

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

**Alterações de Isoenzimas Citocromo P450 Hepáticas  
na Esquistossomose Mansônica Murina**

Antonio Augusto Fidalgo Neto

Rio de Janeiro

2001

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

**Alterações de Isoenzimas Citocromo P450 Hepáticas  
na Esquistossomose Mansônica Murina**

Antonio Augusto Fidalgo Neto

Dissertação Apresentada à Escola Nacional de  
Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz para  
Obtenção do Grau de Mestre em Saúde Pública –  
Área de Concentração em Toxicologia.

Rio de Janeiro

2001

## FICHA CATALOGRÁFICA

Fidalgo-Neto, Antonio Augusto

Alterações de Isoenzimas Citocromo P450 Hepáticas na Esquistossomose Mansônica Murina / Antonio Augusto Fidalgo Neto – 2001

xix, 135p.; il

1º Orientador: Francisco J.R. Paumgartten

2º Orientador: Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira

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

1. Esquistossomose mansônica murina. 2. Citocromos P450. I. Francisco Jose Roma Paumgartten. II. Fundação Oswaldo Cruz III. Alterações de Isoenzimas Citocromos P450 Hepáticas na Esquistossomose Mansônica Murina.

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO TOXICOLOGIA

**Alterações de Isoenzimas Citocromo P450 Hepáticas  
na Esquistossomose Mansônica Murina**

Antonio Augusto Fidalgo Neto

Orientadores:

Francisco José Roma Paumgarten  
Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira

Aprovada em 28 de Setembro de 2001 pela banca examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Luiz Felipe Ribeiro Pinto

Prof<sup>fa</sup>. Dr.<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Ana Elisa Xavier de Oliveira Dias

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

Rio de Janeiro  
2001

Aos meus Pais, Patrícia e Sália pela dedicação e carinho, e Luiza, que mesmo chegando agora, contribuiu de forma significativa para a realização desta importante etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores e Orientadores **Francisco Paumgarten** e **Ana Cecília de Oliveira**, pelo apoio e competência com que vêm orientando a minha carreira científica;

As grandes amigas **Rosângela Ribeiro** e **Vanilda**, pela dedicação, amizade e por terem dispensado horas na execução desta dissertação;

A grande equipe formada pelos estudantes **Dayse, Igor, Thiago e Aline**, pela dedicação na realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental, **Regina, Sandra, Isabella, Eduardo, Karen, Kátia, Flávia** e todos os outros estudantes, pelo companheirismo e cooperação demonstrados ao longo de toda a pesquisa;

Aos colegas do Departamento de Farmacologia e Farmacodinâmica/FIOCRUZ, por terem cooperado na utilização de equipamentos, durante a realização deste estudo;

Aos colegas **Humberto** e **Maria Aparecida** do Departamento de Imunobiológicos do INCQS/FIOCRUZ pela cooperação na realização dos experimentos;

A **Arnaldo Maldonado** e **Ângela Junqueira** do Departamento de Medicina Tropical – IOC/FIOCRUZ pelas valiosas sugestões ao longo dos experimentos preliminares;

Ao **Prof Luiz Felipe, Andréia, Wagner** e todos os colegas do Departamento de Bioquímica / UERJ pela orientação e cooperação fundamentais para a realização de parte dos experimentos;

Ao dedicado e grande amigo **Sérgio Kuriyama**, que mesmo longe, exerceu papel fundamental para a realização desta difícil tarefa;

Ao grande amigo **Augusto Tiaqui Abe** responsável pelo despertar de minha carreira científica;

Aos avós **Antonio Fidalgo** e **Aura** (*in memoriam*) cujo caráter e conduta impecáveis serviram como imagem a ser seguida em todos os momentos da minha vida;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

## **Lista de Figuras**

**Figura 4.1** – Análise da expressão de CYP2A5 por *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP2A5 de camundongos.

**Figura 4.2** – Análise da expressão de CYP2A5 no fígado de camundongos *Swiss Webster* por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP2A5 murino.

**Figura 4.3** – Análise da expressão de CYP2A5 no fígado de camundongos DBA/2 por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP2A5 murino.

**Figura 4.4** – Análise da expressão de CYP1A em fígado de camundongos DBA/2 por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP1A de ratos.

**Figura 4.5** – Análise da expressão de CYP1A em fígado de camundongos *Swiss Webster* por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP1A de ratos.

## **Lista de Gráficos**

**Gráfico 4.1** – Vermes adultos (*S. mansoni*) recuperados após perfusão do fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com 10 (lactentes) e 45 (adultos) dias de vida e sacrificados com 35, 55 e 90 dias da evolução da doença.

**Gráfico 4.2** – Número de ovos de *S. mansoni* no fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com 10 (lactentes) e 45 (adultos) dias de idade e sacrificados com 35, 55 e 90 dias da evolução da doença.

**Gráfico 4.3** – Número de ovos de *S. mansoni* no intestino de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com 10 (lactentes) e 45 (adultos) dias de idade e sacrificados com 35, 55 e 90 dias da evolução da doença.

**Gráfico 4.4** – Alterações da concentração total de citocromos P450 no fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

**Gráfico 4.5** – Atividade da Cumarina 7-hidroxilase na fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

**Gráfico 4.6** – Atividade da etoxiresorufina O-desetilase (EROD) em fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

**Gráfico 4.7** – Atividade da pentoxiresorufina-O-despenteilase (PROD) na fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

**Gráfico 4.8** – Atividade da benziloxiresorufina O-desbenzilase (BROD) na fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

## Lista de Tabelas

**Tabela 4.1** – Peso (g) dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 no dia da infecção. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.2** – Percentagem (%) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 controles (não-infectados) e infectados com *S. mansoni* que morreram durante o experimento. Os grupos experimentais foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.3** – Peso (g) dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 no dia do sacrifício. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.4** – Ganho ponderal (g) dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, dos diferentes grupos experimentais, entre o dia da infecção e o de sacrifício. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.5** – Índice de penetração (%) das cercárias de *S. mansoni* na infecção experimental de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, lactentes e adultos. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.6** – Número de vermes adultos (*S. mansoni*) recuperados em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.7** – Número de “casais” de vermes (*S. mansoni*) recuperados em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.8** – Número de ovos ( $\times 10^3$ ) de *S. mansoni* recuperados nos fígados de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.9** – Número de ovos de *S. mansoni* recuperados nos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 4.10** – Infecção experimental de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, com 10 dias de vida, com *S. mansoni* : Índice de penetração (%) das cercárias.

**Tabela 4.11** – Evolução ponderal de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni*: Peso corporal (g) nos dias da infecção (dia PN 10) e do sacrifício (dia PN 65) e ganho de peso ( $\Delta p$ ) (g).

**Tabela 4.12** – Alterações do peso absoluto (g) e relativo do fígado e baço em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

**Tabela 4.13** – Diminuição dos níveis totais de CYP hepáticos em camundongos, machos e fêmeas, *Swiss Webster* e DBA/2, infectados por *S. mansoni* em relação aos respectivos controles não infectados.

**Tabela 4.14** – Análise semi-quantitativa da expressão de CYP2A5 em fígado de camundongos infectados por *S.mansoni* (55 dias pós-infecção) e controles não-infectados.

**Tabela 4.15** – Análise semi-quantitativa da expressão de CYP1A em fígado de camundongos infectados por *S.mansoni* (55 dias pós-infecção) e controles não-infectados.

