de membrana:

O α -tocoferol é um antioxidante bloqueador de reações em cadeia, ou seja, ele pára a reação em cadeia da peroxidação lipídica transformando-se em um radical, sendo consumido durante o processo. Age como um antioxidante fenólico, doador de um átomo de hidrogênio a radicais lipídicos de peroxila, com a finalidade de impedir a propagação da reação de peroxidação. Assim, intercepta os radicais peroxila ($\text{ROO}^{\bullet}$) doando um átomo de hidrogênio, viabilizando a formação de hidroperóxido lipídico (ROOH) e transformando-se em radical tocoferoxil. O radical tocoferoxil resultante é relativamente estável e, em circunstâncias normais, insuficientemente reativo para iniciar a peroxidação lipídica *per se*, um critério essencial para um bom antioxidante. Estima-se que sob condições normais, o d- α -tocoferol detoxifica 90% dos radicais peroxila antes que eles reajam com ácidos graxos. Vários agentes redutores, incluindo, GSH, ácido ascórbico e ubiquinona, podem reagir com o radical tocoferoxil e regenerá-lo (Kay e cols., 1986; Liebler & Burr, 1992; Urano e cols., 1992).

Um dos compostos, presente em membranas, que pode atuar como um antioxidante bloqueador de reações em cadeia e recuperar o radical tocoferoxil é a ubiquinona, ou coenzima Q_n , em sua forma reduzida. O papel mais importante da coenzima Q_n é no transporte de elétrons mitocondrial. A ubiquinona é encontrada na membrana plasmática, em todas as membranas

intracelulares (especialmente no complexo de Golgi e lisossomos) e nas lipoproteínas de baixa densidade (Kagan e cols., 1994).

Frei e cols. (1990) descreveram a ubiquinona como exercendo uma atividade seqüestradora de radicais e inibindo a peroxidação lipídica em lipossomos, membranas (células, mitocôndrias, partículas submitocondriais, microssomos) e em lipoproteínas. Sugeriram, também, que a ação antioxidante direta pode ser uma importante função fisiológica da coenzima Q_n . Entretanto, ressaltaram a necessidade de altas concentrações para que ela exiba atividade antioxidante (Frei e cols., 1990).

O mecanismo de ação molecular responsável pela sua atividade antioxidante ainda é discutido. Apesar de sabermos várias de suas propriedades, não se sabe se o ubiquinol presente nas células e fluídos do organismo humano seqüestra os radicais peroxila,

ou, se ele atua regenerando o α -tocoferol,

ou, se participa de ambos processos (Kagan e cols., 1994).

Dentre os outros processos de regeneração do α -tocoferol sugeridos, talvez a sugestão mais aceita seja sua reciclagem pelo ácido ascórbico:

Uma vez que o ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, que não pode entrar no interior das membranas hidrofóbicas, esse mecanismo pressupõe que o radical α -tocoferoxil possa mover-se para perto da superfície da membrana, para sua redução pelo ácido ascórbico que está fora da membrana (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.5.2.2.2 Carotenóides

Os carotenóides não são oficialmente reconhecidos como nutrientes essenciais. Alguns carotenóides têm atividade pró-vitamina A, que é um nutriente essencial. Entretanto, contínuo e crescente número de evidências mostra que os efeitos benéficos dos carotenóides são independentes da atividade pró-vitamina A. Carotenóides são antioxidantes que protegem a integridade celular e diminuem o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, aumentam a ação do sistema imunológico, são eficazes no tratamento da protoporfiria eritropoiética e ativam a expressão de genes envolvidos na comunicação célula-célula.

Os carotenóides são moléculas de cadeia longa, com 40 átomos de carbono e um extenso sistema conjugado de duplas ligações. Possuem múltiplas configurações geométricas devido à possibilidade de rotação em torno dessas duplas ligações; essas características estruturais podem interferir na sua atividade antioxidante *in vivo*. Dentre os que possuem efetiva ação antioxidante podemos citar o licopeno e o β -caroteno, este último com atividade de pró-vitamina A (Stahl & Sies, 1996) (Figura 10).

Figura 10 – Estrutura de alguns carotenóides

Essas substâncias têm a capacidade de captar a energia de moléculas que se encontram em alto estado energético, absorvendo-a e diminuindo, ou até anulando, tal estado de excitação. Essas transições entre os estados de energia estão associadas a alterações na configuração de elétrons na molécula, o que pode influenciar a reatividade dessas substâncias com outras espécies. Sabe-se, por exemplo, que o β -caroteno é um potente neutralizador do $^1\text{O}_2$, atuando por esse mecanismo de transferência de energia, onde a molécula de $^1\text{O}_2$ é convertida a uma molécula menos reativa, o oxigênio triplet, ao mesmo tempo que a molécula de β -caroteno é promovida ao seu estado triplet (estado excitado de alta energia) (Machlin & Bendich, 1987). Subseqüentemente, a molécula excitada de β -caroteno libera sua energia na forma de calor. Nesta reação o β -caroteno age cataliticamente, sem ser consumido na reação.

Os carotenóides também podem atuar como varredores de $\text{ROO}^\bullet$ e outras formas de oxigênio ativo, características do estresse oxidativo em sistemas

animais, $\text{HO}^\bullet$ e ácido hipocloroso. O mecanismo exato pelo qual os carotenóides inibem a peroxidação lipídica ainda não está completamente elucidado. Burton e Ingold propuseram, em 1984, que a inibição da peroxidação lipídica pelo β -caroteno ocorre devido à formação de um complexo transitório de radical livre com o radical peroxila (Burton & Ingould, 1984).

O licopeno é um carotenóide que não possui atividade pró-vitamina A. Da mesma forma que o β -caroteno, possui atividade antioxidante, protegendo a integridade celular e diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas (Stahl & Sies, 1996).

1.6 Os hormônios da tireóide

1.6.1 Estrutura e atividade biológica dos hormônios da tireóide

A glândula tireóide sintetiza, estoca e secreta, principalmente, duas espécies moleculares de hormônios: a tiroxina (T_4) ou L-3,5,3',5'-tetraiodotironina e a triiodotironina (T_3) ou L-3,5,3'-triiodotironina (Figura 11). A tireóide também secreta outras variações destes hormônios iodados, como a 3,3',5'-triiodotironina ou T_3 reverso (T_3R) sendo, entretanto, T_3 e T_4 as duas formas de maior significância biológica. Os compostos ativos liberados pela tireóide que apresentam a posição 5' livre têm atividade biológica maior do que os iodados nesta posição. Assim, o T_3 é cerca de 5 a 8 vezes mais ativo que o T_4 (Norman & Litwack, 1997).

Figura 11: Estrutura da L-tiroxina (T_4) e L-3,5,3'-triiodotironina (T_3).

O principal produto da tireóide é o T_4 . Em seres humanos, a tiroxina circulante está presente em concentração cerca de 40 a 100 vezes maior do que a de T_3 ; já a concentração de T_3R liberada na corrente sangüínea é cerca de apenas 30 a 50% da de T_3 (Norman & Litwack, 1997). No entanto, durante os poucos dias subseqüentes à sua liberação, a maior parte do T_4 é lentamente

desiodada para formar T_3 ou a forma inativa T_3R , de tal forma que o hormônio, entregue e usado pelos tecidos, é sobretudo T_3 (Guyton & Hall, 1996b).

Os hormônios da tireóide são praticamente insolúveis em água e circulam pelo sangue ligados a proteínas transportadoras: a tireoglobulina (TGB) a pré-albumina fixadora de tiroxina (TBPA, também conhecida como transtirretina) e a albumina. A distribuição normal do T_4 entre estas proteínas é 70-75% ligado à TGB, 15-20% ligado à transtirretina e 5-10% ligado à albumina. O T_3 se encontra 70-75% ligado à TGB e 25-30% à albumina, tendo pouca ou nenhuma afinidade pela transtirretina. Contudo, a minúscula fração do hormônio total que fica na forma livre, cerca de 0,04% do T_4 e 0,4% do T_3 , é a real responsável pelo início das respostas biológicas ao hormônio (Norman & Litwack, 1997). Devido à sua natureza lipofílica, os hormônios da tireóide são capazes de atravessar membranas, desde que livres de suas proteínas transportadoras. Entretanto, há evidências da ocorrência de sítios de ligação específicos, saturáveis, na membrana de vários tipos celulares, promovendo o transporte ativo dos hormônios da tireóide (Krenning e cols., 1981).

A ação do hormônio da tireóide resulta principalmente da interação do T_3 com seus receptores nucleares (RT) que se ligam a regiões regulatórias dos genes, chamadas de elementos responsivos ao hormônio da tireóide, modificando sua expressão. O T_3 pode provocar aumento ou diminuição da expressão gênica, podendo também alterar a estabilidade de alguns RNAs mensageiros (RNAm). Os RT fazem parte de uma família de fatores de transcrição nuclear responsivos a hormônios e podem se apresentar na forma monomérica ou dimérica. RT na forma de dímeros geralmente funcionam na regulação positiva, enquanto que RT na forma monomérica podem conferir

regulação negativa. Entretanto, na regulação negativa, tanto a posição quanto a sequência dos elementos responsivos do DNA diferem daqueles que conferem a resposta positiva (Brent, 1994).

Os efeitos do hormônio da tireóide podem ser divididos em duas categorias principais, quanto às respostas biológicas: (a) efeitos na diferenciação celular e (b) efeitos nas vias metabólicas. Em relação aos últimos, os hormônios da tireóide atuam sobre uma grande variedade de funções metabólicas sendo que, na maioria dos casos, a influência relativa entre efeitos diretos e indiretos não é conhecida. Nos músculos esquelético e cardíaco, a ação do T_3 reduz a resistência vascular sistêmica, aumenta a contratilidade cardíaca e promove um efeito cronotrópico positivo. Além disso, aumenta a transcrição de genes da Ca^{2+} -ATPase e participa da regulação dos genes que codificam a miosina. No fígado e tecido adiposo, o T_3 é um importante modulador do metabolismo intermediário, estimulando tanto a lipogênese (em um primeiro estágio) quanto a lipólise. O aumento da lipogênese mantém os estoques de gordura e é o resultado da indução precoce das enzimas malato desidrogenase, glicose-6-fosfato desidrogenase e ácido graxo sintase. Os ácidos graxos derivados do tecido adiposo são substrato para a calorigênese induzida pelo hormônio da tireóide (Brent, 1994).

A elevação do metabolismo basal, que resulta no efeito calorigênico, é o efeito mais conspícuo da ação dos hormônios secretados pela tireóide. Todos os tecidos, exceto cérebro, testículos e baço, parecem apresentar este efeito que pode ser creditado, em grande parte, à estimulação da bomba de Na^+, K^+ (Stevens, 1973). A Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína heterodimérica, cuja transcrição é estimulada pela ação do T_3 . O T_3 também parece promover

modificações pós-transcricionais no RNAm desta proteína, de forma a torná-lo mais abundante (Brent, 1994). Contudo, o efeito do T_3 sobre a síntese da Na^+,K^+ -ATPase pode ser indireto, como mostram experimentos onde o aumento da permeabilidade da membrana celular a cátions monovalentes, na condição de hipertireoidismo, parece ser responsável pelo aumento da atividade da bomba de Na^+,K^+ (Haber & Loeb, 1984). Sendo o efeito do T_3 direto ou indireto, um estímulo na atividade da Na^+,K^+ -ATPase leva, forçosamente, ao aumento da demanda de ATP proveniente da fosforilação oxidativa mitocondrial. Concordantemente, a atividade de vários componentes da cadeia respiratória é aumentada pelos hormônios da tireóide, assim como a síntese protéica mitocondrial e microssomal (Hulbert, 1978). A administração de T_3 ou T_4 a animais aumenta, também, o número e tamanho das mitocôndrias na maioria das células do corpo, ampliando a área da superfície de membrana destas organelas de maneira proporcional ao aumento da taxa metabólica do animal. Este efeito pode ser tanto causa como consequência do aumento da atividade celular. Por outro lado, a administração de doses suprafisiológicas de hormônio da tireóide faz com que as mitocôndrias inchem desordenadamente, podendo ocorrer o desacoplamento da fosforilação oxidativa, quando bastante calor é liberado, com pouca produção de ATP (Guyton & Hall, 1996b).

1.6.2 Metabolismo dos hormônios da tireóide

No hepatócito, o metabolismo de T_3 e T_4 ocorre por várias vias. As desidrinases, chamadas de tipos I, II e III, são responsáveis tanto pela ativação

hormonal, convertendo T_4 a T_3 , como pela desiodação da tironina, essencial na reciclagem do iodeto para formação de mais hormônio (Figura 12). Uma segunda via importante no metabolismo da tireóide envolve a conjugação do grupo fenólico hidroxila com sulfato ou ácido glicurônico. Os glicuronídeos são excretados na bile, enquanto a sulfatação acelera a desiodação das diversas iodotironinas pela desiodinase tipo I (Visser, 1996).

Figura 12. Vias do metabolismo periférico da tiroxina (Segundo Refetoff & Nicoloff, 1995).

O fígado tem um papel importante no metabolismo do hormônio da tireóide, uma vez que ele fabrica as proteínas transportadoras de T_3 e T_4 , a TGB, a transtirretina e a albumina. Ele é, também, o maior sítio de metabolismo periférico do hormônio da tireóide e está envolvido na sua conjugação e excreção biliar, na desaminação oxidativa e na desiodação extratireoidiana de T_4 a T_3 e T_3R . Concordantemente, doenças hepáticas estão freqüentemente associadas a disfunções da tireóide, particularmente com o aumento de TGB e T_4 (Huang & Liaw, 1995).

1.6.3 Hipertireoidismo e estresse oxidativo

Uma vez que um dos principais efeitos do hormônio da tireóide é o aumento da respiração mitocondrial (Nishiki e cols., 1978), o estado hipermetabólico induzido pelo hormônio resulta em um aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ pelos sítios propensos ao vazamento de ERO, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Turrens e cols., 1985). No hipertireoidismo experimental observa-se uma elevada velocidade de produção de $O_2^{\bullet-}$, além de uma maior liberação de H_2O_2 , em partículas submitocondriais de fígado (Fernández & Videla, 1993a). Além do componente mitocondrial, observa-se, também, um aumento na velocidade de produção de $O_2^{\bullet-}$ no microsomo de animais hipertiroídeos (Fernández e cols., 1985).

Uma das propostas para a atuação dos hormônios da tireóide é a interação destes com as membranas celulares. Mais de metade da tiroxina intracelular de células hepáticas de ratos está ligada a microsomos. Como o T_3 é ainda mais hidrofóbico que o T_4 , esta pode ser a causa de sua maior potência fisiológica (Hulbert, 1978). A interação destes hormônios com as membranas celulares altera o nível de insaturação dos ácidos graxos constituintes, diminuindo o nível de insaturação dos fosfolípidios e, conseqüentemente, a fluidez da membrana (Guerrero e cols., 1999). Estes efeitos podem ser derivados de um aumento da pressão peroxidativa de ácidos graxos poliinsaturados (Fernández e cols., 1985). De fato, vários autores observaram um aumento na taxa de peroxidação lipídica, medida pelo aumento da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) no plasma (Seven e cols., 1996) no fígado (Fernández e cols., 1985) e no músculo

cardíaco (Venditti e cols., 1997) de animais hipertiroídeos. No fígado, o aumento da peroxidação lipídica é acompanhado por aumento substancial na oxidação de proteínas hepáticas (Tapia e cols., 1999).

Em humanos, o tratamento de pacientes hipertiroídeos com propiltiouracil, que promove a normalização dos elevados valores séricos de T_3 e T_4 , também tem efeito inibidor na concentração de SRAT, anteriormente elevada no plasma e na urina destes pacientes (Videla e cols., 1988; Seven e cols., 1999). Entretanto, o efeito protetor do propiltiouracil deve ser visto com cautela, uma vez que ele confere proteção ao dano hepático induzido pelo acetaminofeno, mesmo em animais mantidos no estado hipertiroídeo, pela administração de T_3 , revelando um mecanismo protetor multifatorial (Raheja e cols., 1982).

Também se observa, a nível experimental, uma progressiva permeabilização da membrana plasmática dos hepatócitos (Fernández e cols., 1991) enquanto que em pacientes hipertiroídeos são detectadas mudanças histológicas não específicas (Koff, 1980) junto a elevados níveis séricos de gama-glutamil transferase (Azizi, 1982), bilirrubina e retenção de bromosulfaleína (Sir e cols., 1987), com uma incidência de 10-50%.

Ao mesmo tempo em que indicadores pró-oxidantes se encontram elevados no hipertireoidismo, caem as defesas antioxidantes. As atividades da SOD e da CAT (Asayama e cols., 1987; Fernández e cols., 1988), assim como o conteúdo de GSHT (Fernández e cols., 1988; Carrion e cols., 1993) encontram-se diminuídos no fígado de animais tratados com hormônio da tireóide. Alguns estudos, no entanto, mostram o efeito contrário em outros

tecidos, como demonstrado por Seven e cols., em eritrócitos (Seven e cols., 1996).

O hipertireoidismo em ratos leva, também, a um aumento da atividade do “burst” oxidativo em leucócitos polimorfonucleares (PMN) correlacionado ao aumento da geração de $O_2^{\bullet-}$ pela NADPH oxidase (Fernández & Videla, 1996a). PMN possuem sítios de ligação para T_3 assim como hepatócitos, exibindo, também, resposta calorigênica ao hormônio (Woeber, 1977).

1.6.4 Interação da atividade do T_3 e outros xenobióticos

A biotransformação de certos xenobióticos, sob a ação do excesso de hormônios da tireóide, pode sofrer alterações de modo a se tornar danosa ao organismo, com a potenciação do efeito do xenobiótico em questão. A potenciação resultante da interação de duas substâncias ocorre quando uma delas não apresenta efeitos tóxicos isoladamente, mas que, quando adicionada a uma segunda substância, faz com que o efeito desta última seja muito maior do quando administrada isoladamente (Gallo, 1996).

O hipertireoidismo experimental potencia a hepatotoxicidade do 1,1-dicloroetileno em ratos. Apesar do hipertireoidismo diminuir o conteúdo microsomal de citocromo P450, a capacidade de biotransformação do 1,1-dicloroetileno pelo citocromo P450 não é alterada, sugerindo que a potenciação da hepatotoxicidade do 1,1-dicloroetileno pelo hipertireoidismo se deva à diminuição dos componentes da fase II (ex. GSH) e ao aumento na geração de espécies reativas e/ou conjugados que se liguem covalentemente a moléculas importantes na célula (Gunasena & Kanz, 1997).