**Tabela 8.1** – Peso absoluto do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 8.2** – Peso relativo (%) do fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 8.3** – Peso absoluto do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 8.4** – Peso relativo (%) dos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias

de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 8.5** – Peso absoluto do baço (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

**Tabela 8.6** – Peso absoluto do baço (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 8.7** — Peso relativo (%) do baço de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

**Tabela 8.8** — Peso relativo (%) do baço de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

**Tabela 8.9** – Peso absoluto do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que

tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

**Tabela 8.10** – Peso absoluto dos intestinos (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

**Tabela 8.11** – Peso relativo (%) do fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

**Tabela 8.12** – Peso relativo (%) dos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

## Lista de Siglas e Abreviaturas

Ah: *Aryl hidrocarbon*

ANOVA: Análise de Variância

BROD: Benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase

BSA: Albumina Sérica Bovina

CECAL: Centro de Criação de Animais de Laboratório

CO: Monóxido de Carbono

CoH: Cumarina Hidroxilase

CYP: Citocromos P450

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DO: Densidade Óptica

*e.g.*: Por exemplo (*exempli gratia*)

EDTA: Edetado Dissódico de Cálcio

EROD: Etoxiresorufina-*O*-desetilase

*et al.*: e colaboradores (*et alii*)

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

HCl: Ácido Clorídrico

*i.e.*: isto é (*id est*)

*ip*: Intraperitoneal

kD: kilo Dalton

$K_m$ : Constante de Michaelis-Menten

mg: miligrama

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

ml: mililitro

mM: milimolar

NaCl: Cloreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

p/v: peso/volume

PB: Fenobarbital

Pmol: picomoles

PN: Pós-natal

PROD: Pentoxiresorufina-*O*-despentilase

PY: Pirazol

*qsp*: quantidade suficiente para

RNA<sub>m</sub>: Ácido Ribonucleico Mensageiro

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS/PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TBS: Solução tampão tris

TTBS: Solução tampão tris/Tween

v/v: volume/volume

$\Delta p$ : diferença de peso

$\mu$ l: microlitros

$\mu$ M: micromolar

## Resumo

Tem sido relatado que infecções e estímulos inflamatórios causam alterações da atividade e dos níveis de expressão de várias formas de citocromos P450 (CYP) hepáticos em animais de laboratório e em seres humanos. Estas alterações podem ter reflexos tanto no clearance de fármacos quanto na ativação metabólica de pró-mutágenos, pró-carcinógenos e pró-teratógenos. Assim sendo, infecções e processos inflamatórios estão entre os fatores que modulam a atividade ou a expressão dos CYP e podem alterar a cinética e a toxicidade de xenobióticos.

Situado neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da infecção com *S. mansoni* sobre o conteúdo total de citocromos P450, as atividades de isoenzimas das subfamílias 1A, 2A e 2B, e os níveis de CYP1A e 2A5 na fração microsossomal hepática de camundongos das linhagens *Swiss Webster* e *DBA/2*.

Em estudo preliminar avaliamos a evolução da esquistossomose murina em *Swiss Webster* e *DBA/2* comparando dois modelos de infecção experimental: animais infectados com 100 cercárias aos 10 dias de vida (lactentes) ou na vida adulta (45 dias de vida). Foram determinados o peso corporal e de órgãos (fígado, baço e intestinos), o ganho ponderal, o índice de penetração das cercárias, a mortalidade, a taxa de recuperação de vermes após perfusão sistêmica e o número de ovos encontrados no fígado e intestinos. Grupos infectados de animais foram sacrificados aos 35, 55 e 90 dias após a infecção.

No estudo subsequente voltado para avaliação dos efeitos da infecção sobre a atividade das diferentes isoenzimas CYP utilizamos camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, infectados aos 10 dias de idade (lactentes) e sacrificados após 55 dias da infecção. Após o sacrifício por deslocamento cervical e preparação da fração microsossomal hepática, determinamos o conteúdo total de CYP, as atividades de cumarina 7-hidroxilase (CoH), etoxiresorufina *O*-desetilase (EROD), pentoxiresorufina *O*-despentilase (PROD) e benziloxiresorufina *O*-desbenzilase (BROD). Avaliamos também os níveis de CYP1A e 2A5 por SDS/PAGE e *Western blotting* utilizando anticorpos policlonais anti-CYP1A de ratos e anti-2A5 de camundongos, obtidos a partir da inoculação em coelhos. Os resultados obtidos mostraram que 55 dias após a infecção com *S. mansoni* o conteúdo total de CYP estava na fração microsossomal hepática estava substancialmente diminuído nas duas linhagens e nos dois sexos. As atividades de EROD, PROD e BROD estavam, de um modo geral, reduzidas em relação aos controles não infectados nas duas linhagens e sexos.

Contrastando com esta depressão de atividade de isoenzimas CYP1A e 2B, as atividades de CoH nos camundongos da linhagem *DBA/2* estavam aumentadas nos machos infectados. Nas fêmeas observamos também uma tendência ao aumento (estatisticamente não-significativa) em relação aos não infectados. Este efeito da infecção sobre a atividade de CoH não foi observado nos *Swiss Webster*, mas é possível que nesta linhagem a hidroxilação da cumarina não seja catalisada por CYP2A5.

Em síntese os resultados do presente estudo indicam que na fase intermediária de evolução da esquistossomose mansônica murina (55 dias pós infecção) há uma acentuada diminuição dos níveis totais de CYP e de atividades relacionadas as subfamílias CYP1A e CYP2B. Por outro lado, contrastando com esta depressão generalizada de CYPs, há um claro aumento de CoH, relacionada ao CYP2A5 nos *DBA/2* infectados.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vi
.....	vii
Lista de Gráficos.....	viii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xv
1 – Introdução.....	1
1.1 – Citocromos P450.....	1
1.1.1 – Características Gerais.....	1
1.1.2 – Estrutura Básica.....	4
1.1.3 – Mecanismo geral de catálise.....	5
.....	6
1.1.4 – Nomenclatura.....	6
1.2 – Famílias e Subfamílias.....	7
1.2.1 – CYP1A.....	7
1.2.2 – CYP2A.....	8
1.2.3 – CYP2B.....	10
1.3 – Alterações dos Citocromos P450 na Infecção e Inflamação.....	12
1.4 – Modelo Experimental.....	14
1.4.1 – Noções Gerais.....	14
1.4.2 – Imunopatologia.....	16
2 - Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1 Estudo Preliminar - Infecção de camundongos por <i>Schistosoma mansoni</i> : Influência da linhagem e da idade do hospedeiro.....	22
3.1.1 – Animais.....	22
3.1.2 - Grupos experimentais.....	22
3.1.3 – Acasalamento.....	24
3.1.4 – Infecção.....	24
3.1.4.1 – Infecção de Camundongos Adultos.....	25

3.1.4.2 – Infecção de Camundongos Lactentes.....	25
3.1.5 – Recuperação de Vermes.....	25
3.1.6 – Contagem de Ovos.....	26
3.2 Avaliação das atividades de CYP em fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	27
3.2.1 – Animais.....	27
3.2.2 – Grupos.....	27
3.2.3 – Infecção.....	27
3.2.4 - Sacrifício e armazenamento dos órgãos.....	28
3.2.5 - Preparação da fração microsossomal.....	28
3.2.6 - Determinação da concentração de proteínas na fração microsossomal.....	29
3.2.7 – Quantificação dos níveis totais de citocromos P450 .....	30
3.2.8 – Determinações de atividade de enzimas CYP na fração microsossomal hepática .....	31
3.2.8.1 - Determinação da atividade da Cumarina-7-hidroxilase (CoH).....	31
3.2.8.2 - Determinação da atividade das resorufina-O-desalquilases: Benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD), Etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e Pentoxiresorufina-O-despentilase (PROD).....	33
3.2.9 – Determinação semiquantitativa de apoproteínas CYP por Western Blotting..	34
3.2.9.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE).....	34
3.2.9.2 – Immunoblotting (Western blotting).....	37
3.2.10 – Análise estatística.....	38
3.2.11 – Soluções, Padrões, Substratos, Sistema Regenerador de NADPH e outras Substâncias utilizadas neste trabalho.....	39
3.2.11.1 - Soluções.....	39
3.2.11.2 - Padrões.....	45
3.2.11.3 - Substratos .....	46
3.2.11.4 - Sistema Regenerador de NADPH.....	47
3.2.11.5 - Substâncias.....	49
4 – Resultados.....	51