O hipertireoidismo experimental também aumenta a toxicidade hepática do clorofórmio (CHCl_3) (McIver, 1940) e do tetracloreto de carbono (CCl_4) (Calvert & Brody, 1962). Necrose hepática centrolobular, induzida pelos anestésicos isoflurano (Berman e cols., 1983) enflurano (Berman e cols., 1983) e halotano (Wood e cols., 1980) é observada em animais pré-tratados com T_3 , não sendo observada nos tratamentos isolados. Assim como para o aumento da toxicidade do 1,1-dicloroetileno, a suscetibilidade do animal hipertiroídeo ao halotano depende, pelo menos parcialmente, do sistema de desintoxicação dependente de GSHT (Smith e cols., 1983).

1.7 Lindano

1.7.1 Estrutura, atividade biológica e distribuição tecidual

O lindano (γ -hexaclorociclohexano) é um inseticida clorado, extensamente utilizado em saúde pública nos países em desenvolvimento. No Brasil, o lindano é um importante inseticida que foi utilizado ao longo dos anos no combate ao vetor da Doença de Chagas (*Triatoma sp*) sendo também aplicado, terapeuticamente, no tratamento contra sarna e piolho e na proteção de madeiras (Arisi, 1993).

O hexaclorociclohexano grau técnico (HCH) utilizado em preparações inseticidas contém uma mistura de isômeros, onde os isômeros γ e α são estimulantes do sistema nervoso central, promovendo convulsões, enquanto os β e δ são depressores. Apenas o isômero γ (lindano) apresenta uso medicinal,

em shampoos, como escabicida (Ecobichon, 1996). A ação inseticida do lindano se deve primordialmente à sua ação neurotóxica. O lindano se liga ao sítio picrotoxina do receptor do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) resultando em uma inibição do fluxo de cloreto, dependente de GABA, para dentro do neurônio. Além disso, o tratamento com lindano aumenta a captação de 2-desoxiglicose em várias regiões do cérebro, em padrão consistente com o mecanismo proposto de ligação com o receptor GABA, refletindo em uma elevação no metabolismo celular, compatível com a ação excitatória do lindano (Saunders & Harper, 1994).

O lindano apresenta natureza altamente lipofílica, o que permite seu acúmulo em membranas celulares, com conseqüente perturbação da permeabilidade da membrana (Antunes-Madeira & Madeira, 1979; Agrawal e cols., 1989). Relatos sobre a capacidade deste inseticida em alterar a fluidez de membranas são variáveis. Bhalla e Agrawal (Bhalla & Agrawal, 1998) observaram, em ratos, que a administração crônica de hexaclorociclohexano aumentou a fluidez da membrana eritrocitária, enquanto Antunes-Madeira e Madeira mostraram não haver alterações (Antunes-Madeira & Madeira, 1989). Modificações, tanto na permeabilidade como na fluidez da membrana, provocadas pelo lindano, parecem estar relacionadas com uma diminuição no conteúdo de colesterol, devido à entrada do lindano na membrana. Esta inserção da molécula de lindano nos domínios lipídicos resulta em inibição não específica de proteínas ligadas à membrana como a colinesterase, a 5'-nucleotidase e a ATPase de células musculares (Jones e cols., 1985; Demael e cols., 1987), a fosfatidilcolina sintase pancreática (Parries & Hokin-Neaverson, 1985), a ATPase de cérebro e eritrócito (Parries & Hokin-Neaverson, 1985;

Bhalla & Agrawal, 1998), assim como a succinato desidrogenase, Mg-ATPase, glicose-6-fosfato desidrogenase, fosfatase alcalina e NADH desidrogenase hepáticas (Tiwari e cols., 1982).

O efeito desorganizador de membrana plasmática do lindano pode também afetar a resposta imune celular. Já havia sido demonstrado que a administração de lindano resulta em supressão da resposta imune humoral induzida por *Salmonella typhi* em coelhos (Dési e cols., 1978) quando experimentos com linfócitos humanos, ativados ou não com fitohemaglutinina e incubados com lindano, mostraram a inibição da biosíntese de macromoléculas pelo inseticida, atrasando a proliferação celular (Roux e cols., 1979).

A absorção do lindano é extremamente rápida, após sua administração intraperitoneal. Em cérebro, fígado e rim, o inseticida já é detectado 2h após a administração, aumentando após 24h, com exceção do fígado, onde a concentração, após 24h, é menor do que após 2h. No sangue, a concentração de lindano após 1h de exposição já é próxima do máximo obtido após 4h de exposição. Após 7 dias da administração de lindano, ainda é possível detectá-lo em rim, tecido adiposo, fígado, sangue e plasma, em ordem decrescente de concentração (Arisi, 1993).

1.7.2 Lindano e estresse oxidativo

O desenvolvimento de uma condição de estresse oxidativo no fígado após intoxicação com lindano tem sido considerado como um possível mecanismo hepatotóxico do inseticida (Videla e cols., 1990).

O lindano é biotransformado no fígado pelo sistema do citocromo P450 microsomal em uma variedade de metabólitos, incluindo policlorociclohexenos que são suscetíveis a conjugação com GSH para eliminação (Figura 13) (Videla e cols., 1990). O aumento nos indicadores da peroxidação de lipídios (Junqueira e cols., 1988; Videla e cols., 2000) juntamente com uma depleção no conteúdo de GSH tecidual e biliar (Barros e cols., 1988; Videla e cols., 2000) já são observados 4 horas após a intoxicação aguda, indicando que o componente precoce do estresse oxidativo hepático induzido por lindano depende de sua biotransformação acoplada à utilização de GSH em reações de conjugação, e não de alterações provocadas no sistema microsomal do citocromo P450 (Videla e cols., 1990). Estudos *in vitro* mostraram que os metabólitos iniciais do lindano, produzidos pelo sistema do citocromo P450, são provenientes da atividade da via redutiva do citocromo, sendo subseqüentemente hidroxilados pelo mesmo sistema ou conjugados com GSH (Tanaka e cols., 1979; Yamamoto e cols., 1983). Uma fonte de estresse oxidativo, nesta fase, pode ser dada pela participação do radical pentaclorociclohexano, formado pela atividade redutiva do citocromo P450, resultando em aumento do potencial peroxidativo (Baker e cols., 1985).

Figura 13: Principais vias de biotransformação do lindano em mamíferos (Segundo Videla e cols., 1990).

Com o decorrer do tempo da intoxicação, o lindano altera alguns mecanismos antioxidantes do hepatócito, incluindo o decréscimo das atividades da superóxido dismutase e catalase, evidente já às 6 horas da intoxicação, alcançando o máximo em 24 horas (Junqueira e cols., 1988). A indução do citocromo P450 hepático é observada após 24 horas do tratamento, juntamente com um aumento na velocidade de produção de $O_2^{\bullet-}$, considerado o principal responsável pela condição de estresse oxidativo hepático na fase tardia (Junqueira e cols., 1988). Nesta fase, os níveis hepáticos de GSHT

retornam ao normal, devido ao aumento da síntese do tripeptídeo (Junqueira e cols., 1993a).

As mudanças nesses parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo hepático são, portanto, dose (Junqueira e cols., 1986) e tempo dependentes, coincidindo com o aparecimento e progressão de lesões morfológicas na área periportal (Junqueira e cols., 1988). Tanto as alterações morfológicas, como o estresse oxidativo, induzidos no fígado pela intoxicação aguda com lindano são reversíveis, dependendo tanto do conteúdo hepático do inseticida quanto da geração de $O_2^{\bullet-}$ (Junqueira e cols., 1997).

No cérebro, segundo estudo realizado em nosso laboratório, a administração de lindano a ratos não altera o estado de estresse oxidativo da mesma maneira que no fígado, a não ser pela redução do conteúdo de glutathiona total (Arisi e cols., 1994). Por outro lado, a avaliação do sistema de defesa antioxidante no cérebro de ratos após intoxicação aguda de ratos, com HCH, uma mistura de vários isômeros do hexaclorociclohexano, resulta em decréscimo das atividades da SOD, catalase e glutathiona peroxidase, juntamente com um aumento nos índices de lipoperoxidação nuclear, mitocondrial e microssomal e depleção de glutathiona e ácido ascórbico cerebrais (Sahoo & Chainy, 1998).

1.8 Ação conjunta de lindano e T_3

O primeiro estudo sobre o efeito do hipertireoidismo na ação hepatotóxica do lindano foi feito pelo grupo do prof. Luis A. Videla, em colaboração com nosso laboratório. Neste estudo, observa-se que ratos

previamente tratados com T_3 e, subseqüentemente, intoxicados com lindano apresentam maiores níveis séricos de T_3 e menores níveis de lindano hepático em relação aos tratamentos em separado, indicando uma acelerada biotransformação do inseticida nestas condições, mecanismo que pode envolver a geração de metabólitos reativos (Videla e cols., 1995). Este efeito pode ser responsável pelo aumento da susceptibilidade observada nos animais hipertiroídeos ao lindano, uma vez que a potenciação da hepatotoxicidade do lindano foi indicada pelo grande aumento no efluxo de lactato desidrogenase (LDH) e glutathiona total (GSHT) em experimentos de perfusão hepática, e na elevada atividade das transaminases séricas (AST e ALT) nos animais hipertiroídeos tratados com lindano (Videla e cols., 1995). A razão entre a produção de SRAT, um indicador de lipoperoxidação, e o conteúdo de glutathiona total hepático (SRAT/GSHT) mostra um grau de estresse oxidativo nos animais de tratamento conjunto muito maior do que a soma dos efeitos produzidos por cada tratamento em separado (Videla e cols., 1995). Estudos histológicos nestes animais mostram hiperplasia das CK nos animais exclusivamente hipertiroídeos e infiltração de células polimorfonucleares (PMN) e necrose, além da hiperplasia das CK, nos animais do tratamento conjunto (Videla e cols., 1995).

1.8.1 CK nos tratamentos com T_3 e lindano

O estresse oxidativo gerado durante o hipertireoidismo experimental parece estar relacionado, principalmente, com a produção de espécies reativas de oxigênio a nível microssomal (Fernández e cols., 1985), mitocondrial e

peroxisomal (Fernández & Videla, 1993a). Por outro lado, um aumento na atividade fagocítica das CK residentes no fígado também pode contribuir para o aumento do desbalanço oxidativo. A hiperplasia das CK, observada no hipertireoidismo experimental, correlaciona com um aumento da quimioluminescência, induzida por zimosan opsonizado e amplificada por luminol, em homogeneizados de fígado de ratos hipertiroídeos (Videla e cols., 1995). O tratamento de ratos com T_3 também aumenta a velocidade de captação de carbono coloidal pelas CK em experimentos de perfusão, observando-se, também, aumento no consumo de O_2 a esta relacionada. Estes efeitos, assim como a depleção de GSH e aumento da produção de SRAT induzidos pelo T_3 , diminuem quando os animais são pré-tratados com um inativador seletivo das CK, o cloreto de gadolínio ($GdCl_3$) (Tapia e cols., 1997).

A administração de doses baixas de lindano (5-20 mg/kg) em ratos aumenta a fagocitose de partículas de carbono coloidal pelas CK, com incremento no consumo de O_2 . Na dose de 20 mg/kg, o tratamento com lindano é também responsável por um aumento no efluxo de LDH em experimentos de perfusão hepática, associado à captação de carbono coloidal; este aumento entretanto diminui significativamente na presença de $GdCl_3$ (Videla e cols., 1997).

Os primeiros resultados obtidos sobre a interação do hipertireoidismo com a intoxicação com lindano nos impulsionaram a um estudo mais aprofundado do estado de estresse oxidativo hepático produzido nestes animais, a fim de melhor caracterizar quais os componentes do equilíbrio entre pró- e antioxidantes hepáticos estariam envolvidos no aumento da suscetibilidade de ratos hipertiroídeos ao lindano. Em um segundo estágio,

baseados nos resultados sobre a atividade das CK nos tratamentos isolados, tentar compreender o papel destes macrófagos, se algum, na potenciação da hepatotoxicidade do lindano no hipertireodisimo.

2 Objetivos

- A. Estudar o estresse oxidativo hepático produzido pela administração aguda do xenobiótico lindano em uma condição pré-existente de hipertireoidismo experimental.
- B. Esclarecer a participação das células de Kupffer no estresse oxidativo hepático gerado pelo tratamento conjunto de lindano e T₃.

3 Materiais e Métodos

3.1 Modelo experimental

Foram utilizados ratos machos, da linhagem Sprague-Dawley, com três meses de idade e valores de peso corpóreo comparáveis (em torno de 250 g) previamente alimentados *ad libitum* com ração comercial e mantidos em biotério com ciclo claro-escuro de 12 horas. Para a indução de hipertireoidismo, os ratos foram injetados intraperitonealmente com 0,1 mg de T_3 /kg de peso corpóreo ou com volume equivalente do veículo do hormônio, NaOH 0,1 M (grupo controle) por 3 dias consecutivos. A condição calorigênica foi determinada pela medição da temperatura retal dos animais, 24 horas após a última injeção.

Na intoxicação aguda com lindano, os grupos de animais controle e hipertiroídeos foram tratados com lindano (20 mg/kg peso corpóreo i.p.) no último dia do tratamento hormonal, utilizando óleo de milho como veículo. Os experimentos foram realizados 24 horas após os tratamentos, utilizando o modelo experimental delineado na Tabela 2.

Tabela 2: Tratamento dos animais.

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
Controle/Controle	NaOH	NaOH	NaOH/Óleo	Experimento
Controle/Lindano	NaOH	NaOH	NaOH/Lindano	
T₃/Controle	T ₃	T ₃	T ₃ /Óleo	
T₃/Lindano	T ₃	T ₃	T ₃ /Lindano	

- Dosagens:
- T₃ = 0,1 mg / kg peso corpóreo.
 - NaOH 0,1 M = volume equivalente.
 - Lindano = 20 mg / kg peso corpóreo.
 - Óleo = volume equivalente.

Os grupos experimentais serão, daqui por diante, identificados pelas siglas: CC (ratos controle) CL (ratos tratados com lindano) T₃C (ratos hipertiroídeos) e T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

3.2 Parâmetros pró- e antioxidantes hepáticos

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo a cavidade abdominal aberta imediatamente. O sangue foi colhido por punção da aorta abdominal com seringas heparinizadas e o plasma, obtido após centrifugação a 1.140 *g* por 10 min, foi separado para a determinação de vitamina C. Uma pequena amostra do fígado foi retirada, e imediatamente armazenada a - 80°C, para a posterior determinação dos níveis hepáticos dos antioxidantes lipossolúveis α -tocoferol, β -caroteno e licopeno, assim como de

glutathiona total. O restante do órgão foi perfundido *in situ* com solução salina 0,9% gelada, sendo em seguida removido do animal.

O fígado perfundido foi pesado, colocado em recipientes contendo solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0, picado e lavado duas vezes. O sobrenadante da lavagem foi desprezado e os fragmentos foram homogeneizados com solução KCl 140 mM e fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 (1:4 p/v). Parte do homogeneizado, constituído do sobrenadante obtido após centrifugação a 900 g por 20 minutos a 4°C, foi reservada para determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT). O restante foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi submetido a centrifugação em ultracentrífuga a 105.000 g durante 60 minutos a 4°C (Lu e cols., 1969), sendo o sobrenadante da ultracentrifugação considerado como a fração citossólica (Boveris e cols., 1972). Parte do precipitado microssomal foi ressuspensionado em tampão citrato 0,1 M contendo KCl 0,1 M, glicerol 30% (v/v) e DTT 1 mM, pH 7,0 (meio II) para as determinações do conteúdo hepático dos citocromos P450 e b₅ (Lu e cols., 1969). O restante do precipitado microssomal foi ressuspensionado em tampão fosfato 10 mM, KCl 140 mM, pH 7,0 para as medidas de produção de O₂^{•-} e atividade das enzimas microssomais NADH e NADPH citocromo c redutase (Lu e cols., 1969). Na fração citossólica foram avaliadas as atividades das enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase.

3.2.1 Parâmetros pró-oxidantes

3.2.1.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT)

3.2.1.1.1 Método fluorimétrico

A medida de SRAT foi realizada pelo método fluorimétrico (Tanizawa e cols., 1981).

À amostra do homogeneizado hepático (100 μ L) foram adicionados 500 μ L de SDS 3%. Após 30 segundos de agitação em vórtex, a amostra foi incubada em 1,5 mL de tampão de ácido acético 2 M pH 3,6 e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%, mais 4,0 mL de água destilada, em banho-maria por 60 minutos. A cada amostra foram adicionados 1,0 mL de HCl 0,2 N e 5,0 mL de n-butanol:piridina (15:1) seguida de agitação vigorosa em vórtex. Após a formação de fases, centrifugou-se a fase superficial a 1.140 g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e lido em fluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$: 515 nm, $\lambda_{\text{emissão}}$: 553 nm) e o resultado foi calculado comparativamente a uma curva-padrão de MDA.

3.2.1.1.2 Potencial peroxidativo

O potencial peroxidativo, dado pela medida colorimétrica de SRAT produzidas ao fim de um determinado período de incubação (neste caso, 2 horas) foi utilizado para avaliar a potenciação do estresse oxidativo hepático,

previamente observada no tratamento conjunto com T_3 e lindano, após eliminação das CK com $GdCl_3$.

Uma alíquota de 3 mL de homogeneizado hepático foi incubada em 7 mL de tampão fosfato potássio 0,1 M, pH 7,0, a 37°C, sob agitação constante. Amostras do tempo zero e após duas horas foram retiradas e precipitadas com TCA 5%. Após centrifugação a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi submetido à reação com ácido tiobarbitúrico 0,67%, em banho-maria, por 20 minutos. Após resfriamento em gelo por 20 minutos, foi registrada a absorbância em 535 nm (Bernheim e cols., 1948). A concentração de SRAT foi calculada considerando o coeficiente de extinção micromolar $\varepsilon = 0,156 \mu M^{-1}.cm^{-1}$. Os valores do potencial peroxidativo hepático foram expressos em η moles de SRAT produzidos por mg de proteína em 120 minutos.

3.2.2 Enzimas antioxidantes

3.2.2.1 Superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1.15.1.1)

A transformação de xantina em ácido úrico, catalisada pela xantina oxidase, ativa o oxigênio molecular a $O_2^{\bullet-}$. A reação é acoplada à redução do citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$, que pode ser acompanhada pela redução da absorbância em 550 nm, a 25°C. A adição da SOD contida na amostra promove inibição na velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com o citocromo c pelo $O_2^{\bullet-}$, dismutando-o a peróxido de hidrogênio. A atividade total

da SOD é medida na presença de cianeto, em concentração adequada à inibição da atividade da citocromo c oxidase. (McCord & Fridovich, 1969)

O meio de reação continha citocromo c 100 μ M, xantina 500 μ M, EDTA 1 mM, KCN 200 μ M, tampão fosfato de potássio 5 mM pH 7,8. A quantidade de xantina oxidase, diluída no mesmo tampão do ensaio, foi ajustada em cada dia de experimento, de modo a garantir uma variação de absorbância de 0,030/min no meio de reação sem amostra. O sobrenadante hepático, diluído 1:50 no tampão do ensaio, foi então acrescentado em quantidade suficiente para inibir de 20 a 40% a velocidade de redução do citocromo c, promovida pelo sistema xantina/xantina oxidase do meio de reação. Os resultados estão expressos em U/mg proteína, onde 1 U é definida como a quantidade de enzima na amostra requerida para inibir 50% da redução do citocromo c, por minuto, a 25°C, em pH 7,8.

3.2.2.2 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (E.C. 1.1.1.49)

A redução de NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$, decorrente da oxidação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona, catalisada pela G6PD, provoca aumento da absorbância em 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 30°C, indicativo da atividade da enzima (Glock & McLean, 1953).

A amostra foi adicionada a um meio de reação constituído de MgCl_2 0,2 M, NADP^+ 0,2 mM, glicose-6-fosfato 0,6 mM, EDTA 0,5 mM e tampão Tris 0,1 M pH 7,4. Os resultados estão expressos em U/mg de proteína, onde 1 U é a

quantidade de enzima necessária para catalisar a redução de 1 μmol NADP⁺/minuto, a 30°C, em pH 7,4.

3.2.2.3 Glutathione peroxidase (GPx) (E.C. 1.11.1.9)

A GPx interfere no processo de peroxidação de lipídios uma vez que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos orgânicos, ao mesmo tempo em que oxida glutathione reduzida.

O método utilizado (Sies e cols., 1979) mede a velocidade da oxidação de NADPH, catalisada pela glutathione redutase, que é proporcional à produção de GSSG, catalisada pela glutathione peroxidase, em presença de peróxido de ter-butila (t-BOOH).

A amostra foi adicionada ao meio contendo NADPH 20 mM, GSH 0,1 M, glutathione redutase 0,1 U/mL, EDTA 5 mM e tampão Tris 0,1 M pH 7,0. Após um minuto de estabilização a 30°C, t-BOOH 0,5 mM foi adicionado e o decréscimo de absorbância foi acompanhado a 340 nm, 30°C ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os resultados estão expressos em U/mg de proteína, onde 1 U é a quantidade de enzima necessária para catalisar a oxidação de 1 μmol NADPH/minuto, a 30°C, em pH 7,0.

3.2.2.4 Catalase (E.C. 1.11.1.6)

A catalase promove a hidrólise de peróxido de hidrogênio a água e hidrogênio molecular. A técnica empregada quantifica a velocidade da decomposição de H_2O_2 pela enzima, pelo decréscimo de absorbância a 230 nm ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 30°C (Beutler, 1975). O meio de reação continha H_2O_2 10 mM e tampão Tris 1M, EDTA 5mM, pH 8,0 e o resultado foi expresso em U/mg proteína. Uma unidade de catalase corresponde à atividade da enzima que hidrolisa 1 μmol de H_2O_2 por minuto a 30°C, em pH 8,0.

3.2.3 Parâmetros microssomais

3.2.3.1 Citocromo P450 e citocromo b_5

A fração microssomal, obtida após a centrifugação a 105.000 g , ressuspensa em meio II, foi usada para a determinação do conteúdo microssomal dos citocromos P450 e b_5 (Omura & Sato, 1964).

O conteúdo de citocromo P450 foi determinado pelo seu espectro de absorção diferencial com monóxido de carbono, em 450 nm, após tratamento do microssomo com ditionito de sódio, a temperatura ambiente, usando o coeficiente de extinção micromolar $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

O conteúdo de citocromo b_5 foi determinado pelo seu espectro diferencial entre os comprimentos de onda 409 - 424 nm, após o tratamento do

microsomo com ditionito de sódio, a temperatura ambiente, usando o coeficiente de extinção micromolar $\epsilon = 185 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Os resultados estão expressos, em ambos os casos, em η moles de citocromo por mg de proteína microssomal.

3.2.3.2 Produção de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

A velocidade de produção microssomal de $\text{O}_2^{\bullet-}$, dependente de NADPH, foi medida pela variação da absorbância decorrente de oxidação, sensível a superóxido dismutase (SOD) da epinefrina a adrenocromo em 480 nm ($\epsilon = 0,004 \text{ } \gamma\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 30°C (McCord & Fridovich, 1969; Misra & Fridovich, 1972; Boveris e cols., 1983).

O meio de reação contém KCl 120 mM, EDTA 1 mM, fosfato de potássio 30 mM, epinefrina 1 mM, pH 7,2, NADPH 100 γM e quantidades variadas de amostra (microsomo suspenso em KCl 140 mM, fosfato de potássio, 10 mM pH 7,0).

Os valores de produção microssomal de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foram expressos em η moles de adrenocromo/mg de proteína microssomal/minuto.

3.2.4 NADPH-citocromo c redutase (E.C. 1.6.2.4)

A atividade da NADPH-citocromo c redutase foi determinada medindo-se o aumento da absorbância decorrente da redução do citocromo c a 550 nm ($\epsilon = 20,5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 30°C (Williams & Kamin, 1962). O meio de reação contém

NADPH 0,18 mM, citocromo c 0,16 μ M, KCN 0,58 mM, tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,4 e quantidades variáveis da amostra. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína e em U/ η mol de citocromo P450. Uma unidade de enzima é definida como a atividade de enzima que catalisa a redução de 1 μ mol de citocromo c por minuto, a 30°C em pH 7,4.

3.2.5 NADH-citocromo c redutase (E.C. 1.6.2.2)

A atividade da NADH-citocromo c redutase foi determinada medindo-se o aumento da absorbância decorrente da redução do citocromo c a 550 nm ($\epsilon = 20,5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) a 30°C (Strittmatter, 1965). O meio de reação contém NADH 0,125 mM, citocromo c 0,16 μ M, KCN 0,58 mM, tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,4 e quantidades variáveis da amostra. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína e em U/ η mol de citocromo b_5 . Uma unidade de enzima é definida como a atividade de enzima que catalisa a redução de 1 μ mol de citocromo c por minuto, a 30°C em pH 7,4.

3.3 Determinação de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Lowry (Lowry e cols., 1951).

3.4 Antioxidantes

3.4.1 Glutathiona total hepática (GSHT)

Pedaços de 0,1 g de tecido hepático foram homogeneizados 1:50 (p/v) em ácido perclórico 0,5 N e após centrifugação a 3.100 g por 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi neutralizado com K₃PO₄ 1,75 M, até pH 7,0. A amostra neutralizada foi centrifugada a 15.600 g por 2 minutos, sendo uma alíquota de 20 µl adicionada a uma cubeta contendo 980 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M com EDTA 0,001 M, NADPH 240 µM, DTNB 76 µM e 0,12 U/mL de glutathiona redutase, que converte toda glutathiona presente na amostra em glutathiona reduzida (Tietze, 1969).

O ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) reage com a glutathiona reduzida formando o cromóforo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A variação de absorbância foi medida a 412 nm, a 25°C, por 4 minutos. Os resultados foram calculados utilizando 50 µL de glutathiona oxidada 10 µM como padrão e expressos em ηmoles de glutathiona / g de fígado.

3.4.2 Preparo dos padrões

Os compostos puros de α-tocoferol, β-caroteno e licopeno foram dissolvidos em clorofórmio e diluídos em etanol para uma concentração final de aproximadamente 1 µM (Motchinik e cols., 1994). A concentração precisa de

cada solução padrão foi determinada espectrofotometricamente utilizando os seguintes coeficientes de extinção:

Alfa-tocoferol	292 nm	$\epsilon^{1\%} = 75.8 \text{ litros.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	F.W.: 430.6
Beta-caroteno	453 nm	$\epsilon^{1\%} = 2620 \text{ litros.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	F.W.: 536.9
Licopeno	472 nm	$\epsilon^{1\%} = 3450 \text{ litros.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	F.W.: 536.9

Todos os padrões se mantiveram estáveis por vários meses a -80°C .

3.4.3 Alfa-tocoferol, beta-caroteno e licopeno hepáticos

O procedimento utilizado para a extração lipídica no fígado foi uma modificação do descrito por Burton (Burton e cols., 1985).

As amostras de fígado, também previamente armazenadas a -80°C , foram homogeneizadas em SDS 0,1 M, água deionizada e BHT (10 mg / mL) para prevenir autoxidação, na proporção de 1 mL de SDS, 1 mL de água e 50 μL de BHT para cada 100 mg de fígado. 2,1 mL da amostra foi então recolhida em vidro com tampa de rosca forrada de Teflon, onde foram adicionados 2mL de metanol LiChrosolve. Agitou-se em vórtex por 30 segundos. Adicionaram-se 4 mL de hexano LiChrosolve e agitou-se em vórtex por mais 2 minutos. Após 5 minutos de centrifugação a 1000 g, 3 mL da fração de hexano foram transferidos a outro tubo, onde foram secos sob nitrogênio. O extrato foi armazenado a -20°C e posteriormente dissolvido em 100 ou 500 μL de metanol/reagente alcoólico 1/1 (v/v) e filtrado em membrana de poro 0,22 μm .

A análise dos antioxidantes contidos no fígado foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se um detetor eletroquímico com

potencial de oxidação de 0,6 V. As amostras foram injetadas em um *loop* de 20 μ L e a separação ocorreu em coluna C-8 Nova-Pak, com fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min. A fase móvel consistiu de uma solução de 20 mM de perclorato de lítio em metanol/água 98:2 (v/v). Os picos foram analisados contra os padrões de cada vitamina, utilizando os respectivos tempos de retenção em cada experimento (Figura 14). As quantidades de cada antioxidante foram calculadas por comparação entre a área da amostra e a área do respectivo padrão, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em η mol por grama de tecido (η mol/g).

Figura 14: Exemplos de cromatogramas obtidos para a medida dos antioxidantes lipossolúveis. (A) Padrões; (B) Amostra de fígado.

3.4.4 Vitamina C plasmática

O procedimento utilizado para a determinação da concentração plasmática de vitamina C seguiu como o descrito por Wagner e cols. (Wagner e cols., 1979).

As amostras de plasma, previamente armazenadas a -80°C por não mais do que uma semana, foram extraídas com ácido metafosfórico (HPO_3) 10% (300 μL de amostra em 900 μL de HPO_3) agitadas em vórtex por 30 segundos e centrifugadas por 5 minutos a 15.600 g . Após a diluição do sobrenadante na fase móvel (200 μL do sobrenadante em 600 μL de ácido metafosfórico 0,8%) as amostras foram filtradas em membrana de poro 0,22 μm e injetadas em um *loop* de 20 μL para as determinações cromatográficas, que foram realizadas em detetor UV (λ :235 nm). A separação das amostras ocorreu em coluna C-18 Nova-Pak, com fluxo de fase móvel de 0,7 mL/min. A fase móvel consistiu de uma solução de ácido metafosfórico 0,8%, preparada em água MilliQ. Os picos foram analisados contra o padrão da vitamina injetado no mesmo dia, utilizando o mesmo tempo de retenção. A concentração de vitamina C na amostra foi calculada por comparação entre a área da amostra e a área do padrão, de concentração conhecida. Os resultados foram expressos em μM .

3.5 Atividade das células de Kupffer (CK)

A atividade das CK isoladas foi avaliada medindo-se atividade fungicida das células isoladas sobre *Candida albicans* e pela luminescência produzida após estímulo com zimosan opsonizado e amplificada por luminol.

3.5.1 Separação das células de Kupffer

A separação das células de Kupffer utilizada neste estudo foi modificada a partir do método de Doolittle & Richter (Doolittle & Richter, 1981).

Animais dos quatro grupos experimentais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg / Kg de peso corpóreo). Após abertura da cavidade abdominal, o sangue foi removido do fígado por perfusão com solução tampão contendo 11,8 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 25 mM NaHCO₃; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 0,62 mM EDTA e 6,7 mg/mL de albumina, pH 7,6 a 37°C, previamente borbulhada com carbogênio (ar + 5% CO₂). Em seguida, o fígado foi perfundido com tampão contendo collagenase (11,8 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 25 mM NaHCO₃; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES; 2 mM CaCl₂ e 320 U/mL de collagenase, pH 7,6 a 37°C) também previamente borbulhado com carbogênio, de maneira que as células puderam ser desprendidas manualmente após a retirada do fígado. As CK foram então separadas dos hepatócitos e células mortas por centrifugação diferencial: o sobrenadante obtido após duas centrifugações de 30 g por 30 segundos foi novamente centrifugado a 412 g por 2 minutos; o *pellet* desta última centrifugação foi lavado em tampão de incubação contendo 11,8 mM NaCl; 4,8

mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 25 mM HEPES e 2,3 mM CaCl₂, pH 7,6 e novamente centrifugado a 30 g por 30 segundos, para última separação de hepatócitos e núcleos nus. O sobrenadante desta última centrifugação constitui uma suspensão de células sinusoidais rica em CK. A viabilidade das CK foi determinada por exclusão de azul de Tripán 0,6%, mantendo-se acima de 95%.

3.5.2 Atividade fungicida (“Killing”)

Uma suspensão de leveduras (*Candida albicans*) em tampão PBS (10⁷ leveduras por ensaio) foi obtida a partir de cultura em ágar Sabouroud e opsonizada com um “pool” de soro homólogo. Uma suspensão de células sinusoidais contendo 10⁶ CK foi colocada neste meio e incubada a 37°C por 10 minutos, sob agitação. Uma alíquota foi utilizada para preparar lâminas de esfregaço, coradas com solução de Rosenfeld 50% por 20 minutos. Em microscópio óptico, 400 células foram contadas, avaliando o número de leveduras, vivas e mortas, fagocitadas por macrófago. Os resultados deste ensaio são expressos em porcentagem de macrófagos que fagocitaram leveduras (índice de fagocitose) e pelo “score” (índice de “killing”) (Chan e cols., 1998). O “score” assim obtido reflete a eficiência de morte das leveduras pelas CK e refere-se à seguinte tabela:

- x 0 = nenhuma levedura fagocitada morta
- x 1 = 1 a 2 leveduras fagocitadas mortas
- x 2 = 3 a 4 leveduras fagocitadas mortas
- x 3 = mais de 4 leveduras fagocitadas mortas, por macrófago

3.5.3 Luminescência das CK isoladas

O *burst* oxidativo produzido por fagócitos ativados está diretamente relacionado à sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, no intuito de matar os microrganismos fagocitados, além de submeter o meio externo a intenso estresse oxidativo, como demonstrado em vários ensaios sob condições distintas (Allen, 1986).

A técnica de quimioluminescência amplificada por luminol determina o principal produto da oxidação do luminol, o aminoftalato (Figura 15) (Allen, 1986; Haltensen e cols., 1986). Utilizando um número constante de células (10^6) acrescentou-se luminol 10^{-4} M e zimosan opsonizado com soro de rato (Allen e cols., 1985). A linha base de cada amostra foi obtida sem a adição de zimosan. A emissão de luz das amostras foi registrada pelo fototubo de um luminômetro, a 37°C , produzindo curvas de luminescência como as representadas na Figura 16. Os resultados foram expressos como velocidade máxima d emissão de luz (mV/min) e emissão de luz até o pico e total (mV) ambas dadas pela integral da área obtida sob a curva de luminescência até o pico ou até 50 minutos no caso da emissão total.

Figura 15. Representação esquemática da oxidação do luminol, que resulta na produção de fótons.

Figura 16: Exemplo das curvas de luminescência obtidas em um dia de experimento. As letras ZY indicam as curvas obtidas para cada grupo experimental (C/C - ratos controle; C/L - ratos tratados com lindano; T3/C - ratos hipertiroídeos; T3/L - ratos hipertiroídeos tratados com lindano) após a adição de zimosan opsonizado. As curvas indicadas apenas pelos grupos experimentais são as linhas de base de cada amostra.

3.5.4 Tratamento com GdCl_3

Com o intuito de estudar o possível efeito das CK no estresse oxidativo hepático observado nos quatro grupos experimentais principais (CC, CL, T_3C e T_3L) alguns dos animais destes grupos receberam, adicionalmente, duas doses i.v. de 10 mg/kg de peso corpóreo cada uma, de cloreto de gadolínio (GdCl_3) ou volume equivalente de solução salina 0,9%, sendo a primeira dose no dia 1 e a segunda no dia 3, de acordo com o esquema da Tabela 2. Sendo o GdCl_3 um inativador seletivo das células de Kupffer, este tratamento foi utilizado com o intuito de se observar o desenvolvimento do estresse oxidativo hepático na ausência das CK, avaliando, por exclusão, a função destas células na potenciação de efeitos observada no tratamento conjunto com T_3 /lindano. Os parâmetros estudados nestes grupos de animais, denominados CC Gd, CL Gd, T_3C Gd e T_3L Gd, foram: potencial lipoperoxidativo, atividades das enzimas SOD e catalase, conteúdo hepático de GSHT e dos antioxidantes lipossolúveis α -tocoferol, β -caroteno e licopeno, conteúdo do citocromo P450, atividade da NADPH citocromo c redutase e velocidade de produção de $\text{O}_2^{\bullet -}$ microsossomal.

3.6 Análise morfológica do fígado

Fragmentos de fígado dos oito grupos experimentais (os quatro principais mais os animais de cada grupo, tratados com GdCl_3) foram fixados por 12 horas em formaldeído tamponado 10%, desidratados em soluções de etanol com concentrações crescentes (70, 80, 90% e absoluto), diafanizados em xilol e posteriormente impregnados e embebidos em parafina. Os cortes

histológicos foram obtidos em micrótomo marca Leica modelo RM2145 com espessura de 5 μm e corados com hematoxilina-eosina para análise histológica em microscopia de luz.

3.7 Análise estatística

Os resultados numéricos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e as diferenças significativas foram analisadas com One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey (Zar, 1996).

Os dados obtidos para a luminescência das CK e nos experimentos com GdCl_3 foram analisados com uso do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney para os grupos onde diferenças significativas foram detectadas (Zar, 1996). Estes resultados estão expressos como a mediana dos dados obtidos, tendo valores mínimos e máximos indicados em cada tabela.

4 Resultados

4.1 Peso corpóreo e temperatura retal

Os pesos corpóreos dos animais dos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, com as respectivas temperaturas retais, se encontram na Tabela 3. O aumento da temperatura retal dos grupos hipertiroídeos T₃C e T₃L, sobre a dos grupos que não receberam T₃, evidencia a condição calorigênica gerada pelo tratamento hormonal.

Tabela 3: Peso corpóreo e temperatura retal dos animais.