4.1- Evolução da esquistossomose em camundongos: Influência da linhagem e da idade em que os animais foram infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> .....	51
4.1.1 – Mortalidade e alterações de peso corporal.....	51
4.1.2 – Índice de Penetração das Cercárias de <i>S. mansoni</i> na Infecção Experimental de Camundongos Swiss Webster e DBA/2.....	57
4.1.3 – Número de Vermes Recuperados.....	58
4.1.4 – Número de ovos encontrados no fígado e nos intestinos.....	61
4.1.5 – Conclusões .....	68
4.2 – Alterações de CYP das subfamílias 1A, 2A e 2B no fígado de camundongos 55 dias após a infecção com <i>S. mansoni</i> .....	71
4.2.1 – Infecção de camundongos Swiss Webster e DBA/2 aos 10 dias de vida: Índice de penetração das cercárias de <i>S. mansoni</i> .....	71
4.2.2 - Alterações do peso corporal e dos pesos do fígado e baço em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .....	72
4.2.3 – Alterações dos níveis totais de citocromos P450 no fígado.....	74
4.2.4 – Expressão das apoproteínas CYP2A5 e CYP1A no fígado de camundongos controles e infectados com <i>S.mansoni</i> avaliada por meio de Western Blotting.....	80
4.2.4.1 – CYP2A5.....	80
4.2.4.2 – CYP1A.....	83
4.2.5 – Determinação das atividades da Cumarina-O-Hidroxilase.....	86
4.2.6 – Determinação das atividades das resorufina-O-desalquilases.....	87
4.2.6.1 – Atividade de etoxiresorufina-O-desetilase (EROD).....	88
4.2.6.2 – Atividade da pentoxiresorufina-O-despentilase (PROD) e da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD).....	90
5 – Discussão.....	94
5.1 Análise de variáveis associadas ao modelo experimental de esquistossomose mansônica. Efeitos da linhagem dos camundongos, do sexo, da idade em que foram infectados, e do tempo de evolução da doença após a infecção.....	94
5.2 Estudo das alterações de isoenzimas CYP observadas no fígado de camundongos DBA/2 e Swiss Webster 55 dias após a infecção com <i>S.mansoni</i> .....	98
6 – Conclusões.....	108

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8 – Anexo.....	120
8.1 – Experimento preliminar: Peso do fígado, dos intestinos e do baço.....	120



# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 – Citocromos P450

### 1.1.1 – Características Gerais

Os citocromos P450 são enzimas envolvidas na metabolização de uma ampla variedade de substâncias químicas estranhas ao organismo (xenobióticos) ou endógenas. Os genes que codificam estas proteínas constituem uma complexa superfamília (CYP) à qual pertencem mais de 504 isoformas já identificadas e seqüenciadas. As proteínas citocromo P450 já foram encontradas na maioria dos organismos vivos, animais e vegetais, de protistas até o homem (Lewis *et al.*, 1998).

Quase todos os tecidos de mamíferos contêm citocromos P450 que, dentro da célula, localizam-se predominantemente no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias. Algumas isoformas P450 são razoavelmente específicas para determinados substratos - *e.g.*, citocromos esteroidogênicos. Entretanto, muitas isoformas, particularmente aquelas localizadas no retículo endoplasmático, catalisam uma diversidade de reações químicas e metabolizam uma ampla gama de substratos endógenos e xenobióticos (substâncias químicas não-nutrientes, estranhas ao organismo) (Coon, 1992).

As reações catalisadas por CYPs estão primordialmente associadas aos processos de eliminação (desintoxicação) de xenobióticos lipofílicos, mas participam também da síntese de substâncias químicas biologicamente ativas, como esteróides e prostaglandinas, e do catabolismo de substâncias endógenas - *e.g.*, catabolismo renal do ácido araquidônico (Lewis, 1998; Nelson, 1999; Omura, 1999).

Se não fossem biotransformados os xenobióticos lipofílicos (*i.e.* com alto coeficiente de partição lipídio:água) tenderiam a permanecer e a se acumular no organismo, já que os meios de eliminação são principalmente aquosos (*e.g.* urina).

As reações de biotransformação podem ser esquematicamente divididas em 2 fases: a fase I, em que grupos funcionais são introduzidos ou expostos na molécula original (*e.g.* reações de redução, oxidação e hidrólise) e a fase II, em que ocorrem reações de

conjugação dos metabólitos oriundos da fase I com substratos endógenos, tais como sulfatos inorgânicos, aminoácidos, ácido glicurônico e glutatona. As reações de conjugação facilitam o transporte e a eliminação destes metabólitos pelas vias renal e biliar. Embora, via de regra, já haja um ganho de hidrossolubilidade na fase I, é na conjugação (fase II) que ocorre o principal acréscimo neste sentido. Típicamente as reações de fase I precedem as conjugações de fase II, mas também neste aspecto podem haver exceções.

Os citocromos P450 destacam-se entre os vários sistemas enzimáticos envolvidos na catálise das reações de fase I.

A oxidação de xenobióticos lipofílicos catalisada por CYP é, em geral, considerada como etapa necessária para eliminação do organismo e portanto para a desintoxicação. Em alguns casos, entretanto, a oxidação de xenobióticos por CYP pode produzir metabólitos mais reativos que a molécula (substrato) original. Quando a biotransformação dá origem a metabólitos que se ligam à proteínas e ácidos nucleicos, causando citotoxicidade e genotoxicidade, diz-se que ocorreu 'ativação metabólica' (Omura, 1999).

Os citocromos P450 podem ser divididos em 4 classes - I, II, III e IV - dependendo de como os elétrons de NADPH são doados para o sítio catalítico. Os CYP da classe I necessitam tanto de uma redutase contendo FAD, quanto de uma redoxina contendo ferro e enxofre, como doadores de elétrons. As enzimas de classe II necessitam apenas de uma flavoproteína para a transferência dos elétrons, a NADPH-citocromo P450 redutase. As moléculas de classe III são auto-suficientes e, portanto, não necessitam de doadores de elétrons. Os CYP de classe IV recebem elétrons diretamente do NADPH (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Há um doador de elétrons adicional, o citocromo b5, ancorado ao retículo endoplasmático pela sua porção carboxi-terminal, que transfere elétrons do NADPH e tem como função estimular a atividade CYP.

Os CYP de procariotos são proteínas solúveis que, freqüentemente, possuem a habilidade de catabolizar substâncias químicas utilizadas como fonte de carbono, e de desintoxicar xenobióticos. Outras funções conhecidas de CYP em procariotos, incluem o metabolismo de ácidos graxos e a biossíntese de antibióticos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Enzimas CYP de classe I de células eucarióticas são encontradas associadas a membranas mitocondriais e catalisam diversas reações envolvidas na biossíntese de hormônios esteróides e da vitamina D<sub>3</sub> em mamíferos. Estas enzimas de classe I mitocondriais também são encontradas em insetos e nematódeos, mas até hoje nenhuma delas foi descrita em plantas.

As enzimas de classe II são as mais comuns nos eucariotos. Diferentemente do que ocorre com enzimas de classe II de procariotos, nos eucariotos, o CYP e a NADPH CYP-redutase não estão fundidos, mas sim dissociados e ancorados, independentemente, pelas âncoras amino-terminais hidrofóbicas, na face externa do retículo endoplasmático (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

As funções das enzimas de classe II são extremamente diversificadas. Em fungos, estas enzimas catalizam a síntese de esteróides de membrana e micotoxinas, e, além disso, estão envolvidas na metabolização de fitoalexinas e lipídeos. Em animais, as enzimas de classe II participam da biossíntese e do catabolismo das moléculas de sinalização, de hormônios esteróides, do ácido retinóico e de oxilipinas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). As enzimas CYP de classe I e II de todos os organismos participam de reações de desintoxicação e, em alguns casos, da ativação metabólica de xenobióticos. Estas enzimas, participam portanto da cadeia de elos envolvidos na carcinogênese química (ativação metabólica de pró-carcinógenos), e são determinantes também do metabolismo, da tolerância, da seletividade e da compatibilidade de drogas e pesticidas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Os CYP que metabolizam xenobióticos são, com frequência, induzíveis pela exposição prévia ao substrato ou a outras substâncias exógenas.

Os CYP foram inicialmente descritos em fígado de mamíferos, onde são particularmente abundantes e cumprem papel essencial no metabolismo de xenobióticos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

### ***1.1.2 – Estrutura Básica***

As enzimas CYP possuem como grupo prostético o heme ou ferro-protoporfirina IX, com o átomo de ferro em posição central em um sulco hidrofóbico da apoproteína acessível ao substrato.

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

Poucas regiões das enzimas CYP se mantêm conservadas de forma absoluta. Na verdade, a identidade na seqüência de aminoácidos entre as proteínas P450 é, com freqüência, extremamente baixa - podendo ser inferior a 20% (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). A maior conservação estrutural é encontrada no cerne da proteína, ao redor do heme, e reflete um mecanismo comum de transferência de elétrons e prótons e de ativação de oxigênio. As regiões mais variáveis estão associadas ao ancoramento das regiões amino-terminais ou ao direcionamento das proteínas ligadas às membranas, ou ainda ao reconhecimento e à ligação ao substrato. Estas regiões associadas ao reconhecimento de substratos e à ligação destes, estão localizadas próximas ao canal de acesso do substrato e ao sítio de catálise, sendo freqüentemente referidas como sítios de reconhecimento do substrato ou SRSs (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Segundo Lewis (1996), há diferenças significativas nos 20-40 resíduos das regiões N- e C-terminais que parecem características das diferentes isoformas de CYP, e que podem ter reflexos na variação da especificidade aos substratos. Não obstante, o grau de homologia da seqüência

primária é um determinante importante para a classificação das diferentes isoenzimas CYP (Nelson *et al.*, 1993).

A maioria dos CYP, quando separados em bandas distintas por eletroforese em gel com SDS, segundo o peso molecular, situam-se em uma região compreendida entre 46 e 57 kDA. No entanto, outras enzimas como a epóxido hidrolase e a flavina monooxigenase também podem estar compreendidas nesta mesma região de peso molecular (Lewis, 1996).

### ***1.1.3 – Mecanismo geral de catálise***

A catálise por CYP, envolvendo hidrocarbonetos e ocorrendo em temperaturas fisiológicas, dizem respeito a reações estereo-específica e região-específica. Na ausência de catálise, tais reações exigiriam altas temperaturas, e seriam inespecíficas. Muitos detalhes dos mecanismos pelos quais CYP catalisam vários tipos de reações, especialmente as mais complexas que ocorrem em plantas, ainda são desconhecidos. O aspecto mais estudado, comum à maioria dos CYP, é a ativação do oxigênio.

O centro ativo para a catálise é a ferro-protoporfirina IX (heme) e a seqüência catalítica envolve 4 etapas (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). A primeira delas é a ligação da enzima ao substrato, o que ocorre rapidamente, deslocando o sexto ligante (solvente), e provocando alterações espectrais, no estado de "spin" e no potencial redox da hemeoproteína (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Acredita-se que a ligação dos CYP aos substratos provoque uma alteração na conformação da enzima que desencadearia a interação com o componente redox (Lewis, 1996). A segunda etapa é a redução do complexo CYP-substrato para o estado ferroso, gerenciada pelo aumento do potencial redox que ocorre na primeira etapa. A terceira etapa é a ligação do oxigênio molecular ao complexo enzima-substrato, formando o complexo superóxido. A quarta etapa consiste de uma segunda redução, o que leva a formação de espécies ativadas de oxigênio (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Já foram relatadas também outras funções catalíticas para vários citocromos P450, diferentes das transferências de oxigênio. Algumas dessas reações atípicas, que dependem de CYP, são oxidações onde há clivagens de pontes C-C ou C=N ou reduções. Outras reações como desalquilação, desidratação, desidrogenação, isomerização e dimerização

parecem ser surpreendentes para tais hemoproteínas. O tipo de reação catalisada é gerenciado pelas regiões menos conservadas da proteína e, portanto, não é ainda bem compreendido (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). Assim, a propriedade comum a todos os citocromos P450 descobertos até agora, não é ativar o oxigênio nem transferir um de seus átomos de oxigênio para os substratos. A única propriedade comum a todos os CYP é a máxima absorvância a 450 nm do complexo formado pelo heme em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e o monóxido de carbono (CO) (Mansuy, 1998; Omura & Sato, 1964).

#### ***1.1.4 – Nomenclatura***

A nomenclatura da superfamília CYP é decorrência de uma análise sistemática de suas características moleculares e evolutivas. O sistema está baseado no fato de que o grau de identidade entre as seqüências de duas enzimas diminui de acordo com a maior distância evolutiva do seu ancestral comum, *i.e.*, quando duas enzimas diferem pouco em suas seqüências de aminoácidos (*e.g.*, CYP2B1/CYP2B2), elas possuem um alto grau de similaridade estrutural/funcional, e de modo contrário, quando apresentam acentuadas diferenças em suas seqüências peptídicas, a similaridade é baixa e, dificilmente, estarão estrutural e funcionalmente correlacionadas.

O sistema corrente de nomenclatura de CYP foi proposto por Nebert *et al.*, 1991. Enzimas que apresentam mais de 40% de similaridade são agrupadas na mesma família que é indicada por um algarismo arábico (*e.g.*, CYP1). Aquelas que possuem mais de 55% de similaridade em suas seqüências são agrupadas na mesma subfamília que é representada por uma letra após o número arábico indicativo da família (*e.g.*, CYP1A). Cada membro da subfamília (isoenzima) é representado por um outro número arábico que vem em seguida à letra indicativa da subfamília (*e.g.*, CYP1A2). Quando em itálico, a sigla refere-se ao gene que codifica a proteína em questão (*e.g.*, *CYP1A2*). Por convenção, números relativos à família menores que 100 são reservados para enzimas provenientes de organismos eucarióticos, e aqueles maiores que 100 caracterizam enzimas oriundas de microorganismos procarióticos.

A famílias CYP1, CYP2 e CYP3 estão frequentemente associadas à biotransformação de xenobióticos. Podem ocorrer diferenças nas propriedades catalíticas e

na regulação, entre os membros de diferentes subfamílias e entre os membros de uma mesma subfamília. Além disso, em um determinado tecido podem estar presentes formas distintas de CYP que, na maioria das vezes, podem diferir das encontradas em outros tecidos (Guengerich & MacDonald, 1990).

## **1.2 – Famílias e Subfamílias**

### ***1.2.1 – CYP1A***

A família CYP1 é composta por duas subfamílias, CYP1A e CYP1B. A última foi descoberta recentemente, pouco se conhecendo sobre as suas propriedades funcionais e estruturais. Os cDNAs e genes destes dois membros já foram isolados em várias espécies, como camundongo, rato, coelho e no homem.

Os dois membros da subfamília CYP1A (CYP1A1 e CYP1A2) compartilham uma alta similaridade em suas estruturas primárias, bem como em suas características físico-químicas (Kawajiri & Hayashi, 1996).

Até o momento, dez espécies moleculares de CYP1A1 (de peixes a mamíferos) foram clonados e seqüenciados. No camundongo, CYP1A1 é constituído de 524 aminoácidos. O CYP1A1 de camundongo tem um peso molecular de 59,2 kDa, enquanto no rato o peso molecular é de 59,4 kDa. A isoenzima CYP1A1 de ambas as espécies, quando comparada à proteína humana, mostra uma similaridade de 79%. A isoenzima CYP1A2 de rato e a de camundongo possuem 513 aminoácidos e os pesos moleculares iguais a 58,2 kDa. Quando comparadas, as duas isoformas, CYP1A1 e CYP1A2, apresentam um percentual de similaridade de aproximadamente 71% em camundongos e 69% em ratos (Kawajiri & Hayashi, 1996).

A conservação evolutiva da subfamília CYP1A até mamíferos, sugere que esta subfamília tem uma importante função no metabolismo de xenobióticos. Existem inúmeros relatos a respeito do papel da subfamília CYP1A em várias funções metabólicas, incluindo mutagênese ou carcinogênese em animais experimentais. CYP1A1 e CYP1A2 possuem especificidades distintas para os substratos; no entanto, em algumas ocasiões, há uma certa superposição. A subfamília CYP1A está envolvida no metabolismo oxidativo

de substâncias exógenas como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas heterocíclicas e aminas aromáticas (Lewis, 1996).

As duas formas da subfamília CYP1A são induzidas pelo 3-metilcolantreno,  $\beta$ -naftoflavona, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Ioannides & Parke, 1990). Embora a regulação da transcrição destes dois genes, *CYP1A1* e *CYP1A2*, seja mediada por mecanismos comuns, como a ativação do receptor Ah em resposta a indutores, diversas diferenças têm sido observadas quanto a inducibilidade. O isosafrole, por exemplo, indutor seletivo de CYP1A2 hepático, tem efeito discreto sobre CYP1A1 (Kawajiri & Hayashi, 1996).