	CC ^a	CL ^b	T ₃ C ^c	T ₃ L ^d
Peso corpóreo (g)	259 ± 5 (n=11)	258 ± 5 (n=12)	258 ± 4 (n=10)	256 ± 4 (n=10)
Temperatura retal (°C)	36,7 ± 0,2 (n=5)	37,1 ± 0,1 ^{c,d} (n=7)	37,7 ± 0,1 ^{a,b} (n=5)	38,1 ± 0,2 ^{a,b} (n=5)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como média ± erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.2 Parâmetros pró- e antioxidantes hepáticos

O índice de peroxidação lipídica, obtido pela medida da quantidade de SRAT na amostra, realizada utilizando o método fluorimétrico, aumentou nos dois grupos tratados com T₃ em relação ao controle. Este parâmetro, contudo, não foi afetado pela administração de 20 mg/kg de lindano, isoladamente, ou em conjunto com T₃ (Tabela 4).

Por outro lado, a proteção antioxidante conferida pela atividade das enzimas SOD e CAT encontrou-se diminuída pelo tratamento com T₃, não sofrendo alterações pelo tratamento com lindano. A atividade da enzima GPx não foi afetada por nenhum dos tratamentos, não havendo diferenças de sua atividade todos os grupos estudados. A atividade da G6PD encontrou-se aumentada nos animais tratados com T₃, independentemente do tratamento com lindano (Tabela 4).

Tabela 4: Conteúdo de SRAT, determinado por método fluorimétrico, e atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT) glutatona peroxidase (GPx) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na fração citossólica hepática.

	CC^a	CL^b	T₃C^c	T₃L^d
SRAT (η mol/mg prot.)	1,52 $\pm$ 0,09 (n=4)	1,90 $\pm$ 0,06 ^d (n=3)	2,34 $\pm$ 0,10 ^a (n=5)	2,72 $\pm$ 0,19 ^{a,b} (n=5)
SOD (U/mg prot.)	212 $\pm$ 17 (n=6)	187 $\pm$ 21 (n=6)	161 $\pm$ 17 ^a (n=5)	160 $\pm$ 25 ^a (n=4)
CAT (U/mg prot.)	389 $\pm$ 21 (n=8)	394 $\pm$ 21 ^{c,d} (n=7)	201 $\pm$ 22 ^{a,b} (n=6)	155 $\pm$ 20 ^{a,b} (n=5)
GPx (U/mg prot.)	1,08 $\pm$ 0,18 (n=6)	0,99 $\pm$ 0,11 (n=4)	0,90 $\pm$ 0,05 (n=4)	0,85 $\pm$ 0,03 (n=4)
G6PD (U/mg prot.)	20,6 $\pm$ 3,0 (n=5)	25,8 $\pm$ 2,7 ^{c,d} (n=5)	36,5 $\pm$ 5,4 ^{a,b} (n=5)	37,0 $\pm$ 3,6 ^{a,b} (n=6)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.3 Parâmetros microsossomais

A administração isolada de lindano, na dose de 20 mg/kg, não alterou a velocidade de produção microsossomal de $O_2^{\bullet-}$; contudo, essa produção foi maior em resposta ao tratamento com T_3 , independentemente do tratamento com lindano (Tabela 5). O hipertireoidismo também foi acompanhando da diminuição do conteúdo dos citocromos b_5 e P450 (Tabelas 5 e 6) que não foram alterados pelo tratamento com lindano, isolado ou em conjunto.

Apesar do tratamento com T_3 ter diminuído o conteúdo do citocromo b_5 , a atividade específica (por mg de proteína) e a molecular (por η mol de citocromo b_5) da NADH-citocromo c redutase não sofreram modificações pelos tratamentos em questão, exceção feita apenas pela diminuição da atividade específica da enzima no grupo T_3L (Tabela 6). Por outro lado, ao contrário do efeito observado sobre o conteúdo de citocromo P450, a atividade específica da NADPH-citocromo c redutase mostrou-se aumentada nos dois grupos de animais hipertiroídeos (Tabela 5). Além disso, a atividade molecular desta enzima revelou um aumento no grupo T_3L em relação ao grupo T_3C (Tabela 5). O tratamento isolado com lindano não modificou a atividade de nenhuma destas enzimas.

Tabela 5: Parâmetros microssomais de estresse oxidativo e biotransformação: velocidade de produção de $O_2^{\bullet-}$, conteúdo do citocromo P450 e atividades específica e molecular da enzima NADPH citocromo c redutase.

	CC^a	CL^b	T₃C^c	T₃L^d
$O_2^{\bullet-}$ (η mol/mg prot./min)	18,7 $\pm$ 2,4 (n=6)	19,3 $\pm$ 2,9 ^{c,d} (n=6)	29,1 $\pm$ 5,7 ^{a,b} (n=5)	33,4 $\pm$ 5,3 ^{a,b} (n=4)
P450 (η mol/mg prot.)	0,816 $\pm$ 0,062 (n=6)	0,781 $\pm$ 0,040 ^{c,d} (n=9)	0,509 $\pm$ 0,075 ^{a,b} (n=7)	0,462 $\pm$ 0,048 ^{a,b} (n=6)
NADPH cit. c redutase (U/mg prot.)	0,062 $\pm$ 0,003 (n=6)	0,067 $\pm$ 0,004 ^{c,d} (n=9)	0,092 $\pm$ 0,012 ^{a,b} (n=7)	0,102 $\pm$ 0,005 ^{a,b} (n=6)
NADPH cit. c redutase (U/ η mol P450)	0,076 $\pm$ 0,006 (n=6)	0,086 $\pm$ 0,003 ^{c,d} (n=9)	0,180 $\pm$ 0,016 ^{a,b,d} (n=7)	0,221 $\pm$ 0,021 ^{a,b,c} (n=6)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

Tabela 6: Parâmetros microssomais de estresse oxidativo e biotransformação (continuação): conteúdo do citocromo b₅ e atividades específica e molecular da enzima NADH citocromo c redutase.

	CC^a	CL^b	T₃C^c	T₃L^d
Cit. b ₅ (nmol/mg prot.)	0,55 ± 0,05 (n=9)	0,51 ± 0,03 (n=10)	0,39 ± 0,03 ^a (n=9)	0,39 ± 0,04 ^a (n=8)
NADH cit. c redutase (U/mg prot.)	0,60 ± 0,03 (n=9)	0,49 ± 0,03 (n=10)	0,51 ± 0,06 (n=9)	0,42 ± 0,05 ^a (n=8)
NADH cit. c redutase (U/ nmol b ₅)	1,09 ± 0,08 (n=9)	0,97 ± 0,04 (n=10)	1,29 ± 0,05 ^b (n=9)	1,07 ± 0,11 (n=8)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como média ± erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.4 Antioxidantes hepáticos lipossolúveis

O conteúdo de α -tocoferol hepático não foi modificado pelo tratamento com lindano, mas encontrou-se significativamente diminuído nos grupos T₃C e T₃L, sendo que o grupo T₃L apresentou níveis significativamente menores do que o grupo T₃C (Tabela 7). O hipertireoidismo também induziu a redução no conteúdo hepático de β -caroteno e de licopeno, independentemente da administração de lindano. O tratamento isolado com lindano alterou apenas o nível de licopeno hepático, causando uma diminuição de 35% (Tabela 7).

Tabela 7: Antioxidantes lipossolúveis hepáticos.

	CC ^a	CL ^b	T ₃ C ^c	T ₃ L ^d
α -tocoferol (μ mol/g fig.)	98,8 $\pm$ 2,5 (n=9)	93,7 $\pm$ 4,4 (n=9)	69,4 $\pm$ 3,3 ^{a,b,d} (n=5)	33,4 $\pm$ 2,3 ^{a,b,c} (n=5)
β -caroteno (μ mol/g fig.)	1,12 $\pm$ 0,04 (n=7)	1,08 $\pm$ 0,15 (n=6)	0,69 $\pm$ 0,07 ^{a,b} (n=6)	0,60 $\pm$ 0,08 ^{a,b} (n=6)
Licopeno (μ mol/g fig.)	5,53 $\pm$ 0,44 (n=7)	3,61 $\pm$ 0,21 ^a (n=8)	2,05 $\pm$ 0,26 ^{a,b} (n=6)	1,28 $\pm$ 0,21 ^{a,b} (n=5)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.5 Vitamina C plasmática

O ácido ascórbico plasmático encontrou-se aumentado nos animais tratados com lindano, cerca de 2,6 vezes, independente do estado hipertiroídeo dos animais (Tabela 8).

Tabela 8: Ácido ascórbico plasmático.

	CC^a	CL^b	T₃C^c	T₃L^d
Ácido ascórbico (μM)	50,7 ± 5,2 (n=7)	132,1 ± 5,1 ^{a,c} (n=8)	70,3 ± 7,9 (n=7)	130,9 ± 17,5 ^{a,c} (n=7)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.6 Índice de estresse oxidativo

A razão entre a velocidade de produção de $O_2^{\bullet-}$ e atividade da enzima superóxido dismutase ($O_2^{\bullet-}/SOD$) fornece um índice que auxilia na avaliação do estresse oxidativo hepático estabelecido nos diversos grupos experimentais. Enquanto a razão $O_2^{\bullet-}/SOD$ não apresentou nenhuma alteração nos animais tratados exclusivamente com lindano, este índice mostrou-se mais elevado nos animais hipertiroídeos (Tabela 9). Além disso, o tratamento conjunto T3/lindano induziu uma resposta ainda maior que para os outros três grupos experimentais, indicando uma potenciação no estresse oxidativo hepático resultante da interação dos dois tratamentos estudados (Tabela 9).

Tabela 9: Relação velocidade de produção de $O_2^{\bullet-}$ e atividade da superóxido dismutase ($O_2^{\bullet-}/SOD$).

	CC ^a	CL ^b	T ₃ C ^c	T ₃ L ^d
$O_2^{\bullet-}/SOD$	0,088 ± 0,011 (n=6)	0,102 ± 0,010 (n=6)	0,163 ± 0,012 ^{a,b,d} (n=5)	0,209 ± 0,031 ^{a,b,c} (n=4)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano). Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo aqui apresentados encontram-se publicados na revista *Free Radical Research*, em 1998 (Giavarotti e cols., 1998) (Anexo).

4.7 Atividade das CK

4.7.1 Índices de fagocitose e “killing”

A atividade fagocítica e de “killing” das CK dos grupos estudados está representada na Tabela 10. Enquanto os tratamentos isolados de lindano e T₃ reduziram a porcentagem de fagocitose pelas CK, o tratamento em conjunto com T₃ e lindano aumentou, ligeiramente, a atividade fagocítica em relação ao controle. Por outro lado, a eficiência com que as CK mataram as leveduras fagocitadas encontrou-se menor após todos os tratamentos, em relação ao controle.

Tabela 10: Atividade fungicida dos quatro grupos experimentais.

	CC^a	CL^b	T₃C^c	T₃L^d
“Killing”	118,33 ± 0,71 (n=3)	110,37 ± 0,77 ^a (n=3)	108,87 ± 1,39 ^a (n=3)	109,12 ± 0,62 ^a (n=3)
% de fagocitose	52,42 ± 0,46 (n=3)	40,50 ± 0,43 ^{a,c,d} (n=3)	45,58 ± 0,36 ^{a,b,d} (n=3)	56,75 ± 0,25 ^{a,b,c} (n=3)

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como média ± erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.7.2 Luminescência

A Tabela 11 mostra os resultados de luminescência das CK, induzida por zimosan opsonizado e amplificada por luminol. Estes valores foram também normalizados pelo valor controle de cada dia (Tabela 12). A emissão de luz até o pico mostrou-se como o parâmetro mais sensível aos tratamentos, caindo para quase a metade com os tratamentos de T_3 e lindano isoladamente, enquanto o tratamento conjunto trouxe estes valores de volta para o nível controle (Tabela 11). Os valores relativos de emissão de luz até o pico e até 50 minutos deixam mais clara a diferença entre o tratamento isolado com lindano e a administração do pesticida aos animais hipertiroídeos. Enquanto os valores relativos do grupo CL se mostram baixos, os valores relativos do grupo T_3L mostram um aumento para emissão de luz até 50 minutos e até o pico em relação grupo CL de 42% e 100%, respectivamente (Tabela 12). Não se observaram variações nas velocidades máximas de emissão de luz relativas entre todos os grupos.

Tabela 11: Medianas dos valores individuais de emissão total de luz em 50 minutos, emissão de luz até o pico e velocidade máxima da emissão de luz, após estímulo das CK com zimosan.

		CC^a	CL^b	T₃C^c	T₃L^d
Emissão total de luz (mV)	Mediana	58,1	53,0	43,2	76,7
	Mínimo	19,4	35,3	13,0	34,6
	Máximo	120,0	59,7	92,4	100,0
	n	13	11	10	11
Emissão de luz até o pico (mV)	Mediana	16,1	8,7	9,8	17,0
	Mínimo	5,1	1,8	4,9	12,0
	Máximo	27,6	17,8	16,1	23,3
	n	13	11	10	11
Velocidade máxima de emissão de luz (mV/min)	Mediana	0,528	0,426	0,278	0,350
	Mínimo	0,119	0,057	0,172	0,255
	Máximo	1,010	0,906	0,349	0,618
	n	13	11	10	11

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,01$) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

Tabela 12: Medianas dos valores de emissão total de luz em 50 minutos, emissão de luz até o pico e velocidade máxima da emissão de luz, após estímulo das CK com zimosan, normalizados pelo valor controle obtido em cada dia de experimento.

		CL/CC ^a	T₃C/CC ^b	T₃L/CC ^c
Emissão total de luz relativa	Mediana	0,600 ^c	0,990	1,200 ^a
	Mínimo	0,391	0,310	0,600
	Máximo	0,960	2,110	1,620
	n	11	11	9
Emissão de luz até o pico relativa	Mediana	0,645 ^c	0,780	0,920 ^a
	Mínimo	0,269	0,420	0,360
	Máximo	0,904	2,060	2,640
	n	11	11	9
Velocidade máxima de emissão de luz relativa	Mediana	0,660	1,075	1,020
	Mínimo	0,330	0,320	0,160
	Máximo	0,987	2,330	1,620
	n	11	11	9

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,01$) estão indicadas pelas letras (a, b, e/ou c) que constam no título da coluna de cada grupo.

4.7.3 Tratamento com GdCl_3

O tratamento com GdCl_3 foi realizado em animais de peso corpóreo semelhante ao dos grupos anteriores, apresentando o aumento de temperatura que caracteriza o estado calorigênico dos animais hipertiroídeos (Tabela 13).

Tabela 13: Peso corpóreo e temperatura retal dos animais tratados com GdCl_3 .

	CC Gd^a	CL Gd^b	T₃C Gd^c	T₃L Gd^d
Peso corpóreo (g)	258 ± 9 (n=6)	253 ± 18 (n=4)	259 ± 8 (n=5)	248 ± 6 (n=4)
Temperatura retal (°C)	37,6 ± 0,1 (n=5)	37,2 ± 0,3 ^{c,d} (n=4)	38,3 ± 0,3 ^{a,b} (n=4)	38,1 ± 0,1 ^{a,b} (n=4)

Grupos experimentais: CC Gd (ratos controle tratados com GdCl_3); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl_3); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl_3); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl_3).

Resultados expressos como média ± erro padrão da média para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (a, b, c, e/ou d) que constam no título da coluna de cada grupo.

O potencial peroxidativo, diferente do método de medida de SRAT por fluorescência, ser obtido após 2 h de incubação do homogeneizado hepático a 37°C, se mostrou mais elevado nos animais hipertiroídeos em relação aos controles, sendo também alterado pelo tratamento conjunto em relação aos tratamentos isolados (Tabela 14). Os animais tratados com lindano e CGdCl_3 , conjuntamente, mantiveram o potencial peroxidativo elevado em relação aos controles, também tratados com GdCl_3 (Tabela 14). No entanto, as outras diferenças, observadas entre os grupos tratados com T_3 , desapareceram. Também observa-se que todos os valores de potencial peroxidativo dos diversos grupos tratados com GdCl_3 são menores do que os obtidos para os animais com as CK intactas (Tabela 14).

Tabela 14: Potencial peroxidativo dos animais tratados ou não com GdCl₃.

	SRAT (nmol/mg prot./120 min)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=4)	2,85	2,72	2,94
CL ^b (n=4)	3,99 ^{a,d}	3,36	4,21
T₃C ^c (n=5)	3,41 ^{a,d}	3,20	4,31
T₃L ^d (n=4)	4,86 ^{a,b,d}	4,24	5,24
CC Gd ^e (n=6)	2,35 ^a	1,50	2,69
CL Gd ^f (n=4)	3,18 ^{b,e}	3,08	3,34
T₃C Gd ^g (n=5)	2,43 ^c	2,18	2,68
T₃L Gd ^h (n=4)	2,91 ^d	2,34	4,42

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Outra diferença, observada após o tratamento com T₃ e que não se manteve, foi a diminuição na atividade da SOD. Os grupos tratados com GdCl₃, não apresentam diferença na atividade da SOD, sendo esta apenas um pouco maior no grupo CL Gd, em relação ao seu respectivo controle, CL (Tabela 15). Já a atividade da catalase continuou diminuída nos animais hipertiroídeos em relação aos controles, mesmo após o tratamento com GdCl₃. Além disso, todos os grupos experimentais tratados com GdCl₃ apresentaram uma diminuição na atividade da catalase, em relação a seus respectivos grupos sem GdCl₃ (Tabela 16).

Tabela 15: Atividade da superóxido dismutase (SOD) dos animais tratados ou não com GdCl₃.

	SOD (U/mg prot.)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=8)	207	156	281
CL ^b (n=8)	187	136	281
T₃C ^c (n=8)	160 ^a	125	218
T₃L ^d (n=7)	165 ^a	87	197
CC Gd ^e (n=4)	239	140	274
CL Gd ^f (n=4)	237	199	295
T₃C Gd ^g (n=4)	243 ^c	165	307
T₃L Gd ^h (n=4)	223	152	277

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Tabela 16: Atividade da catalase dos animais tratados ou não com GdCl₃.

	Catalase (U/mg prot.)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=10)	362	305	486
CL ^b (n=9)	341 ^{c,d}	291	453
T₃C ^c (n=7)	182 ^{a,b}	112	225
T₃L ^d (n=8)	135 ^{a,b}	53	239
CC Gd ^e (n=4)	226 ^a	180	328
CL Gd ^f (n=4)	256 ^{b,g,h}	194	354
T₃C Gd ^g (n=4)	83 ^{c,e,f}	53	113
T₃L Gd ^h (n=4)	59 ^{d,e,f}	38	88

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

O tratamento com GdCl_3 também eliminou as diferenças anteriormente observadas na velocidade de produção de $\text{O}_2^{\bullet -}$ pela fração microssomal dos grupos experimentais não tratados com GdCl_3 (Tabela 17). Entretanto, os valores deste parâmetro após o tratamento com GdCl_3 não são diferentes dos que os obtidos nos respectivos grupos na ausência deste tratamento (Tabela 17).