A distribuição tecidual dos níveis de expressão de mRNAs e proteínas, em animais induzidos, difere entre CYP1A1 e CYP1A2. CYP1A1 se expressa no fígado, mas é, encontrado em vários tecidos extra-hepáticos, como pulmão e rim. Por outro lado, a expressão de CYP1A2 parece estar limitada ao fígado. Em seres humanos, CYP1A1 parece ser enzima primariamente extra-hepática, uma vez que grandes quantidades de mRNA e proteínas foram detectadas nos pulmões, linfócitos e placenta de fumantes ativos, enquanto na maioria desses indivíduos os níveis hepáticos de mRNA e proteínas tenham sido indetectáveis (Kawajiri & Hayashi, 1996).

### **1.2.2 – CYP2A**

A subfamília CYP2A contém ao menos 12 membros distintos. CYP2A1, CYP2A2 e CYP2A3 são encontrados em ratos; CYP2A4, CYP2A5 e CYP2A12 em camundongos; CYP2A6 e CYP2A7 no homem; CYP2A8 e CYP2A9 em hamsters, e CYP2A10 e CYP2A11 em coelhos. Mesmo com 55% de homologia entre as proteínas, estas isoformas variam, consideravelmente, quanto a regulação, especificidade para o substrato, distribuição tecidual, ontogenia, indução e inibição (Chang & Waxman, 1996).

CYP2A5 foi isolado a partir de fígado de camundongos DBA/2J e C57BL/6N tratados com fenobarbital e, após tratamento com pirazol, em fígados de camundongos DBA/2N. CYP2A4 e CYP2A5 possuem 494 aminoácidos e diferem entre si por apenas 11 aminoácidos. Mesmo sendo alta a similaridade entre suas estruturas primárias, CYP2A4 e CYP2A5 apresentam admiráveis diferenças em suas especificidades para substrato.

CYP2A4 é capaz de hidroxilar a testosterona, a progesterona e a androstenediona na posição 15 $\alpha$ , enquanto CYP2A5 não possui esta capacidade catalítica. Por outro lado, CYP2A5 é capaz de 7-hidroxilar a cumarina, reação esta que não é catalisada por CYP2A4. Quando na enzima CYP2A5, a fenilalanina na posição 209 é substituída por leucina, esta enzima adquire a capacidade de 15 $\alpha$ -hidroxilar os esteróides, sugerindo que o resíduo 209 está localizado no sítio de ligação ao substrato ou próximo a ele. O resíduo na posição 209 é crítico para a determinação da especificidade destes CYP pelo substrato (Negishi *et al.*, 1996).

A atividade da cumarina-7-hidroxilase é um excelente marcador para CYP2A5, já que anticorpos anti-CYP2A5 inibem quase completamente (mais de 99%) esta atividade em microsomos hepáticos isolados de camundongos machos e fêmeas das linhagens DBA/2 e AKR não tratados, e tratados com fenobarbital ou pirazol. Por outro lado, as atividades microsomais hepáticas de 7-etoxicumarina-*O*-desetilase, anilina 4-hidroxilase, etilmorfina *N*-desmetilase, benzo[*a*]pireno 3-hidroxilase e pentoxiresorufina-*O*-despentilase não constituem marcadores úteis para o CYP2A5 hepático (Lang *et al.*, 1989).

O metabolismo da cumarina é geneticamente regulado pelo gen *CYP2a-5* (anteriormente denominado *Coh*) no cromossomo 7 do camundongo e apresenta diferenças marcantes entre linhagens distintas. No camundongo da linhagem DBA/2, é alta a atividade de cumarina-7-hidroxilase, sendo esta consideravelmente menor nas linhagens AKR/J, C57BL/6N, C3H/HeJ e BALB/c (Iersel *et al.*, 1993). CYP2A5 apresenta, além da grande variação de atividade enzimática entre as linhagens, uma expressão sexo-específica, observando-se, em geral, uma maior atividade nas fêmeas. A expressão de CYP2A4 e CYP2A5 é predominante em fígado de fêmeas; em machos, o rim é o órgão responsável pela expressão de CYP2A4 e, no rim de fêmeas, apenas CYP2A5 está presente (Pearce *et al.*, 1992). Os mecanismos hormonais para estas diferenças sexo-relacionadas da expressão de CYP2A5, bem como outros fatores responsáveis pela sua variação, ainda não são conhecidos (Chang & Waxman, 1996).

Enquanto CYP2A4 é relativamente resistente à indução, CYP2A5 é induzível por um grande número de substâncias estruturalmente diversas. O tratamento com pirazol aumenta a atividade da cumarina 7-hidroxilase. Esta capacidade de resposta a indutores depende da linhagem, sexo e idade do animal (Chang & Waxman, 1996).

CYP2A5 e seu ortólogo no homem (CYP2A6) metabolizam diferentes substratos e fármacos diversos como cumarina, halotano e losigamona. CYP2A5 também atua no metabolismo de substâncias tóxicas como nitrosaminas, aflatoxinas e nicotina (Posti *et al.*, 1999). CYP2A6, no homem, é capaz de catalisar a hidroxilação de drogas usadas no tratamento do câncer, como a ciclofosfamida e a ifosfamida. Além disso, CYP2A6 pode contribuir para a ativação de diversos pro-carcinógenos e pro-mutágenos, especialmente as nitrosaminas (Chang & Waxman, 1996).

As isoformas da subfamília CYP2A de roedores não são modelos apropriados para CYP2A6 em seres humanos. Diferenças dramáticas são observadas entre as isoenzimas de ambas as espécies, no que diz respeito à atividade catalítica, resposta à indutores (pirazol induz CYP2A5, mas não induz CYP2A6) e inibidores. Neste sentido, primatas não humanos parecem ser modelos experimentais mais adequados para a carcinogênese relacionada a CYP2A6 de seres humanos (Chang & Waxman, 1992).

### **1.2.3 – CYP2B**

A subfamília 2B é geralmente reconhecida como sendo aquela à qual pertencem isoenzimas induzidas pelo fenobarbital. Entretanto, além da acentuada capacidade de indução da subfamília CYP2B, o fenobarbital também induz respostas pleiotrópicas, observadas na maioria das espécies animais. A indução de CYP2B também é observada em ratos expostos a outros xenobióticos estruturalmente diferentes do fenobarbital. Estes xenobióticos incluem pesticidas halogenados, uma ampla variedade de agentes farmacêuticos, substâncias produzidas em plantas, hidrocarbonetos voláteis como cetonas, xilenos e piridina, e várias bifenilas polihalogenadas (Nims & Lubet, 1996).

Isoenzimas da subfamília CYP2B apresentam grande diversidade quanto aos seus substratos e o grau de especificidade por substratos varia de acordo com a espécie, linhagem, sexo, entre outros aspectos. Aminopirona, etilmorfina e zoxazolamina são substratos utilizados como provas catalíticas para CYP2B, mas não são totalmente específicos sendo também metabolizados por outros CYP. No rato, a testosterona (que é hidroxilada na posição 16 $\beta$ ) é considerada um substrato de alta especificidade para CYP2B. No entanto, não é prova útil para seres humanos e camundongos, já que nessas

duas espécies outros CYP também catalisam esta reação de hidroxilação. Já foi demonstrado que duas alcoxifenoxazonas, pentoxiresorufina e benziloxiresorufina, são substratos relativamente específicos CYP2B em ratos, camundongos e coelhos, e pouco específicos em hamsters e seres humanos (Nerukar *et al.*, 1993; Nims & Lubet, 1996).

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

CYP2B tem sido intensamente estudado em ratos. Algumas isoformas de CYP2B são conhecidas nesta espécie (*e.g.* CYP2B1, CYP2B2 e CYP2B3) (Nelson *et al.*, 1993). Embora CYP2B1 e CYP2B2 apresentem 91% de similaridade entre si, as formas de expressão e a regulação das duas isoenzimas são diferentes. CYP2B1 é altamente induzível pelo fenobarbital, enquanto CYP2B2 é constitutiva e apenas moderadamente induzível. CYP2B3 apresenta 77% de homologia com CYP2B1 e CYP2B2, sendo fracamente induzível. No homem, dois ortólogos para CYP2B de rato são conhecidos, CYP2B6 e CYP2B7, expressos no fígado e pulmões, respectivamente. CYP2B6 e CYP2B7 humanos possuem 76% e 93 % de homologia com CYP2B1 de rato, respectivamente (Lewis, 1996).