O conteúdo do citocromo P450 encontrou-se diminuído nos animais hipertiroídeos, tratados ou não com GdCl_3 , sendo que este tratamento, por si só, não alterou os níveis hepáticos do citocromo P450 (Tabela 18). A atividade molecular da NADPH citocromo c redutase aumentou nos animais hipertiroídeos tratados com GdCl_3 , independentemente do tratamento com lindano (Tabela 20) enquanto que a atividade específica desta enzima encontrou-se aumentada apenas no grupo $\text{T}_3\text{L Gd}$, em relação a ambos os grupos CC Gd e T_3L (Tabela 19).

Tabela 17: Velocidade de produção de $O_2^{\bullet}$ dos animais tratados ou não com $GdCl_3$.

	$O_2^{\bullet}$ (nmol/mg prot./min)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=9)	17,54	11,72	22,60
CL ^b (n=8)	18,12 ^{c,d}	13,74	21,34
T₃C ^c (n=9)	26,9 ^{a,b}	22,42	40,43
T₃L ^d (n=9)	33,18 ^{a,b}	22,25	48,69
CC Gd ^e (n=4)	15,43	10,70	24,55
CL Gd ^f (n=4)	19,45	9,80	30,20
T₃C Gd ^g (n=4)	20,73	16,55	41,50
T₃L Gd ^h (n=4)	23,78	13,85	29,05

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com $GdCl_3$); CL Gd (ratos tratados com lindano e $GdCl_3$); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com $GdCl_3$); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e $GdCl_3$).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com $GdCl_3$ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Tabela 18: Conteúdo de citocromo P450 dos animais tratados ou não com GdCl₃.

	P450 (ηmol/mg prot.)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=7)	0,750	0,607	0,868
CL ^b (n=12)	0,727 ^{c,d}	0,614	0,939
T₃C ^c (n=9)	0,462 ^{a,b}	0,345	0,582
T₃L ^d (n=10)	0,441 ^{a,b}	0,287	0,550
CC Gd ^e (n=4)	0,681	0,619	0,749
CL Gd ^f (n=4)	0,655 ^{g,h}	0,580	0,730
T₃C Gd ^g (n=4)	0,415 ^{e,f}	0,373	0,522
T₃L Gd ^h (n=4)	0,470 ^{e,f}	0,335	0,485

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Tabela 19: Atividade específica da NADPH citocromo c redutase dos animais tratados ou não com GdCl₃.

	NADPH citocromo c redutase (U/mg prot.)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=11)	0,0582	0,0535	0,0819
CL ^b (n=12)	0,0639 ^{c,d}	0,0517	0,0900
T₃C ^c (n=9)	0,0903 ^{a,b}	0,0737	0,1110
T₃L ^d (n=11)	0,1020 ^{a,b}	0,0888	0,1329
CC Gd ^e (n=4)	0,0673	0,0649	0,0716
CL Gd ^f (n=4)	0,0683	0,0625	0,0838
T₃C Gd ^g (n=4)	0,0793	0,0649	0,0973
T₃L Gd ^h (n=4)	0,0785 ^{d,e}	0,0701	0,0933

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Tabela 20: Atividade molecular da NADPH citocromo c redutase dos animais tratados ou não com GdCl₃.

	NADPH citocromo c redutase (U/ηmol P450.)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=7)	0,083	0,079	0,109
CL ^b (n=12)	0,088 ^{c,d}	0,067	0,115
T₃C ^c (n=7)	0,190 ^{a,b,d}	0,149	0,239
T₃L ^d (n=9)	0,227 ^{a,b,c}	0,183	0,310
CC Gd ^e (n=4)	0,102	0,087	0,109
CL Gd ^f (n=4)	0,108 ^{g,h}	0,087	0,134
T₃C Gd ^g (n=4)	0,180 ^{e,f}	0,164	0,217
T₃L Gd ^h (n=4)	0,165 ^{e,f}	0,149	0,279

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Os níveis hepáticos de GSHT continuaram diminuídos nos animais hipertiroídeos, independentemente do tratamento com $GdCl_3$, mas a diferença entre os grupos hipertiroídeos tratados ou não com lindano não se manteve após o tratamento com $GdCl_3$ (Tabela 21).

O tratamento com $GdCl_3$, apesar de não alterar o aumento previamente observado no índice SRAT/GSHT no hipertireoidismo, eliminou a diferença observada entre os grupos hipertiroídeos tratados ou não com lindano (Tabela 22). Por outro lado, o aumento no índice $O_2^{\bullet-}/SOD$, observado em todos os grupos sem $GdCl_3$, foi completamente suprimido por este tratamento (Tabela 23).

Tabela 21: Conteúdo de glutatona total no fígado dos animais tratados ou não com GdCl_3 .

	GSHT ($\mu\text{mol/g}$ fíg.)		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=4)	6,48	5,64	7,12
CL ^b (n=4)	5,96 ^{c,d}	5,64	6,20
T₃C ^c (n=6)	3,15 ^{a,b,d}	2,16	5,03
T₃L ^d (n=4)	2,28 ^{a,b,c}	1,84	2,57
CC Gd ^e (n=6)	5,35	4,74	6,53
CL Gd ^f (n=4)	6,07 ^{g,h}	5,59	7,05
T₃C Gd ^g (n=5)	2,92 ^{e,f}	2,29	3,88
T₃L Gd ^h (n=4)	3,12 ^{d,e,f}	2,59	3,30

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl_3); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl_3); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl_3); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl_3).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com GdCl_3 e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Tabela 22: Relação entre potencial peroxidativo e conteúdo de GSHT (SRAT/GSHT) nos animais tratados com GdCl₃.

	SRAT/GSHT		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=4)	0,431	0,413	0,496
CL ^b (n=4)	0,669 ^{a,c,d}	0,561	0,723
T₃C ^c (n=5)	1,194 ^{a,b,d}	0,696	1,579
T₃L ^d (n=4)	1,901 ^{a,b,c}	1,708	2,789
CC Gd ^e (n=4)	0,457	0,230	0,529
CL Gd ^f (n=4)	0,534 ^{b,g,h}	0,448	0,562
T₃C Gd ^g (n=4)	0,786 ^{e,f}	0,690	0,843
T₃L Gd ^h (n=4)	0,934 ^{d,e,f}	0,708	1,703

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com GdCl₃); CL Gd (ratos tratados com lindano e GdCl₃); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com GdCl₃); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e GdCl₃).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos (p < 0,05) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas (p < 0,05) entre os grupos tratados com GdCl₃ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

Tabela 23: Relação entre velocidade de produção de $O_2^{\bullet}$ atividade da superóxido dismutase ($O_2^{\bullet}$ /SOD) nos animais tratados com $GdCl_3$.

	$O_2^{\bullet}$ /SOD		
	Mediana	Mínimo	Máximo
CC ^a (n=7)	0,086	0,042	0,112
CL ^b (n=5)	0,096	0,071	0,113
T₃C ^c (n=6)	0,154 ^{a,b,d}	0,124	0,199
T₃L ^d (n=7)	0,210 ^{a,b,c}	0,147	0,289
CC Gd ^e (n=4)	0,068	0,058	0,107
CL Gd ^f (n=4)	0,083	0,049	0,102
T₃C Gd ^g (n=4)	0,093	0,069	0,168
T₃L Gd ^h (n=4)	0,108 ^d	0,077	0,124

Grupos experimentais: CC (ratos controle); CL (ratos tratados com lindano); T₃C (ratos hipertiroídeos); T₃L (ratos hipertiroídeos tratados com lindano); CC Gd (ratos controle tratados com $GdCl_3$); CL Gd (ratos tratados com lindano e $GdCl_3$); T₃C Gd (ratos hipertiroídeos tratados com $GdCl_3$); T₃L Gd (ratos hipertiroídeos tratados com lindano e $GdCl_3$).

Resultados expressos como mediana para o número de animais (n). As diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$) estão indicadas pelas letras (e, f, g, e/ou h) indicadas para cada grupo no título de cada coluna.

As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com $GdCl_3$ e seus respectivos controles estão indicadas pelas letras a, b, c, e/ou d, relativas aos grupos CC, CL, T₃C e T₃L, respectivamente.

4.8 Análise morfológica

O parênquima hepático, constituído por grande concentração de hepatócitos dispostos em cordões confluentes à veia centrolobular, apresentou-se, de maneira geral, homogêneo nos grupos controle e tratado exclusivamente com lindano (Figuras 17 e 18). Os hepatócitos são vistos como células de forma poliédrica, com um ou dois núcleos esféricos, de posição central, ricos em eucromatina e com nucléolos evidentes. O citoplasma mostra-se heterogêneo, com áreas basófilas e eosinófilas.

O hipertireoidismo isolado também não alterou o aspecto do parênquima hepático, notando-se apenas um aumento no número de células de Kupffer, especialmente na região centrolobular (Figura 19). As CK foram caracterizadas por apresentarem citoplasma irregular, eosinofilia citoplasmática acentuada, núcleo alongado com intensa basofilia. Já os animais tratados com T_3 e lindano conjuntamente apresentaram, além da proliferação de CK, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e hepatócitos com núcleo picnótico e altamente basófilos, indicando a presença de granulomas e caracterizando um provável início de necrose (Figura 20). Os animais tratados com $GdCl_3$ apresentaram morfologia hepática semelhante aos animais controle (Figuras 21-23), mesmo aqueles tratados com T_3 e lindano, conjuntamente (Figura 24). Foram analisadas pelo menos quatro amostras de fígado de cada um dos oito grupos experimentais.

Figura 17: Parênquima hepático de animal controle (CC). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

Figura 18: Parênquima hepático de animal tratado com lindano (CL). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

Figura 19: Parênquima hepático de animal hipertiroídeo (T_3C), mostrando a presença de várias células de Kupffer (mais coradas, exemplos indicados pelas setas). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

Figura 20: Parênquima hepático de animal hipertiroídeo tratado com lindano (T_3L). Presença de granuloma e hepatócitos necróticos isolados. Hematoxilina-eosina, aumento 200x.

Figura 21: Parênquima hepático de animal controle tratado com GdCl_3 (CC Gd). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

Figura 22: Parênquima hepático de animal tratado com lindano e GdCl_3 (CL Gd). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

Figura 23: Parênquima hepático de animal tratado com T₃ e GdCl₃ (T₃C Gd). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

Figura 24: Parênquima hepático de animal tratado com T₃, lindano e GdCl₃ (T₃L Gd). Hematoxilina-eosina, aumento 80x.

5 Discussão

5.1 Efeito do hipertireoidismo

5.1.1 Efeito calorigênico

A concepção atual para a ação dos hormônios da tireóide é que a maior parte dos seus efeitos seja mediada pela interação do T_3 com seus receptores nucleares, modificando a expressão gênica. Estes receptores são membros de uma família de fatores de transcrição nuclear similares em estrutura e função, de forma que a sequência de DNA a que se ligam é crucial na determinação de que genes serão estimulados ou inibidos (Brent, 1994).

Entretanto, a ação dos hormônios da tireóide parece não estar restrita ao controle da expressão gênica. Em vários tecidos, como o fígado, rim, músculo esquelético e coração, tem sido mostrado que o hormônio da tireóide aumenta, tanto a atividade, como o número de unidades, da Na^+,K^+ -ATPase de membrana plasmática. A Na^+,K^+ -ATPase é responsável pela manutenção do gradiente transcelular dos íons de sódio e potássio. É possível que a indução da Na^+,K^+ -ATPase seja uma resposta ao aumento da permeabilidade das membranas celulares a cátions monovalentes observado no hipertireoidismo, ao invés de uma ação nuclear do hormônio (Haber & Loeb, 1984). O aumento do efluxo de lactato desidrogenase, em experimentos com fígado de rato isolado e perfundido, sugere um desarrajo na membrana plasmática das células hepáticas (Fernández & Videla, 1993b; Videla e cols., 1995). De

qualquer forma, o estímulo da Na^+/K^+ -ATPase aumenta o gasto energético da célula que, aliado à maior movimentação de íons pelas membranas, provoca a liberação de calor.

O efeito calorigênico do T_3 , neste modelo experimental, foi demonstrado pelo aumento da temperatura retal nos animais tratados com o hormônio (Tabela 3). Vários trabalhos utilizando fígado isolado perfundido mostraram que essa geração de calor pela ação do T_3 é acompanhada por um aumento do consumo de O_2 pelo fígado (Fernández e cols., 1985; Carrion e cols., 1993; Fernández & Videla, 1993a; Fernández & Videla, 1993b; Videla e cols., 1995; Fernández & Videla, 1996b; Tapia e cols., 1999). A aceleração da respiração hepática no hipertireoidismo é, primordialmente, determinada pelo aumento da fosforilação oxidativa da cadeia respiratória mitocondrial, necessária para cobrir a maior demanda energética da célula (Edelman, 1974).

5.1.2 Parâmetros de estresse oxidativo

O aumento da respiração celular, pelo incremento da atividade mitocondrial, aumenta a geração de espécies intermediárias de oxigênio, especialmente $\text{O}_2^{\bullet-}$, em dois pontos diferentes, um próximo à NADH desidrogenase e outro na área da ubiquinona-citocromo b (Turrens & Boveris, 1980). De fato, experimentos realizados com partículas submitocondriais de fígado de ratos hipertiroídeos mostram um aumento na geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em relação aos controles (Fernández & Videla, 1993b) que pode ser decorrente de incrementos no conteúdo e atividade de vários componentes da cadeia respiratória mitocondrial (Barker, 1951).

Apesar da indução da atividade da Na^+, K^+ -ATPase ser a principal responsável pela calorigênese na condição de hipertireoidismo, uma fração do aumento do consumo hepático de O_2 em animais tratados com hormônio da tireóide não está ligada ao transporte ativo de cátions (Edelman, 1974). O desenvolvimento da condição de hipertireoidismo é acompanhado de proliferação do retículo endoplasmático e aumento na atividade das enzimas NADPH-citocromo P450 redutase e NADPH oxidase, ambas responsáveis pela geração de $\text{O}_2^{\bullet -}$ microsomal (Kato & Takahashi, 1968; Fernández e cols., 1985). Os dados apresentados na Tabela 5, mostrando um aumento, tanto da atividade específica como molecular, da NADPH-citocromo c redutase, acompanhada por um maior geração de $\text{O}_2^{\bullet -}$ microsomal em ambos os grupos tratados com T_3 , estão de acordo com estes resultados.

Além do aumento da produção hepática de espécies reativas de O_2 a nível microsomal, mitocondrial e peroxisomal, as defesas antioxidantes sofrem uma depleção no estado de hipertireoidismo. Diminuições estatisticamente significativas foram encontradas nas atividades da CuZnSOD e da catalase no fígado de ratos hipertiroídeos (Fernández e cols., 1988), além de um decréscimo na glutathiona total hepática (Fernández e cols., 1988; Videla e cols., 1995). Em fígado de animais tratados com 0,0012% de T_4 na água por quatro semanas, além da diminuição da atividade da CuZnSOD e da catalase, observa-se também uma diminuição da atividade da glutathiona peroxidase (Asayama e cols., 1987). A atividade da MnSOD não se descreve alterada pelo tratamento com T_3 , em nenhum dos trabalhos acima citados. A diminuição das atividades da SOD e catalase (Tabela 4) nos grupos tratados com T_3 , independentemente do tratamento com lindano, está de acordo com estes

dados. Além disso, este trabalho revela que a condição de hipertireoidismo diminui também os níveis dos antioxidantes hepáticos α -tocoferol, β -caroteno e licopeno (Tabela 7) que conferem proteção ao ataque oxidativo, principalmente nos domínios lipídicos da célula.

O desarranjo da membrana plasmática, anteriormente mencionado na seção 5.1.1, pode resultar da condição pró-oxidante estabelecida no fígado após o tratamento com T_3 . A condição de hipertireoidismo aumenta a lipoperoxidação hepática, como demonstrado pelo aumento da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) (Tabela 4). Estes dados estão de acordo com vários outros publicados. A administração de T_3 , nas mesmas doses e tempo de tratamento aqui utilizados, eleva a formação de SRAT em homogeneizado e microsomo de fígado de rato, assim como aumenta a quimioluminescência espontânea da fração microsomal (Fernández e cols., 1985). A quantidade de MDA e hidroperóxidos também se encontra elevada em homogeneizado de fígado e coração, mas não de músculo, em animais recebendo a mesma dose de T_3 por 10 dias (Venditti e cols., 1997). Além disso, o hipertireoidismo induz o aumento da quimioluminescência *in situ* do fígado de rato (Fernández e cols., 1988) assim como a liberação biliar de SRAT (Fernández & Videla, 1996b) dois procedimentos que avaliam a resposta peroxidativa ao tratamento, mantendo a integridade da estrutura hepática. Em contrapartida, em ratos que receberam 0,012% de T_4 na água por quatro semanas, os níveis de MDA aumentam no músculo esquelético e coração, mas não no fígado (Asayama e cols., 1987). Em camundongos, que também receberam administração oral de T_4 por 4-5 semanas, foram encontrados níveis mais baixos de SRAT em relação aos

controles (Guerrero e cols., 1999). Tais resultados indicam que é possível que o fígado se adapte à condição de hipertireoidismo com o tempo, retornando aos níveis controle.

Esse estado pró oxidante, induzido no fígado pelo hipertireoidismo, pode favorecer a deterioração oxidativa de biomoléculas, com a conseqüente alteração ou perda de suas funções. Um estudo recente mostra o aumento da concentração de proteína oxidada no fígado de animais hipertiroídeos (Tapia e cols., 1999). A significância biológica da modificação oxidativa de proteínas no estresse oxidativo induzido por T_3 pode ser visualizada em dois níveis: a perda de função e aumento da degradação de proteínas. É possível que a diminuição das atividades da SOD e catalase, assim como a diminuição do conteúdo do citocromo P450, estejam relacionadas com esta oxidação protéica.

5.2 Efeito do tratamento com lindano

A administração de lindano, na dose de 20 mg/kg de peso corpóreo, não altera os parâmetros microssomais relacionados com a biotransformação de xenobióticos e atividade de espécies reativas de oxigênio. Em trabalho anterior deste laboratório, um pequeno aumento do conteúdo de citocromo P450 hepático, acompanhado de um aumento de potencial peroxidativo, foi observado em ratos tratados com esta mesma dose de lindano (Junqueira e cols., 1986). Apesar do aumento do conteúdo de P450 não ter sido observado neste modelo experimental (Tabela 5) e do conteúdo de SRAT, detectado por fluorescência, também não ter sido influenciado pela dose de lindano injetada (Tabela 5) o potencial peroxidativo dos animais tratados com lindano foi maior

do que o avaliado para os animais controle (Tabela 14). A diferença entre os dois métodos é crucial nesta análise. Enquanto o método fluorimétrico se utiliza apenas do tempo de incubação necessário para a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico, a medida de SRAT pelo método colorimétrico emprega um tempo de incubação adicional, permitindo a formação de mais SRAT. Esta produção depende de variáveis da amostra, como o conteúdo de antioxidantes, por exemplo. Desta maneira, o método fluorimétrico quantifica as SRAT existentes na amostra, enquanto a medida de SRAT pelo método colorimétrico reflete o potencial lipoperoxidativo da amostra. Conseqüentemente, um aumento do potencial lipoperoxidativo não implica, necessariamente, em maiores níveis de SRAT, medidos por fluorescência, na amostra.