Dezesseis genes *CYP2B* relacionados já foram identificados em fígado de camundongos. Não se sabe ainda, no entanto, quais destes genes são ativos (Honkakoski *et al.*, 1992). Honkakoski e colaboradores (1992) identificaram nesta espécie duas isoenzimas, CYP2B9 e CYP2B10. Mesmo com 83% de homologia entre si, tais isoformas apresentam grandes diferenças em sua regulação. CYP2B9 é constitutiva e fracamente induzível, sendo controlada estritamente por hormônios. Por outro lado, CYP2B10 é altamente induzível pelo fenobarbital, é controlada pelos hormônios sexuais e é a primeira isoenzima induzida por substâncias químicas como clordano e por bifenilas halogenadas (Leighton & Kemper, 1984; Yoshioka *et al.*, 1990).

CYP2B10 possui 95% de similaridade com CYP2B1 quanto a seqüência de aminoácidos e CYP2B9, 80 a 85% de similaridade com a mesma isoforma (Nims & Lubet, 1996).

Além de CYP2B9/10, os camundongos expressam CYP2B12, com 85% de similaridade, e encontrada apenas nas glândulas sebáceas (Friedberg *et al.*, 1992). Recentemente, Nelson (1999) em sua revisão listou mais 3 isoenzimas - CYP2B13, CYP2B19 e CYP2B20 - ainda pouco estudadas.

Baseado em análises genéticas, pode-se dizer que esta (CY2B) é uma das maiores subfamílias da superfamília CYP (Honkakoski *et al.*, 1992).

### **1.3 – Alterações dos Citocromos P450 na Infecção e Inflamação**

Tem sido observado que, em seres humanos e em animais de laboratório, infecções e estímulos inflamatórios causam alterações das atividades e dos níveis de expressão de várias isoformas de CYP no fígado, rins e cérebro. A depuração (*clearance*) de muitos fármacos depende do metabolismo hepático e da atividade dos CYP. Por outro lado, algumas drogas (pró-drogas) são convertidas pelos CYP em metabólitos farmacológica e toxicologicamente ativos (ativação metabólica). Assim sendo, os fatores que modulam a atividade ou a expressão dos CYP afetam também - favorável ou negativamente - os efeitos terapêuticos e tóxicos dos fármacos. Digno de nota também é o fato dos CYP catalisarem a formação de metabólitos biologicamente ativos a partir de substratos endógenos. Neste sentido, a modulação da formação destes metabólitos pela inflamação ou pela infecção poderia também estar relacionada a mecanismos homeostáticos e fisiopatológicos envolvidos nestas condições (Morgan, 1997).

Os efeitos da inflamação e infecção sobre CYP estão relacionados à resposta imune celular. A ativação do sistema retículo endotelial em animais de experimentação compromete o metabolismo de drogas *in vivo* e diminui a capacidade metabolizadora dos microsossomos hepáticos. É conhecido que vários agentes que estimulam este sistema prolongam o tempo de sono barbitúrico em animais de laboratório (Morgan, 1997).

Em animais, infecções por vírus (Renton, 1986; Brattsten, 1987), bactérias (Batra, 1987; Azri, 1991) ou parasitas (Tekwani., 1990) tem sido associadas à diminuição da depuração (*clearance*) de drogas. Tem sido observado também em modelos experimentais de inflamação e infecção, que estas condições patológicas protegem os animais da

toxicidade de agentes que necessitam de bioativação para exercerem os seus efeitos nocivos (Morgan, 1997).

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

Diferentes agentes infecciosos podem causar diminuição da biotransformação de drogas por citocromos P450. Infecções de ratos com o protozoário *Plasmodium berghei* causam um decréscimo progressivo do metabolismo microsomal de diversos substratos para enzimas CYP (Morgan, 1997). A infecção experimental pelo helminto *Ancylostoma ceylanicum* também causou uma redução do conteúdo microsomal hepático de CYP e da atividade da aminopirona-*N*-desmetilase, embora não altere a atividade da anilina-4-hidroxilase (Tekwani *et al.*, 1990).

Foi demonstrado que a infecção de ratos e ovelhas com o parasita *Fasciola hepatica* provoca uma redução do metabolismo e da depuração *in vivo* de drogas. No rato, o curso temporal do decréscimo das atividades de CYP está associado ao período de destruição tissular e ao grau de inflamação causado pela migração dos vermes jovens. Neste caso foi evidenciada uma redução do metabolismo da anilina, aminopirona, etilmorfina, benzo[*a*]pireno e benzfetamina, mas não da eritromicina (Morgan, 1997).

Kirby *et al.* (1994) demonstraram que a infecção pelo helminto *Opisthorchis viverrini* está associada à indução da subfamília CYP2A, subfamília que participa da bioativação da aflatoxina B<sub>1</sub> e da *N*-nitrosodietilamina.

Alguns estudos relataram a ocorrência de uma acentuada redução da atividade de monooxigenases hepáticas em camundongos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* (Cha *et al.*, 1976; Cha *et al.*, 1978).

Foi demonstrado por Coelho *et al.* (1977) que, em camundongos infectados por *S. mansoni*, o tempo de sono induzido pelo pentobarbital está aumentado, sugerindo que a esquistossomose mansônica murina diminui a depuração metabólica deste barbitúrico. Esta inibição da atividade de enzimas microsomais parece ser proporcional - até certo ponto - à carga parasitária (Sheweita *et al.*, 1998). Por outro lado, a atividade das enzimas microsomais não foi prejudicada quando a infecção era unissexual. Vários estudos

sugerem que a depressão das enzimas microsossomais é conseqüente ao processo de inflamação granulomatosa, não tendo sido observada em camundongos atímicos (*'athymic nude mice'*)(Cha *et al.*, 1980).

Não é claro, entretanto, se as diferentes subfamílias de citocromos P450 estariam igualmente alteradas na esquistossomose mansônica murina. Também é obscura a relação destas alterações enzimáticas com a espécie, linhagem e sexo do modelo utilizado. É possível que, na esquistossomose murina, a atividade de algumas monooxigenases hepáticas esteja deprimida e a de outras aumentada.

Como as monooxigenases têm papel fundamental na biotransformação de xenobióticos, as alterações causadas pela esquistossomose (e por outras doenças que levem a processos inflamatórios) podem modificar a farmacocinética de medicamentos e a ativação metabólica e eliminação de carcinógenos químicos.

## **1.4 – Modelo Experimental**

### ***1.4.1 – Noções Gerais***

As esquistossomoses denominadas também bilharzioses são doenças produzidas por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas principais espécies de interesse médico são o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum* (Rey, 1991).

O *Schistosoma mansoni* ocorre na África, na América do Sul e nas Antilhas, onde determina uma infecção denominada esquistossomose mansônica. A distribuição geográfica da esquistossomose mansônica está relacionada à de algumas espécies de moluscos de água doce, incluindo os caramujos do gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) que são os hospedeiros intermediários de *S. mansoni* no Brasil (Rey, 1991).

O número de pessoas com esquistossomose em todo o mundo foi estimado em 150 a 200 milhões (WHO, 1985). A grande maioria delas vive na Ásia e na África. No Brasil, onde só há a esquistossomose mansônica, estima-se existirem mais de 6 milhões de indivíduos infectados (Rey, 1991).

A gravidade que a doença pode assumir e o *deficit* orgânico que produz torna as esquistossomoses um dos mais sérios problemas de saúde pública em escala mundial.

A cercária é a forma infectante para os hospedeiros definitivos. A susceptibilidade dos hospedeiros definitivos varia em ampla escala, indo de espécies mais susceptíveis às mais resistentes. Dentre os susceptíveis, destacam-se os camundongos e hamsters (Ghandour & Webbe, 1976). Macacos *rhesus* e *cynomolugus* são considerados parcialmente susceptíveis, coelho e cobaia pouco susceptíveis e, finalmente, o rato, sagüi, macaco-de-cheiro, cão e o gato são tidos como animais resistentes (Warren & Peters, 1967). Os camundongos são muito susceptíveis aos parasitas e desenvolvem a doença de forma similar, mas não idêntica, ao padrão observado em seres humanos infectados (Brunet *et al.*, 1998).

Quando saem do molusco em que se formaram, as cercárias permanecem nadando na água, onde tem uma expectativa de vida de um ou dois dias. O seu poder infectante, entretanto, cai rapidamente, em poucas horas, anulando-se em geral ao fim de oito horas.

O contato com o hospedeiro vertebrado parece ser ao acaso, dependendo do tempo de permanência do hospedeiro no foco hídrico e da extensão da superfície corpórea exposta; mas, uma vez estabelecido o contato, a cercária adere à pele por meio de suas ventosas e logo inicia o trabalho de penetração.

A penetração demora de 2 a 15 minutos, ao mesmo tempo em que a larva se transforma em esquistossômulo.

Depois de permanecer na pele por um tempo variável, entre alguns minutos e um dia inteiro, os esquistossômulos iniciam uma migração através do corpo de seu novo hospedeiro. Penetram nos vasos cutâneos e, através da circulação, chegam ao coração direito e aos pulmões.

Do pulmão, os esquistossômulos voltam ao coração esquerdo e são enviados pela circulação geral a todas as partes do organismo mas somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático podem completar seu desenvolvimento. Dá-se então o amadurecimento sexual dos machos e o acasalamento, que é indispensável para que as fêmeas completem o seu próprio desenvolvimento.

Já acasalados, macho e fêmea deslocam-se ativamente, caminhando contra a corrente circulatória do sistema porta, tendo preferência pela veia mesentérica inferior e seus ramos, alcançando o plexo hemorroidário superior e as áreas vizinhas.

As localizações habituais do *S. mansoni* são as vênulas da parede do reto, do sigmóide e do intestino grosso do homem. Nos animais de laboratório, podem ser encontrados em qualquer território do sistema porta, inclusive na luz da veia porta. Essa localização é muito freqüente no camundongo. No coelho, cobaia e no rato, alguns vermes podem ser encontrados normalmente no sistema porta intra-hepático.

Em seu habitat definitivo, a fêmea fecundada começa a oviposição, insinuando-se nas vênulas mais estreitas da mucosa ou da submucosa enchendo-as de fiadas de ovos, produzidos um a um. A circulação nesses vasos chega a interromper-se, propiciando sua desorganização e a extrusão dos ovos para os tecidos circundantes.

Os ovos são eliminados através das fezes, e - quando em local apropriado - eclodirão, dando continuidade ao ciclo.

#### **1.4.2 – Imunopatologia**

O quadro inicial e a evolução do processo patológico provocado pelo *S. mansoni* no organismo do hospedeiro, variam consideravelmente com uma série de circunstâncias relacionadas ao parasita e ao hospedeiro. Entre estas características, destacam-se a linhagem do parasita; a carga infectante; as condições fisiológicas e viabilidade do material infectante; as características do hospedeiro e seu meio, a ocorrência de infecções anteriores, o grau de imunidade desenvolvida *etc.*

Os jovens esquistossômulos migram da pele aos pulmões pelos vasos sanguíneos e linfáticos. Somente os esquistossômulos jovens parecem ser susceptíveis aos vários mecanismos de ataque imunológico do hospedeiro. A perda desta susceptibilidade ocorre por volta de 2 a 3 dias após a infecção. Neste período os esquistossômulos sofrem um intenso ataque humoral e celular dos sistemas de defesa do hospedeiro.

Após a penetração, os esquistossômulos são capazes de ativar tanto a via clássica quanto a via alternativa do complemento. Esta atividade citotóxica do complemento pode ser amplificada quando o componente C3 do complemento ligado ao tegumento do

helminto, ativa tanto eosinófilos como os neutrófilos ou monócitos. Além do complemento, anticorpos podem estar ligados aos esquistossômulos, o que aumenta a atividade citotóxica. A destruição dos esquistossômulos é função da existência de receptores para IgG e complemento na membrana de eosinófilos e neutrófilos (Capron *et al.*, 1982). Os mastócitos, sensibilizados por anticorpos IgE específicos, aderem à parede do esquistossômulo secretando fatores que estimulam a maior expressão de receptores nos eosinófilos, participando assim do mecanismo de destruição. Cabe também às IgEs específicas, a função de ativar macrófagos que desenvolvem intensa atividade citotóxica. *In vitro*, esses macrófagos ativados destroem esquistossômulos mesmo na ausência de anticorpos ou complemento (Rey, 1991).

Já adultos, como parte de sua nutrição, os vermes ingerem eritrócitos do hospedeiro ocasionando perda de sangue, porém insignificante.

A doença *per se* inicia-se a partir da ovoposição. Em camundongos, este período de morbidade aguda ocorre aproximadamente durante 4 a 6 semanas após a infecção, evoluindo em seguida a uma fase crônica com seqüelas tardias. A doença aguda é caracterizada em humanos por mal-estar geral, febre e profundo *deficit* orgânico. Em camundongos estas condições são mais difíceis de caracterizar, a morbidade e a mortalidade, no entanto, são observadas quando se utiliza linhagens e cargas parasitárias adequadas (Cheever *et al.*, 1987).

Do mesentério, os ovos atravessam as paredes intestinais podendo resultar em lesões inflamatórias, fibrose e polipose. Os ovos que não migram para a luz do intestino, alcançam o fígado, o baço e eventualmente os pulmões, ocasionando também lesões inflamatórias. As lesões extra-hepáticas, entretanto, recebem menos atenção do que aquelas relativas ao fígado (Brunet *et al.*, 1998).

Com o tempo, o fígado acumula maior número de ovos, e em torno de cada um deles forma-se uma lesão granulomatosa. A resolução destas lesões - após a morte do ovo - resulta na extensa fibrose hepática observada durante a fase crônica. Em diversos hospedeiros infectados, o aumento da pressão sanguínea portal pelo dano hepático pode levar a um desvio do sistema porta. A forma mais grave da doença crônica em humanos é a hepatoesplênica, na qual a fibrose hepática extensa e hepatoesplenomegalia levam à ascite, e ao desenvolvimento de varizes esofágicas e hematêmese.

O desenvolvimento de granulomas no tecido ao redor dos ovos é característica marcante da esquistossomose murina (Brunet *et al.*, 1998).

Existem várias definições para o termo granuloma. A maioria delas se baseia na etiologia; componentes celulares; participação ou não do sistema imune; número relativo de novos macrófagos formando o granuloma; participação ou não de injúria tecidual (Lenzi *et al.*, 1998). A melhor definição para granuloma, segundo Lenzi *et al.*, (1998), seria: 'reação inflamatória focal crônica com presença de células fagocíticas mononucleares (com ou sem outros tipos celulares), células mononucleares organizadas e compactas e células epitelióides definindo a lesão granulomatosa típica' .

O granuloma na esquistossomose tem uma fase de maturação e outra involutiva. Estas fases, do ponto de vista morfológico, expressam um estágio pré-granulomatoso e um granulomatoso. O estágio pré-granulomatoso, de característica lítica, prepara o espaço através da destruição do parênquima para o próximo estágio, o granulomatoso, onde a adesão celular e outros eventos são característicos (Lenzi *et al.*, 1998).

Em animais imunocompetentes, o desenvolvimento do granuloma é regido principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares (Th). A resposta ao antígeno do ovo do parasita estimula principalmente linfócitos Th2. Em função da eosinofilia e dos altos níveis de IgE, as células linfóides de camundongos infectados produzem grandes quantidades de citocinas Th2 dependentes, Interleucina-4 (IL-4) e IL-5, bem como outras (Pearce *et al.*, 1991). No entanto é claro que uma grande variedade de outros genes de citocinas, incluindo os genes para Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$  , são também expressos nos tecidos afetados (Wynn *et al.*, 1993).

Entretanto, no modelo experimental murino, verificou-se que tanto os linfócitos Th1 quanto os Th2 podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do granuloma. Respostas predominantemente Th2 desenvolvem grandes granulomas, enquanto nas respostas Th1 dependentes, estes granulomas são menores formando lesões menores (Brunet *et al.*, 1998). O grau de fibrose no órgão alvo, e não o tamanho do granuloma , é considerado como sendo o fator determinante da gravidade da doença (Cheever, 1997).

Vários estudos que indicam que o TNF- $\alpha$  é a principal citocina envolvida no processo granulomatoso. Camundongos imunocompetentes tratados com soro anti-TNF- $\alpha$  desenvolveram granulomas com tamanho reduzido (Joseph & Boros, 1993). Um possível

mecanismo pelo qual TNF- $\alpha$  controla a formação do granuloma é o aumento da expressão da molécula de adesão 1 (ICAM-1), responsável por mediar a interação célula-célula e migração através do endotélio (Ritter & McKerrow, 1996).