Os sistemas antioxidantes estudados também não são alterados pelo lindano nesta dose, únicas exceções feitas à redução dos níveis hepáticos de licopeno (Tabela 7) e ao aumento do nível circulante de vitamina C (Tabela 8). Trabalhos anteriores deste laboratório já mostraram que, de fato, esta dose de lindano não altera as atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutathione peroxidase e redutase no fígado de rato (Junqueira e cols., 1986).

Dados interessantes foram obtidos no fígado de ratos tratados por 11 semanas com uma dieta com conteúdo relativamente baixo de α -tocoferol (2,5 mg/100 g de dieta, um pouco menos que os 3,0 mg/100 g de dieta recomendados pelo National Research Council of the National Academy of Sciences). Em comparação aos animais controle recebendo a mesma dieta, a dose de 20 mg/kg de lindano não só aumentou o conteúdo de citocromo P450, como também diminuiu a atividade da superóxido dismutase e aumentou a

produção de $O_2^{\bullet-}$ e a atividade da NADPH oxidase elevando, drasticamente, os indicadores de potencial lipoperoxidativo (Junqueira e cols., 1993b). Estes resultados mostram como uma dose relativamente baixa de lindano teve seu efeito aumentado por uma condição de menor proteção antioxidante.

5.3 Efeito do tratamento de ratos hipertiroídeos com lindano

Quando o lindano é injetado em animais previamente tratados com T_3 , observa-se um aumento significativo na atividade molecular da NADPH-citocromo c redutase, maior do que aquele observado após os tratamentos isolados, devido a um aumento na atividade específica da redutase e uma diminuição no conteúdo de citocromo P450 (Tabela 5). Como a concentração de citocromo P450 não é, normalmente, o fator limitante para a biotransformação de xenobióticos pelo fígado, mas sim sua redução dependente de NADPH, modulada pela sua interação com o substrato (Ruckpaul e cols., 1989) um aumento da atividade da NADPH-citocromo c redutase, juntamente com o aumento da atividade da G6PD (Tabela 4) enzima geradora de NADPH, podem indicar maior velocidade de redução do citocromo P450 e biotransformação de xenobióticos, independente da redução de seu conteúdo. Além disso, o tratamento com T_3 pode favorecer a síntese de certas isoformas de citocromo P450, aumentando a eficiência do complexo na biotransformação de certos xenobióticos e diminuindo a de outros. Um aumento na biotransformação do lindano pode ser uma explicação para os níveis mais baixos observados no soro, fígado e tecido adiposo de animais hipertiroídeos em comparação com animais eutireoídeos (Videla e cols., 1995).

De fato, a biotransformação dependente do sistema do citocromo P450 de alguns xenobióticos tem sido estudada na condição de hipertireoidismo. Se por um lado a administração de tiroxina aumenta a hidroxilação da anilina e da zoxazolamina, o mesmo tratamento diminui a N-demetilação da aminopirina e a hidroxilação de hexobarbital, em ratos machos (Kato & Takahashi, 1968; Kato e cols., 1970). Em humanos, o hipertireoidismo é acompanhado de uma diminuição na meia-vida da antipirina em adultos (Vesell e cols., 1974) e crianças (Saenger e cols., 1976), quando comparada aos valores dos mesmos pacientes após normalização da função da tireóide. O decaimento da antipirina reflete seu metabolismo hepático, uma vez que ela é completamente absorvida no trato gastrointestinal, apresenta ligação a proteínas desprezível, é distribuída uniformemente pelo conteúdo aquoso do organismo e menos de 10% da droga é excretada na forma inicial (Vesell e cols., 1974).

O aumento na taxa de redução do citocromo P450 pode levar a um aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ por autooxidação, espontânea ou pela presença de xenobióticos, do complexo $[Fe^{3+}\text{-P450-}O_2^{\bullet-}]$ (Goeptar e cols., 1995). Este aumento na produção de $O_2^{\bullet-}$ foi observado nos animais tratados com T_3 , independente do tratamento com lindano (Tabela 4). Contudo, quando a produção de $O_2^{\bullet-}$ é comparada entre os grupos experimentais em termos de proteção conferida pela atividade da SOD ($O_2^{\bullet-}/SOD$) o grupo T_3L apresenta um aumento substancial nesta razão em relação os grupos tratados separadamente (CL=CC; T_3C +85%; T_3L +138%; Tabela 9). O desbalanço na produção/dismutação de $O_2^{\bullet-}$ pelo tratamento conjunto de T_3 e lindano deve contribuir para o aumento do estresse oxidativo hepático, anteriormente

descrito para este modelo (Videla e cols., 1995). Além disso, os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que, além da diminuição dos níveis hepáticos dos antioxidantes lipossolúveis α -tocoferol, β -caroteno e licopeno, o tratamento conjunto diminui ainda mais o conteúdo de α -tocoferol (decréscimo de 66%, comparado ao decréscimo de 30% obtido após o tratamento isolado com T₃) assim como o de GSHT (decréscimos de 51 e 64% para T₃C e T₃L, respectivamente; Tabela 21) em relação aos tratamentos isolados. Da mesma forma que para a relação $O_2^{\bullet-}/SOD$, o grupo T₃/L apresentou uma relação entre potencial peroxidativo e conteúdo hepático de GSHT substancialmente maior do que para os outros grupos experimentais (CL +55%, T₃C +177%, T₃L +341%; Tabela 22).

5.4 Efeito dos tratamentos na função das CK

As células do sinusóide hepático têm sido alvo de muitos estudos, onde são relacionadas ao processo de dano hepático. Por exemplo, as células de Ito produzem proteínas direcionadas à matriz extracelular, cujo acúmulo durante a injúria hepática crônica contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática. No caso da injúria provocada pelo tratamento com tetracloreto de carbono, esta resposta das células de Ito parece ser modulada por fatores de crescimento produzidos por CK (Johnson e cols., 1992).

A função das CK tem sido associada ao dano hepático provocado em vários modelos. O tratamento de ratos com acetaminofeno resulta em acúmulo de macrófagos ativados nas regiões centrolobulares do fígado, que podem contribuir para a injúria hepática (Laskin e cols., 1986). A inibição da função

das CK com pré-tratamento de GdCl_3 diminui sensivelmente as atividades da lactato desidrogenase e da purina nucleosídeo fosforilase, indicadores de lesão de células parequimais e endoteliais, respectivamente, em perfusatos de fígados submetidos a isquemia e reperfusão (Bailey & Reinke, 2000). A eliminação das CK também previne o dano hepático induzido por etanol, principalmente em seus estágios iniciais. O tratamento de ratos com etanol e GdCl_3 reduz significativamente a atividade da aspartato aminotransferase, reduzindo também o aparecimento de fígado gorduroso, inflamação e necrose hepática, injúrias induzidas em animais tratados apenas com etanol (Adachi e cols., 1994). O dano por reperfusão em fígados gordurosos após tratamento com etanol também foi diminuído com a eliminação seletiva das CK, indicado pela menor atividade da lactato desidrogenase no perfusato e pela diminuição na velocidade de produção de MDA nos animais tratados com etanol e GdCl_3 (Zhong e cols., 1995). As citocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio, produzidas durante a inflamação e resposta imune das CK, também participam na injúria hepática observada em modelos de sepsis (Monden e cols., 1991).

A administração de baixas doses de lindano (5 a 20mg/kg) aumenta ambos a captação de carbono coloidal e o consumo de O_2 associado a essa captação, em fígado perfundido de rato. Além disso, em ratos tratados com 20 mg/kg de lindano, a atividade da lactato desidrogenase no perfusato encontra-se aumentada após a infusão de carbono coloidal. Esses efeitos são marcadamente diminuídos com o pré-tratamento com GdCl_3 . Doses maiores de lindano (40 a 60 mg/kg) também induzem um aumento na atividade da lactato desidrogenase no perfusato; entretanto, esse efeito não é suprimido pelo

bloqueio das CK com $GdCl_3$, sugerindo que a participação das CK no dano hepático induzido pela administração de lindano seja mais proeminente nas doses mais baixas, enquanto o mecanismo de injúria das doses mais elevadas de lindano está mais centrado na célula parenquimática (Videla e cols., 1997).

A função das CK também encontra-se aumentada no hipertireoidismo. Tapia e cols. mostraram, em experimentos de perfusão hepática, que além do aumento da captação de carbono coloidal e do consumo de O_2 associado, ratos tratados com T_3 mostram um aumento no efluxo de lactato desidrogenase no perfusato, aumento na formação de SRAT e depleção do conteúdo hepático de GSHT, todos efeitos diminuídos significativamente em animais hipertiroídeos pré-tratados com $GdCl_3$, indicando claramente uma participação das CK no desenvolvimento do estresse oxidativo hepático no hipertireoidismo (Tapia e cols., 1997). Além disso, a administração de T_3 induz um aumento na atividade da NO sintase, que é parcialmente revertido pela eliminação das CK com $GdCl_3$, sem que haja evidência da ação direta do $GdCl_3$ sobre a enzima (Fernández e cols., 1997).

Todos esses indícios nos levaram a avaliar a participação das CK no estresse oxidativo hepático observado nos grupos experimentais estudados, principalmente na potenciação do efeito do lindano após o pré-tratamento com T_3 . A princípio, utilizamos a luminescência de CK isoladas para avaliar essa função.

Os valores não normalizados de emissão de luz até o pico da curva de luminescência, produzida por CK estimuladas com zimosan opsonizado, revelam um aumento significativo entre o tratamento conjunto T_3 /lindano e os tratamentos com T_3 ou lindano isoladamente (48 e 42%, respectivamente)

(Tabela 11) não sendo detectável a existência de um efeito similar nos dados de emissão total de luz e velocidade máxima de emissão de luz. Entretanto, analisando a curva de luminescência produzida por fagócitos durante o “burst” oxidativo, esta parece ser melhor representada pela emissão de luz até o pico, pois esta indica a etapa de produção de espécies reativas durante a fagocitose; são estas espécies reativas que reagem com o luminol, emitindo luz. A fase descendente da curva de emissão de luz representa a fase de extinção das espécies reativas, onde carbonilas excitadas produzidas durante o “burst” oxidativo reagem entre si, diminuindo a emissão de luz com o tempo; esta fase não representa necessariamente um parâmetro de atividade de CK, já que pode depender de outros fatores extrínsecos ao processo de “burst” oxidativo. Apesar da tendência de redução na emissão de luz até o pico das CK dos tratamentos isolados com T_3 ou lindano em relação ao controle não se mostrar significativa sob tratamento estatístico, o aumento estatisticamente significativo da luminescência até o pico no tratamento conjunto, em relação aos tratamentos individuais, evidencia uma alteração no funcionamento nas CK. Este efeito pode estar relacionado com a alteração da biodisponibilidade que o T_3 exerce sobre o lindano, diminuindo sua concentração circulante, hepática e no tecido adiposo, assim como com a diminuição dos níveis circulantes de T_3 na presença de lindano (Videla e cols., 1995). O conseqüente aumento na taxa metabólica produzido pelo tratamento com o T_3 pode acelerar a biotransformação do lindano, aumentando sua taxa de eliminação. Tal efeito, que pode contribuir para a produção mais elevada de espécies reativas no fígado pela aceleração da fase redutiva da biotransformação do lindano (Junqueira e cols., 1986) diminui a concentração de lindano disponível para

interferir na membrana das CK, podendo facilitar, e até mesmo estimular, o processo do “burst” oxidativo nos animais hipertiroídeos tratados com lindano. Em contrapartida, por ser altamente lipofílico e ser capaz de interferir na atividade de proteínas de membrana plasmática (Tiwari e cols., 1982; Jones e cols., 1985; Parries & Hokin-Neaverson, 1985; Demael e cols., 1987), o lindano pode estar interferindo no transporte ativo que caracteriza a principal via de captação do T_3 pelas células (De Groot e cols., 1996). Deste modo, nas CK dos animais tratados com ambas as drogas, a ação do T_3 , e, conseqüentemente, seu efeito desacoplador na produção de energia, pode estar diminuída em relação aos tratados apenas com T_3 , sendo possível que o fornecimento de energia necessário ao “burst” oxidativo nestas células seja mais eficiente.

Os valores normalizados de emissão de luz até o pico e total em 50 minutos também mostram um aumento no tratamento conjunto em relação ao tratamento apenas com lindano (Tabela 12). Há uma diferença, contudo, na proporção deste aumento. Enquanto o tratamento conjunto aumenta a emissão de luz até o pico em 30%, o aumento na emissão de luz total em 50 minutos chega a 100% para este grupo experimental. Apesar do aumento na emissão total ser mais expressivo, é possível que, em termos de “burst” oxidativo, o aumento na emissão de luz até o pico seja mais relevante, como anteriormente descrito, uma vez que este se encontra na fase da luminescência onde as espécies reativas estão sendo efetivamente produzidas. A fase descendente da curva, que participa no cálculo da integral que quantifica a luz total emitida, está mais relacionada com reações de anulação destas espécies.

A atividade candidicida das CK também mostrou-se alterada após os diferentes tratamentos. Enquanto os tratamentos isolados de lindano e T_3

reduziram a porcentagem de fagocitose pelas CK (22,7% e 13,1%, respectivamente) o tratamento em conjunto de T_3 e lindano aumentou discretamente (+8,2%) a atividade fagocítica em relação ao controle. Por outro lado, a eficiência com que as CK mataram as leveduras fagocitadas foi levemente menor em todos os tratamentos com relação ao controle (redução de 6,7%, 8,0% e 7,8% para os grupos tratados com lindano, T_3 e lindano/ T_3 , respectivamente) (Tabela 10). O lindano, por alterar a permeabilidade de membranas celulares (Antunes-Madeira & Madeira, 1979; Agrawal e cols., 1989) e alterar a atividade de proteínas da mesma (Parries & Hokin-Neaverson, 1985; Bhalla & Agrawal, 1998), pode interferir no funcionamento de receptores de membrana responsáveis pelo processo de fagocitose. No caso do T_3 , o efeito desacoplador do hormônio, que leva à diminuição da produção de ATP, pode dificultar a atividade fungicida das CK por uma menor disponibilidade de energia. Quando ambos tratamentos são aplicados, ocorre um aumento no estresse oxidativo e diminuição de defesas antioxidantes no hepatócito. As CK podem estar sendo estimuladas a aumentar a fagocitose, mas, encontrando-se fragilizadas pelo estresse oxidativo, não conseguem matar as leveduras eficientemente.

Os resultados aqui apresentados indicam que o tratamento conjunto T_3 /lindano altera a função das CK em relação aos tratamentos isolados, aumentando a emissão de luz, derivada do aumento da produção de espécies reativas por estas células, após o estímulo do zimosan opsonizado. Contudo, os tratamentos isolados não foram capazes de sozinhos provocar este aumento em relação aos controles. Os trabalhos apresentados na literatura sobre aumento da função das CK nas condições de hipertireoidismo (Tapia e

cols., 1997) e intoxicação com lindano (Videla e cols., 1997) utilizam experimentos de perfusão em fígado inteiro, e não células isoladas, como no presente estudo. É possível que o próprio procedimento de separação das células altere a sua capacidade de resposta ao estímulo; é possível, também, que a manutenção da estrutura morfológica do fígado exerça grande influência nesta resposta. Uma possível fonte de problemas na nossa preparação é a presença de contaminantes na fração de CK, como hepatócitos, núcleos nus e, principalmente, células endoteliais, que são facilmente confundidas com CK. A variação da proporção das células endoteliais na preparação das CK pode ser parcialmente responsável pela variação nas respostas obtidas em cada experimento. Tal influência deve ser diminuída pelo fato de utilizarmos estímulo particulado para os estudos de luminescência, que não deveria atuar sobre as células endoteliais.

O estudo da função das CK isoladas difere fundamentalmente dos estudos realizados no órgão íntegro. É preciso considerar a complexa interação que ocorre entre as diferentes células do fígado. Potoka e cols. mostraram que a presença de células endoteliais potenciam a capacidade fagocítica e a atividade candidacida de CK em cultura (Potoka e cols., 1998).

Essas considerações tornaram necessários os experimentos de inibição preferencial das CK, no órgão intacto, com a administração de $GdCl_3$, seguida da reavaliação de alguns dos parâmetros estudados na primeira fase deste trabalho. O $GdCl_3$ tem sido amplamente utilizado em estudos para identificar o papel das CK no dano hepático observado em modelos como isquemia e reperfusão (Bailey & Reinke, 2000), sepsis (Roland e cols., 1999), sobrecarga

de ferro (Tapia e cols., 1998), intoxicação com etanol (Adachi e cols., 1994), entre outros.

Uma comparação importante entre os animais tratados ou não com $GdCl_3$ é sobre o efeito que a ausência das CK traz no animal controle. O efeito mais dramático encontrado nestes animais foi a queda na atividade da catalase em todos os grupos experimentais tratados com $GdCl_3$ (Tabela 16) seguido da diminuição no potencial peroxidativo, também em todos os grupos (Tabela 14). É possível que a atividade da catalase, presente nas CK, represente uma porção significativa da atividade hepática desta enzima, medida na fração citossólica total do órgão, sem discriminação quanto à origem celular. Desta forma, com a retirada seletiva das CK pelo $GdCl_3$, a atividade total da catalase no fígado pode ser sensivelmente diminuída. Por outro lado, a presença de componentes celulares provenientes das CK, contendo sistemas capazes de gerar ou estimular a produção de SRAT durante o período de incubação do ensaio, deve contribuir no potencial lipoperoxidativo hepático. A retirada destas células deve, assim, diminuir o potencial lipoperoxidativo basal do fígado, ou seja, a produção normal de SRAT na ausência de um tratamento específico, assim como o observado após os tratamentos. Os outros parâmetros estudados nos animais com $GdCl_3$ não mostraram alterações consistentes em relação aos respectivos controles.

Os resultados das Tabelas 13 a 23 mostram que algumas das diferenças, previamente observadas entre os grupos tratados com T_3 e o controle, desaparecem na ausência das CK, enquanto outras se mantiveram. Apesar da atividade molecular da enzima NADPH citocromo c redutase continuar aumentada nos animais tratados com T_3 e $GdCl_3$, não foram

encontradas diferenças significativas na velocidade de produção microsomal de $O_2^{\bullet-}$ entre os diversos grupos experimentais, após o tratamento com $GdCl_3$. A atividade da SOD também não sofreu diminuição nos animais hipertiroídeos tratados com $GdCl_3$. Também não foi observado aumento no potencial peroxidativo hepático nos grupos hipertiroídeos tratados com T_3 , ainda que este parâmetro continuasse elevado para os animais tratados apenas com lindano e $GdCl_3$. Por outro lado, tanto a atividade da catalase como o conteúdo do citocromo P450 continuaram diminuídos nos animais hipertiroídeos com relação aos controles, ambos os grupos tratados com $GdCl_3$ (Tabelas 16 e 18, respectivamente) sugerindo que o efeito do T_3 sobre as heme proteínas seja independente do funcionamento das CK. A queda do conteúdo hepático de GSHT no hipertireoidismo também manteve-se após o tratamento com $GdCl_3$.

Com relação aos índices de estresse oxidativo $O_2^{\bullet-}/SOD$ e $SRAT/GSHT$ (Tabelas 22 e 23) a retirada seletiva das CK eliminou o efeito potenciador do lindano na condição de hipertireoidismo, ainda que a razão $SRAT/GSHT$ tenha se mostrado elevada nos animais hipertiroídeos tratados com $GdCl_3$. Estes resultados sugerem que, enquanto as CK não sejam responsáveis pela totalidade do estresse oxidativo observado nos animais hipertiroídeos, a função destas células, que se encontram em número aumentado nestes animais, pode contribuir para o estado de proteção limítrofe no qual uma dose baixa de lindano passa a ter sua toxicidade potenciada.

Por fim, os estudo morfológicos, representados nas Figuras 17-24, estão de acordo com o previamente publicado para os animais tratados com T_3 e/ou lindano (Videla e cols., 1995) que mostrou hiperplasia das CK no hipertireoidismo, acompanhada de infiltração de PMN e necrose no tratamento

conjunto, sustentando a idéia de que o efeito de uma dose relativamente baixa de lindano é potenciado no hipertireoidismo. A adição do tratamento com $GdCl_3$ demonstra que a administração de lindano em ratos hipertiroídeos deve, pelo menos em parte, seu aumento da hepatotoxicidade pela hiperplasia de CK no hipertireoidismo, uma vez que o tratamento com $GdCl_3$ preveniu o surgimento de infiltrados inflamatórios, não sendo observados pontos necróticos nos animais do tratamento conjunto T_3 /lindano nestas condições.

6 Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho sustentam o aumento da susceptibilidade do fígado aos efeitos tóxicos do lindano no estado de hipertireoidismo induzido pela administração de hormônio da tireóide. Este efeito parece ser promovido pelo aumento nos parâmetros microsossomais relacionados à biotransformação do lindano, causando um aumento da razão $O_2^{\bullet-}/SOD$ em favor do primeiro. Além disso, a depleção dos antioxidantes α -tocoferol e GSHT no grupo hipertiroídeo tratado com lindano é maior do que a soma dos efeitos promovidos pelos tratamentos em separado, proporcionando uma razão entre peroxidação lipídica hepática e proteção antioxidante (SRAT/GSHT) muito superior nos animais tratados conjuntamente.

A importância das CK no aumento do efeito do lindano no hipertireoidismo experimental foi evidenciada pela supressão dos efeitos acima mencionados após a administração do inativador de CK, o $GdCl_3$. Estudos morfológicos corroboram este dado, mostrando uma supressão de sinais inflamatórios e necróticos nos animais hipertiroídeos tratados com T_3 e $GdCl_3$.

7 Referências Bibliográficas

- Adachi, Y.; Bradford, B. U.; Gao, W.; Bojes, H. K.; Thurman, R. G. (1994). Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology*, **20**: 453-460.
- Agrawal, D.; Sultana, P.; Ray, P. K. (1989). Effect of pesticides on red blood cells. *Indian Vet. Med. J.*, **13**: 14-20.
- Aikens, J.; Dix, J. A. (1991). Perhydroxyl radical ($\text{HOO}^\bullet$) initiated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **226**: 15091-15098.
- Allen, R. C. (1986). Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: A kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol.*, **133**: 449-493.
- Allen, R. C.; Mead, M. E.; Kelly, J. L. (1985). Phagocyte oxygenation activity measured by chemiluminescence and chemilumigenic probing. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. R. A. Greenwald. Boca Raton, CRC Press: 343-351.
- Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens - oxygen radicals and degenerative disease. *Science*, **221**.
- Antunes-Madeira, M. C.; Madeira, V. M. C. (1979). Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **550**: 384-392.
- Antunes-Madeira, M. C.; Madeira, V. M. C. (1989). Membrane fluidity as affected by the insecticide lindane. *Biochim. Biophys. Acta*, **982**: 161-166.
- Arisi, A. C. M. (1993). Distribuição tecidual de lindano e relação com sua toxicidade. Instituto de Química. São Paulo, Universidade de São Paulo: 112.
- Arisi, A. C. M.; Simizu, K.; Kogake, M.; Bainy, A. C. D.; Silva, M. A. S.; Barros, S. B. M.; Boveris, A.; Videla, L. A.; Junqueira, V., B. C. (1994). Brain and liver lipid peroxidation levels following acute and short-term lindane administration in the rat. *Toxicol. Lett.*, **74**: 61-68.
- Arlt, U.; Dieter, P. (1993). Characterization of NADPH oxidase in rat liver macrophages. Cells of the Hepatic Sinusoid, Vol. 4. D. L. Knook, E. Wisse. Leiden, Kupffer Cell Foundation. **4**: 45-47.
- Asayama, K.; Dobashi, K.; Hayashibe, H.; Megata, Y.; Kato, K. (1987). Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinology*, **121**(6): 2112-2118.
- Azizi, F. (1982). Gama-glutamyl transpeptidase levels in thyroid disease. *Arch. Intern. Med.*, **142**: 79-81.

- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, **93**: 1464-1476.
- Bailey, S. M.; Reinke, L. A. (2000). Antioxidants and gadolinium chloride attenuate hepatic parenchymal and endothelial cell injury induced by low ischemia and reperfusion in perfused rat livers. *Free Rad. Res.*, **32**: 497-506.
- Baker, M. T.; Nelson, R. M.; Van Dyke, R. A. (1985). The formation of chlorobenzene and benzen be the reductive metabolism of lindane in rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**(2): 506-514.
- Barker, S. B. (1951). Mechanism of action of the thyroid hormone. *Physiological Reviews*, **31**(3): 205-243.
- Barros, S. B. M.; Videla, L. A.; Simizu, K.; Van Halsema, L.; Junqueira, V. B. C. (1988). Lindane-induced oxidative stress. II. Time course of changes in hepatic glutathione status. *Xenobiotica*, **18**(11): 1305-1310.
- Berlett, B. S.; Levine, R. L.; Stadtman, E. R. (1998). Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: Both modifications mimic effects of adenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 2784-2789.
- Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **33**: 20313-20316.
- Berman, M. L.; Kuhnert, L.; Phythyon, J. M.; Holaday, D. A. (1983). Isoflurane and enflurane-induced hepatic necrosis in triiodothyronine-pretreated rats. *Anesthesiology*, **58**(1): 1-5.
- Bernheim, F.; Bernheim, M. L. C.; Wilbur, K. M. (1948). The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J. Biol. Chem.*, **174**: 257-264.
- Beutler, E. (1975). Catalase. Red Cell Metabolism - A Manual of Biochemical Methods. New York, Grune & Stratton: 89-90.
- Bhalla, P.; Agrawal, D. (1998). Alterations in rat erythrocyte membrane due to hexachlorocyclohexane (technical) exposure. *Human & Experimental Toxicology*, **17**: 638-642.
- Billiar, T. R.; Curran, R. D.; Stuehr, D. J.; West, M. A.; Bentz, B. G.; Simmons, R. L. (1989). An arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro*. *J. Exp. Med.*, **169**: 1467-1472.
- Bouwens, L.; De Bleser, P.; Vanderkerken, K.; Geerts, B.; Wisse, E. (1992). Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme*, **46**: 155-168.
- Boveris, A.; Fraga, C. G.; Varsavsky, I.; Koch, O. R. (1983). Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**: 534-541.

Boveris, A.; Oshino, N.; Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, **128**(3): 617-630.

Brent, G. A. (1994). The molecular basis of thyroid hormone action. *The New England Journal of Medicine*, **331**(13): 847-853.

Burton, G. W.; Ingould, K. U. (1984). Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224**: 569-573.

Burton, G. W.; Webb, A.; Ingold, K. A. (1985). A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*, **20**: 29-39.

Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L.; Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.*, **424**(1-2): 9-21.

Calvert, D. N.; Brody, T. M. (1962). The effect of thyroid function upon carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **134**: 204-207.

Carrion, Y.; Fernández, V.; Videla, L. A. (1993). Influence of thyroid hormone administration on hepatic glutathione content and basolateral γ -glutamyltransferase ectoactivity in the isolated perfused rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **45**(12): 2527-2535.

Chan, S. S.; Monteiro, H. P.; Deucher, G. P.; Abud, R. L.; Abuchalla, D.; Junqueira, V. B. C. (1998). Functional activity of blood polymorphonuclear leukocytes as an oxidative stress biomarker in human subjects. *Free Rad. Biol. Med.*, **24**(9): 1411-1418.

Cross, A. R.; Jones, O. T. G. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**: 281-298.

Cutrín, J. C.; Llesuy, S.; Boveris, A. (1998). Primary role of Kupffer cell-hepatocyte communication in the expression of oxidative stress in the post-ischaemic liver. *Cell Biochem. Funct.*, **16**: 65-72.

De Groot, L. J.; Larsen, P. R.; Hennemann, G. (1996). Thyroid hormone transport, cellular uptake, metabolism, and molecular action. The Thyroid and its Diseases. New York, Churchill Livingstone: 61-111.

deBethizy, J. D.; Hayes, J. R. (1994). Metabolism: A determinant of toxicology. Principles and Methods of Toxicology. A. W. Hayes. New York, Raven Press, Ltd.: 59-100.

Decker, K. (1990). Biological active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.*, **192**: 245-261.

Decker, K. (1998). The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J. Med.*, **47**(1): 1-9.

Demael, A.; Lepot, D.; Cossarini-Dunier, M.; Monod, G. (1987). Effect of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) on carp (*Cyprinus carpio*). II. Effects of chronic intoxication on blood, liver enzymes, and muscle plasmic membrane. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **13**: 346-351.

Dési, I.; Varga, L.; Farkas, I. (1978). Studies on the immunosuppressive effect of organochlorine and organophosphoric pesticides in subacute experiments. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **22**(1): 115-122.

Desmet, V. J. (1994). Organizational Principles. The Liver Biology and Pathobiology. I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby; D. A. Schachter, D. A. Shafritz. New York, Raven Press, Ltd.: 3-14.

Devasagayam, T. P. A.; Steenken, S.; Obendorf, M. S. W.; Schulz, W. A.; Sies, H. (1991). Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry*, **30**: 6283-6289.

Dieter, P.; Fitzke, E. (1993). Relationship between intracellular changes of Ph and calcium, activation of phospholipase C and protein kinase C and the synthesis and release of eicosanoids and superoxide in cultured rat Kupffer cells. Cells of the Hepatic Sinusoid. D. L. Knook, E. Wisse. Leiden, Kupffer Cell Foundation. **4**: 8-12.

Doolittle, R. L.; Richter, G. W. (1981). Isolation and culture of Kupffer cells and hepatocytes from single rat livers. *Lab. Invest.*, **45**(6): 558-566.

Eaton, J. W. (1991). Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary. *J. Lab. Clin. Med.*, **118**: 3-4.

Ecobichon, D. J. (1996). Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. C. D. Klaassen. New York, McGraw-Hill: 643-689.

Edelman, I. S. (1974). Thyroid Thermogenesis. *The New England Journal of Medicine*, **290**: 1303.

Ekström, G.; Ingelman-Sundberg, M. (1989). Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1). *Biochem. Pharmacol.*, **38**(8): 1313-1319.

Fernández, V.; Barrientos, X.; Kipreos, K.; Valenzuela, A.; Videla, L. A. (1985). Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. *Endocrinology*, **117**(2): 496-501.

Fernández, V.; Cornejo, P.; Tapia, G.; Videla, L. A. (1997). Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, **1**(6): 463-468.

Fernández, V.; Llesuy, S.; Solari, L.; Kipreos, K.; Videla, L. A.; Boveris, A. (1988). Chemiluminescent and respiratory responses related to thyroid hormone-induced liver oxidative stress. *Free Rad. Res. Comms.*, **5**(2): 77-84.

Fernández, V.; Simizu, K.; Barros, S. B. M.; Azzalis, L. A.; Pimentel, R.; Junqueira, V. B. C. (1991). Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzymes' activities, efflux and turnover. *Endocrinology*, **129**: 85-91.

Fernández, V.; Videla, L. A. (1993a). Influence of hyperthyroidism on superoxide radical and hydrogen peroxide production by rat liver submitochondrial particles. *Free Rad. Res. Comms.*, **18**(6): 329-335.

Fernández, V.; Videla, L. A. (1993b). 3,3',5-Triiodothyronine-induced hepatic respiration: effects of desferrioxamine and allopurinol in the isolated perfused liver. *Toxicol. Lett.*, **69**: 205-210.

Fernández, V.; Videla, L. A. (1996a). Respective roles of nitric oxide and superoxide radical in the respiratory burst activity of rat polymorphonuclear leukocytes induced by hyperthyroidism. *Redox Report*, **2**(5): 317-321.

Fernández, V.; Videla, L. A. (1996b). Effect of hyperthyroidism on the biliary release of thiobarbituric acid reactants in the rat. *Toxicol. Lett.*, **84**: 149-153.

Floyd, R. A.; Lewis, C. A. (1983). Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes. *Biochemistry*, **22**: 2645-2649.

Frei, B.; Kim, M. C.; Ames, B. N. (1990). Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 4870-4883.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, **201**: 875-880.

Fridowich, I. (1986). Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**(1): 1-11.

Gallo, M. A. (1996). History and Scope of Toxicology. Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons. C. D. Klaassen. New York, McGraw-Hill: 3-12.

Gerschman, R.; Gilbert, D. L.; Nye, S. W.; Dwyer, P.; Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science*, **119**: 623-626.

Giavarotti, K. A. S.; Rodrigues, L.; Rodrigues, T.; Junqueira, V. B. C.; Videla, L. A. (1998). Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Rad. Res.*, **29**: 35-42.

Glock, G. E.; McLean, P. (1953). Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.*, **55**: 400-408.

Goeptar, A. R.; Scheerens, H.; Vermeulen, N. P. E. (1995). Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**(1): 25-65.

Guerrero, A.; Pamplona, R.; Manuel, P.-O.; Barja, G.; Mónica, L.-T. (1999). Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**(1/2): 73-80.

Gunasena, G. H.; Kanz, M. F. (1997). Effect of hyperthyroidism on the in vitro metabolism and covalent binding of 1,1-dichloroethylene in rat liver microsomes. *J. Toxicol. Environ. Health*, **52**(2): 169-188.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. (1996a). General principles of gastrointestinal function - motility, nervous control, and blood circulation. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 793-813.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. (1996b). The thyroid metabolic hormones. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, W.B. Saunders Company: 945-956.

Haber, R. S.; Loeb, J. N. (1984). Early enhancement of passive potassium efflux from rat liver by thyroid hormone: relation to induction of Na,K-ATPase. *Endocrinology*, **115**(1): 291-297.

Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.*, **1**: 358-364.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Oxford University Press.

Haltensen, A.; Hanenberg, B.; Gillette, J.; Sandberg, S.; Solberg, C. O. (1986). Factors important for the measurement of chemiluminescence production by polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol. Meth.*, **88**: 121-128.

Hardonk, M. J.; Dijkhuis, F. W. J.; Hulstaert, C. E.; Koudstaal, J. (1992). Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J. Leukoc. Biol.*, **52**: 296-302.

Hemmings, B.; Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. Nitric Oxide Protocols. M. A. Titheradge. Totowa, Humana Press Inc. **100**: 1-32.

Huang, M.-J.; Liaw, Y.-F. (1995). Clinical associations between thyroid and liver diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **10**: 344-350.

Hulbert, A. J. (1978). The thyroid hormones: a thesis concerning their action. *J. Theor. Biol.*, **73**: 81-100.

Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9265-9269.

Johnson, S. J.; Hines, J. E.; Burt, A. D. (1992). Macrophage and perisinusoidal cell kinetics in acute liver injury. *J. Pathol.*, **166**: 351-358.

- Jones, O. T.; Froud, R. J.; Lee, A. G. (1985). Interactions of hexachlorocyclohexanes with the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*(812): 740-751.
- Junqueira, V. B. C.; Barros, S. B. M.; Simizu, K.; Fernández, V.; Carrión, Y.; Pimentel, R.; Azzalis, L. A.; Videla, L. A. (1993a). Turnover of hepatic glutathione after acute lindane intoxication. *Toxicol. Lett.*, **69**: 211-216.
- Junqueira, V. B. C.; Azzalis, L. A.; Barros, S. B. M.; Simizu, K.; Fuzaro, A. P.; Arisi, A. C. M.; Simon, K. A.; Giavarotti, L.; Fraga, C.; Porta, E. A. (1993b). Hepatic effects of acute lindane treatment in rats chronically fed a high ethanol regimen relatively low in alpha-tocopherol. *Biochem Arch.*, **9**: 157-174.
- Junqueira, V. B. C.; Koch, O. R.; Arisi, A. C. M.; Fuzaro, A. P.; Azzalis, L. A.; Barros, S. B. M.; Cravero, A.; Farré, S.; Videla, L. A. (1997). Regression of morphological alterations and oxidative stress-related parameters after acute lindane-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, **117**: 199-205.
- Junqueira, V. B. C.; Simizu, K.; Van Halsema, L.; Koch, O. R.; Barros, S. B. M.; Videla, L. A. (1988). Lindane-induced oxidative stress. I. Time course of changes in hepatic microsomal parameters, antioxidant enzymes, lipid peroxidative indices and morphological characteristics. *Xenobiotica*, **18**(11): 1297-1304.
- Junqueira, V. B. C.; Simizu, K.; Videla, L. A.; Barros, S. B. d. M. (1986). Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Toxicology*, **41**: 193-204.
- Kagan, V. E.; Stoyanovsky, D. A.; Quinn, P. J. (1994). Integrated functions of coenzyme Q and vitamin E in antioxidant action. Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. Esterbauer, H. N.; Rice-Evans, C. London, Richelieu Press: 221-248.
- Kato, R.; Takahashi, A. (1968). Thyroid hormone and activities of drug-metabolizing enzymes and electron transport systems of rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.*, **4**: 109-120.
- Kato, R.; Tanaka, A.; Takashi, A. (1970). Effect of thyroid hormone on the substrate interaction with P-450 in the oxidation of drugs by liver microsomes. *J. Biochem.*, **68**: 613-623.
- Kay, M. M. B.; Bosman, G. J. G. C. M.; Shapiro, S. S.; Bendich, A.; Bassel, P. S. (1986). Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 2463-2467.
- Koff, R. S. (1980). . Liver Disease in Primary Care Medicine. New York, Appleton-Century-Craft: 81-84.

- Krenning, E.; Docter, R.; Visser, T.; Hennemann, G. (1981). Characteristics of active transport of thyroid hormone into rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **676**: 314-320.
- Laskin, D. L.; Pilaro, A. M.; Ji, S. (1986). Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity - II. Mechanisms of macrophage accumulation and activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **86**: 216-226.
- Liebler, D. C.; Burr, J. A. (1992). Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical. *Biochemistry*, **31**: 8278-8242.
- Lloyd, D. R.; Phillips, D. H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper II, iron II and $\square$ / nickel II Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res.*, **424**: 23-36.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lu, A. Y. H.; Junk, K. W.; Coon, M. (1969). Resolution of the cytochrome P-450 containing w-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. Biol. Chem.*, **244**: 3714-3721.
- Lunec, J. (1990). Free radicals: Their involvement in disease processes. *Ann. Clin. Biochem.*, **27**: 173-182.
- Machlin, L. J.; Bendich, A. (1987). Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, **1**: 441-445.
- McCord, J.; Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049-6055.
- McCord, J. M. (1987). Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed. Proc.*, **46**(7): 2402-2406.
- McIver, M. A. (1940). Increased susceptibility to chloroform poisoning produced in the albino rat by injection of crystalline thyroxine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **45**: 201-204.
- McPhail, L. C.; Harvath, L. (1993). Signal transduction in neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis. The Neutrophil - The Natural Immune System. J. S. Abramson, J. G. Wheeler. New York, IRL Press: 63-107.
- Mello-Filho, A. C.; Meneghini, R. (1984). In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **781**: 56-63.
- Meneghini, R. (1988). Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. *Mutat. Res.*, **195**: 215-230.

- Misra, H. P.; Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **247**: 3170-3175.
- Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**(2): 109-142.
- Monden, K.; Arai, S.; Itai, S.; Sasaoki, T.; Adachi, Y.; Funaki, N.; Tobe, T. (1991). Enhancement of hepatic macrophages in septic rats and their inhibitory effect on hepatocyte function. *J. Surg. Res.*, **50**: 72-76.
- Motchinik, P. A.; Frei, B.; Ames, B. N. (1994). Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Methods Enzymol.*, **234**: 269-279.
- Nishiki, K.; Ericinska, M.; Wilson, D. F.; Cooper, S. (1978). Evaluation of oxidative phosphorylation in hearts from euthyroid, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Am. J. Physiol.*, **235**: C212-C219.
- Norman, A. W.; Litwack, G. (1997). Thyroid Hormones. Hormones. San Diego, Academic Press: 169-191.
- Omura, T.; Sato, R. (1964). The carbon-monoxide pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**: 2370-2378.
- Parkinson, A. (1996). Biotransformation of Xenobiotics. Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons. C. D. Klaassen. New York, McGraw-Hill: 113-186.
- Parries, G. S.; Hokin-Neaverson, M. (1985). Inhibition of phosphatidylinositol synthase and other membrane-associated enzymes by stereoisomers of hexachlorocyclohexane. *J. Biol. Chem.*, **260**: 2687-2693.
- Potoka, D. A.; Takao, S.; Owaki, T.; Bulkley, G. B.; Klein, A. S. (1998). Endothelial cells potentiate oxidant-mediated Kupffer cell phagocytic killing. *Free Rad. Biol. Med.*, **24**(7-8): 1217-1227.
- Raheja, K. L.; Linscheer, W. G.; Cho, C.; Mahany, D. (1982). Protective effect of propylthiouracil independent of its hypothyroid effect on acetaminophen toxicity in the rat. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **200**(2): 427-432.
- Refetoff, S.; Nicoloff, J. T. (1995). Thyroid Hormone Transport and Metabolism. Endocrinology. L. J. DeGroot, M. Besser, H. G. Burger, J. L. Jameson, D. L. Loriaux, J. C. Marshall, W. D. Odell, Potts Jr., A. H. Rubenstein. Philadelphia, W.B. Saunders Company. **1**: 560-582.
- Refsgaard, H. H. F.; Tsai, L.; Stadtman, E. R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(2): 611-616.
- Richter, C. (1987). Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids*, **44**(2-4): 175-189.

Roland, C. R.; Naziruddin, B.; Mohanakumar, T.; Flye, M. W. (1999). Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium channels: relevance to calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality. *Hepatology*, **29**: 756-765.

Roux, F.; Treich, I.; Brun, C.; Desoige, B.; Fournier, E. (1979). Effect of lindane on human lymphocyte responses to phytohemagglutinin. *Biochem. Pharmacol.*, **28**(16): 2419-2426.

Rubin, E.; Farber, J. L. (1994). The Liver and Biliary System. Pathology. E. Rubin, J. L. Farber. Philadelphia, J.B. Lippincott Company: 704-785.

Ruckpaul, K.; Rein, H.; Blanck, J. (1989). Regulation Mechanisms of the activity of the hepatic endoplasmic cytochrome P-450. Basis and Mechanisms of Regulation of Cytochrome P-450. K. Ruckpaul, H. Rein. London, Taylor & Francis. **1**: 1-65.

Russo, M.; Teixeira, H. C.; Marcondes, M. C. G.; Barbuto, J. A. M. (1989). Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **22**: 1271-1273.

Saenger, P.; Rifkind, A. B.; New, M. I. (1976). Changes in drug metabolism in children with thyroid disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **42**: 155-159.

Sahoo, A.; Chainy, G. B. N. (1998). Acute hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in rat cerebral hemisphere. *Neurochem. Res.*, **23**(8): 1079-1084.

Saunders, D. S.; Harper, C. (1994). Pesticides. Principles and Methods of Toxicology. A. W. Hayes. New York, Raven Press: 389-415.

Seven, A.; Seymen, O.; Hatemi, S.; Hatemi, H.; Yigit, G.; Candan, G. (1996). Lipid peroxidation and vitamin E supplementation in experimental hyperthyroidism. *Clin. Chem.*, **42**(7): 1118-1119.

Seven, A.; Tasan, E.; Hatemi, H.; Burcak, G. (1999). The impact of propylthiouracil therapy on lipid peroxidation and antioxidant status parameters in hyperthyroid patients. *Acta Med. Okayama*, **53**(1): 27-30.

Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European J. Biochem.*, **215**: 213-219.

Sies, H.; de Groot, H. (1992). Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol. Lett.*, **64-65**: 547-551.

Sies, H.; Koch, O. R.; Martino, E.; Boveris, A. (1979). Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett.*, **103**: 287-290.

Sir, T.; Wolff, C.; R., S. J.; Perez, G.; Armas-Merino, R. (1987). Relationship between hepatic levels of glutathione and sulphobromophthalein retention in hyperthyroidism. *Clin. Sci.*, **73**: 235-237.

- Slater, T. F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, **222**: 1-15.
- Smith, A. C.; Berman, M. L.; James, R. C.; Harbinson, R. D. (1983). Characterization of hyperthyroidism enhancement of halothane-induced hepatotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **32**(23): 3531-3539.
- Stahl, W.; Sies, H. (1996). Lycopene: a biological important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.*, **331** (1): 1-9.
- Stevens, E. D. (1973). The evolution of endothermy. *J. Theor. Biol.*, **38**: 597-611.
- Strittmatter, P. (1965). NADH-cytochrome b₅ reductase. *Methods Enzymol.*, **10**: 561-565.
- Tanaka, K.; Kurihara, N.; Nakajima, M. (1979). Oxidative metabolism of tetrachlorocyclohexenes, pentachlorocyclohexenes, and hexachlorocyclohexenes with microsomes from rat liver and house fly abdomen. *Pest. Biochem. Physiol.*, **10**: 79-95.
- Tanizawa, H.; Sazuka, Y.; Takino, Y. (1981). Micro-determination of lipoperoxide in the mouse myocardium by thiobarbituric acid fluorophotometry. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**(10): 2910-2914.
- Tapia, G.; Cornejo, P.; Fernández, V.; Videla, L. A. (1999). Protein oxidation in thyroid hormone-induced liver oxidative stress: relation to lipid peroxidation. *Toxicol. Lett.*, **106**: 209-214.
- Tapia, G.; Pepper, I.; Smok, G.; Videla, L. A. (1997). Kupffer cell function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Rad. Res.*, **26**(3): 267-279.
- Tapia, G.; Troncoso, P.; Galleano, M.; Fernández, V.; Puntarulo, S.; Videla, L. A. (1998). Time course study of the influence of acute iron overload on Kupffer cell functioning and hepatotoxicity assessed in the isolated perfused rat liver. *Hepatology*, **27**: 1311-1316.
- Thomas, T. N.; Priest, D. G.; Zemp, J. W. (1976). Distribution of superoxide dismutase in rat brain. *J. Neurochem.*, **27**(1): 309-310.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, **27**: 502-522.
- Tiwari, R. K.; Bandyopadhyay, S. K.; Chatterjee, G. C. (1982). Protective effect of L-ascorbic acid in lindane intoxicated rats. *Acta Vitaminol. Enzymol.*, **4**(3): 215-220.

- Turrens, J. F.; Alexandre, A.; Lehninger, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**(2): 408-414.
- Turrens, J. F.; Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.*, **191**: 421-427.
- Urano, S.; Inomori, Y.; Sugawara, T.; Kato, Y.; Kitahara, M.; Hasegawa, Y.; Mitsuo, M.; Mukai, K. (1992). Vitamin E: inhibition of retinol-induced hemolysis and membrane-stabilizing behavior. *J. Biol. Chem.*, **267**(26): 18365-18370.
- Venditti, P.; Balestrieri, M.; Di Meo, S.; De Leo, T. (1997). Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J. Endocrinol.*, **155**: 151-157.
- Vesell, E. S.; Shapiro, J. R.; Passananti, T.; Jorgensen, H.; Shively, C. A. (1974). Altered plasma half-lives of antipyrine, propylthiouracil, and methimazole in thyroid dysfunction. *Clin. Pharm. Ther.*, **17**(1): 48-56.
- Videla, L. A.; Arisi, A. C. M.; Fuzaro, A. P.; Koch, O. R.; Junqueira, V. B. C. (2000). Prolonged phenobarbital pretreatment abolishes the early oxidative stress component induced in the liver by acute lindane intoxication. *Toxicol. Lett.*, **115**: 45-51.
- Videla, L. A.; Barros, S. B. M.; Junqueira, V. B. C. (1990). Lindane-induced liver oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, **9**: 169-179.
- Videla, L. A.; Sir, T.; Wolf, C. (1988). Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: supression by propylthiouracil treatment. *Free Rad. Res. Comms.*, **5**(1): 1-10.
- Videla, L. A.; Smok, G.; Troncoso, P.; Simon, K. A.; Junqueira, V. B. C.; Fernández, V. (1995). Influence of hyperthyroidism on lindane-induced hepatotoxicity in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **50**(10): 1557-1565.
- Videla, L. A.; Troncoso, P.; Arisi, A. C. M.; Junqueira, V. B. C. (1997). Dose-dependent effects of acute lindane treatment on Kupffer cell function assessed in the isolated perfused rat liver. *Xenobiotica*, **27**(7): 747-757.
- Villa, L. M.; Salas, E.; Darley-USmar, V. M.; Radomski, M. W.; Moncada, S. (1994). Peroxynitrite induces both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 12383-12387.
- Visser, T. J. (1996). Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta Med. Austriaca*, **23**(1-2): 10-16.
- Wagner, E. S.; Lindley, B.; Coffin, R. D. (1979). High-performance liquid chromatografic determination of ascorbic acid in urine. Effect on urinary excretion profiles after oral and intravenous administration of vitamin C. *Chromatography*, **163**: 225-229.

- Wanders, R. J. A.; Denis, S. (1992). Identification of superoxide dismutase in rat liver peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1115**: 259-262.
- Wardman, P.; von Sonntag, C. (1995). Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. *Methods Enzymol.*, **251**: 31-45.
- Williams, C. H.; Kamin, H. (1962). Microsomal Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.*, **237**: 587-595.
- Wink, D. A.; Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide, insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, **25**(4/5): 434-456.
- Winterbourn, C. C.; Vissers, M. C. M.; Kettle, A. J. (2000). Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hematol.*, **7**: 53-58.
- Winwood, P. J.; Arthur, M. J. P. (1998). Kupffer cells and endothelial cells. Liver growth and repair. A. Strain, A. M. Diehl. London, Chapman & Hall: 482-511.
- Woeber, K. A. (1977). Observations concerning the binding of L-triiodothyronine in the human polymorphonuclear leukocyte. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **44**: 62-68.
- Wood, M.; Berman, M. L.; Harbinson, R. D.; Hoyle, P.; Phythyon, J. M.; Wood, A. J. J. (1980). Halothane-induced hepatic necrosis in triiodothyronine-pretreated rats. *Anesthesiology*, **52**: 470-476.
- Yakes, F. M.; van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 514-519.
- Yamamoto, T.; Egashira, T.; Yamanaka, Y.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. (1983). Initial metabolism of gamma-hexachlorocyclohexane (γ -HCH) by rat liver microsomes. *J. Pharm. Dyn.*, **6**: 721-728.
- Zar, J. H. (1996). Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, Prentice Hall.
- Zhong, Z.; Connor, H. D.; Mason, R. P.; Qu, W.; Gao, W.; Lemasters, J. L. (1995). Role of Kupffer cells in reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**(3): 1512-1517.

8 Curriculum Vitae

1 DADOS PESSOAIS

Nome: Karin Argenti Simon Giavarotti
Naturalidade: São Paulo - Brasil
Data Nasc.: 10/10/1971

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

1. Primeiro grau concluído em 1985 na Escola de 1^o e 2^o graus São José, São Bernardo do Campo, SP.
2. Segundo grau concluído em 1989 no North Central High School, Indianapolis, IN, EUA.
3. Bacharelado em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, concluído no 2^o semestre de 1993.

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

1. Junqueira, VBC; Azzalis, LA;Barros, SBM; Simizu, K; Fuzaro, AP; Arisi, ACM; Simon, KA; Giavarotti, L; Fraga, C; Porta, EA. Hepatic effects of acute lindane treatment in rats chronically fed a high ethanol regimen relatively low in alpha-tocopherol. Biochem. Arch. 9: 157-174, 1993.
2. Azzalis, LA; Simon, KA; Giavarotti, L; Junqueira, VBC; Porta, EA. Absence of stimulation of hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) by chronic ethanol feeding in rats. Biochem. Arch. 10: 221-235, 1994.
3. Azzalis, LA; Junqueira, VBC; Simon, KA; Giavarotti, L; Silva, MA; Kogake, M; Simizu, K; Barros, SBM; Fraga, C; Porta, EA. Prooxidant and antioxidant hepatic factors in rats chronically fed an ethanol regimen and reated with an acute dose of lindane. Free Rad. Biol. Med. 19 (2): 147-159, 1995.
4. Videla, LA; Smok, G; Troncoso, P; Simon, KA; Junqueira, VBC; Fernández, V. Influence of hyperthyroidism on lindane-induced hepatotoxicity in the rat. Biochem. Pharmacol. 50 (10): 1557-1565.

5. Boveris, A; Llesuy, S; Azzalis, LA; Giavarotti, L; Simon, KA; Junqueira, VBC; Porta, EA; Videla, LA; Lissi, EA. In situ rat brain and liver spontaneous chemiluminescence after acute ethanol intake. *Toxicology Letters* 93: 23-28, 1997.
6. Giavarotti, KAS; Rodrigues, L; Rodrigues, T; Junqueira, VBC; Videla, LA. Liver Microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment. *Free Rad. Res.* 29: 35-42, 1998.

4 PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

1. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Caxambu, MG, de 1 a 4 de maio de 1993.
2. IV International Symposium on Orthomolecular Medicine, realizado em São Paulo, SP, de 16 a 17 de setembro de 1993.
3. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Caxambu, MG, de 14 a 17 de maio de 1994.
4. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Caxambu, MG, de 6 a 9 de maio de 1995.
5. V International Symposium on Orthomolecular Medicine, realizado em São Paulo, SP, de 20 a 22 de março de 1996.
6. XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, realizada em Caxambu, MG, de 21 a 24 de março de 1996.
7. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Caxambu, MG, de 3 a 6 de maio de 1997.
8. VI International Symposium on Orthomolecular Medicine, realizado em São Paulo, SP, de 13 a 15 de agosto de 1997. Participação com posters e apresentação oral: Hyperthyroidism Experimental Model: A Study on Liver Oxidative Stress and its Effect on Lindane Treatment.
9. Simpósio "Human DNA Repair Diseases: from Genomic Instability to Cancer", realizado em São Paulo, SP, de 12 a 14 de novembro de 1998.
10. IX Biennial Meeting International Society for Free Radical Research, realizado em São Paulo, SP, de 7 a 11 de setembro de 1998.

11. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Caxambu, MG, de 22 a 25 de maio de 1999.
12. 9th North American ISSX Meeting, realizado em Nashville, TN, USA, de 24 a 28 de outubro de 1999.
13. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, realizada em Caxambu, MG, de 27 a 30 de maio de 2000.

5 ATIVIDADES NA ÁREA DE ENSINO

1. Estágio como monitora na disciplina “Bioquímica Experimental” do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, USP, em nível de graduação, durante o 2o semestre de 1995.
2. Estágio como monitora na disciplina “Bioquímica – Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo” do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, USP, em nível de graduação, durante o 1o semestre de 1996.
3. Estágio como monitora na disciplina “Bioquímica Experimental” do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, USP, em nível de graduação, durante o 2o semestre de 1996.
4. Professora da disciplina “Bioquímica e Doenças”, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, USP, desenvolvida em 30 horas, no período de 11 a 15 de janeiro de 1999.
5. Professora da disciplina “Bioquímica e Doenças”, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, Unicamp, desenvolvida em 30 horas, no período de 26 a 30 de julho de 1999.

6 CURSOS DE APERFEIÇOAMENTO

1. Curso de Proteção Radiológica, organizado pela CIPA do Instituto de Química da USP em conjunto com a Divisão de Higiene, Saúde e Medicina do Trabalho (DHSMT-USP), ministrado no dia 4 de agosto de 1994.
2. Lesões Oxidativas em DNA – Mecanismos de Formação e Técnicas de Detecção, ministrado no Instituto de Química, USP, de 2 a 12 de maio de 1995.

3. LDL and Atherosclerosis International Training Course, ministrado no Instituto de Química, USP, de 25 a 27 de março de 1996.

9 Anexo