A resposta Th1 dependente pode ter um papel benéfico. Experimentos com animais sensibilizados com ovos do parasita e IL-12 antes da infecção desenvolvem menores granulomas, e com fibrose hepática dramaticamente diminuída (Wynn *et al.*, 1995). Alguns estudos sugerem que IFN- $\gamma$  seja o mediador central destes efeitos benéficos, porém há relatos contraditórios como o estudo que mostra tamanho reduzido de granuloma em animais com ausência de receptor para IFN- $\gamma$  (Rezende *et al.*, 1997).

Diversos estudos sugerem que a resposta Th2 é deletéria durante a infecção. As Interleucinas 4 e 10, seriam relacionadas à regulação do tamanho do granuloma, e IL-5, quando ausente ou neutralizada durante uma infecção aguda, previniria a eosinofilia, mas nenhum efeito tem sido observado no tamanho e na fibrose, sugerindo um papel secundário na patogênese do granuloma.

Recentemente, evidências sugeriram que as respostas Th2 são crucialmente importantes para a sobrevivência do hospedeiro. Animais incapazes de montar uma resposta Th2 eficiente desenvolvem grave morbidade e sucumbem antes do início da oviposição. O exame histológico em camundongos infectados ausentes de IL-4, apresenta lesões muito discretas sendo, entretanto, a patologia significativamente mais grave no intestino, sugerindo que a inflamação descontrolada neste órgão seja crucial para o desenvolvimento da morbidade. Outra evidência que apoia o papel benéfico da resposta Th2 é a liberação de citocinas anti-inflamatórias que diminuiriam a expressão de INF- $\gamma$  e óxido nítrico (NO), já que uma correlação entre a gravidade da doença e a alta produção destes mediadores pró-inflamatórios foi observada. Por outro lado, a inibição da NO sintase induzível (iNOS), cuja expressão é promovida por INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , leva a um aumento da morbidade em camundongos na fase aguda da doença (Brunet *et al.*, 1998).

Durante a fase crônica da doença em camundongos, a produção de citocinas tipo Th2 e a resposta proliferativa de linfócitos são reduzidas, e os granulomas que se formam ao redor de novos ovos são menores. A regulação da resposta imune que ocorre após a fase aguda é chamada de modulação, sendo essa imunomodulação, um fator limitante da gravidade da doença.

Mesmo com os CD4<sup>+</sup> tendo um papel central na imunopatologia associada com a infecção por *S. mansoni*, outros tipos celulares produtores de citocinas tipo Th1 e Th2, tem sido implicadas na diminuição da resposta durante a fase crônica da infecção. Em particular, existe a evidência de que as células CD8<sup>+</sup> participem deste processo (Pearce & Pedras-Vasconcelos, 1997). Além dos CD8<sup>+</sup>, outras evidências sugerem que os linfócitos B também participam do processo de imunomodulação (Jankovic *et al.*, 2000).

Como é provavelmente o caso da maioria das infecções crônicas, a esquistossomose tem efeitos complexos, freqüentemente conflitantes, sobre o sistema imune do hospedeiro. Acredita-se atualmente que, para a sobrevivência com mínimos efeitos, seja necessária uma resposta imune regulada e balanceada pelos linfócitos Th1 e Th2. Provavelmente a resposta Th2, dominante durante a infecção, tenha um papel regulador das respostas tipo Th1, que por sua vez desempenha importante função de proteção do hospedeiro.

## 2 - OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar as alterações de citocromos P450 hepáticos durante a esquistossomose mansônica murina.

Para o estudar das atividades enzimáticas em camundongos infectados por *S. mansoni*, foi necessária uma investigação preliminar para estabelecer alguns parâmetros do modelo de esquistossomose mansônica murina a ser utilizado posteriormente. A realização deste estudo preliminar teve os seguintes objetivos específicos:

- a) Estabelecer a linhagem do camundongo a ser utilizado.
- b) Definir a idade em que os camundongos seriam infectados
- c) Fixar o tempo pós-infecção em que o camundongo seria sacrificado.

O objetivo do estudo principal, após a definição do modelo, foi avaliar os efeitos da infecção com *S. mansoni* sobre o conteúdo total de citocromos P450, as atividades de isoenzimas das subfamílias 1A, 2A e 2B, e os níveis de CYP1A e 2A5 na fração microsomal hepática de camundongos das linhagens *Swiss Webster* e *DBA/2*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Estudo Preliminar - Infecção de camundongos por *Schistosoma mansoni*: Influência da linhagem e da idade do hospedeiro

##### 3.1.1 – Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens *Swiss Webster (outbred)* e *DBA/2 (inbred)*, machos e fêmeas, oriundos da criação mantida pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

Os animais foram alojados, em grupos de cinco do mesmo sexo e linhagem, em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e maravalha de pinho branco autoclavada. Água de torneira e ração para camundongos (Nuvilab - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) foram fornecidos aos animais *ad libitum* durante todo o experimento.

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação à temperatura de  $23 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar em torno de 70 % e ciclo claro-escuro constante (período claro de 07 às 19 horas). As trocas das camas de maravalha foram feitas duas vezes por semana.

##### 3.1.2 - Grupos experimentais

Este experimento preliminar foi realizado para comparar a evolução da esquistossomose mansônica em camundongos das linhagens *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, infectados em idades distintas (lactentes e adultos). Trata-se, portanto, de experimento planejado para investigar interações das variáveis: linhagem x sexo x idade em que ocorreu a infecção x tempo de evolução pós-infecção. A partir dos resultados obtidos nesta etapa inicial definimos a idade de infecção (lactentes) e o momento da evolução da doença (55 dias pós-infecção) em que os animais foram sacrificados no experimento subsequente.

Tendo em vista o desenho fatorial adotado [02 (linhagens) x 02 (idades de infecção) x 02 (sexos) x 03 (momentos de evolução)] foram constituídos ao todo 24 grupos de camundongos.

**Idade de infecção:** Os animais adultos com  $45 \pm 3$  dias, *Swiss Webster* e DBA/2, pesavam  $20 \pm 3,31$  g (média  $\pm$  DP) quando foram infectados por via percutânea (imersão da cauda). Os camundongos lactentes das duas linhagens tinham  $10 \pm 1$  dias de vida e pesavam  $4 \pm 1$  g quando foram infectados por via percutânea (imersão parcial do corpo).

**Tempo de evolução da doença após a infecção:** Os camundongos foram sacrificados em três momentos distintos da evolução da doença (33, 55 e 90 dias pós-infecção). Estes momentos de evolução da doença foram definidos a partir da descrição feita por Lenzi *et al.* (1998) das três fases evolutivas do granuloma hepático na esquistossomose mansônica murina.

Os grupos experimentais, de acordo com o momento de sacrifício, foram os seguintes:

**- Infectados da linhagem *Swiss Webster* – Machos e Fêmeas**

- Infectados enquanto lactentes (10 dias de vida):

- 35 dias de infecção;
- 55 dias de infecção;
- 90 dias de infecção.

- Infectados quando adultos:

- 35 dias de infecção;
- 55 dias de infecção;
- 90 dias de infecção.

**- Infectados da linhagem DBA/2 – Machos e Fêmeas**

- Infectados enquanto lactentes (10 dias de vida):

- 35 dias de infecção;
- 55 dias de infecção;
- 90 dias de infecção.

- Infectados quando adultos:

- 35 dias de infecção;
- 55 dias de infecção;
- 90 dias de infecção.

Cada grupo de camundongos tinha o seu respectivo grupo controle não infectado (machos e fêmeas) pareado quanto a idade no dia do sacrifício.

### **3.1.3 – Acasalamento**

Como infectamos camundongos ainda lactentes (grupo infectado aos 10 dias de vida) foi necessário acasalar animais adultos para a obtenção da ninhada de onde foram selecionados os indivíduos usados no experimento.

O cruzamento foi realizado transferindo-se duas fêmeas para a gaiola de um macho durante um dia. Em seguida, as fêmeas foram retiradas e mantidas em caixas separadas até o dia do nascimento. A partir do 18º dia após o cruzamento, cada fêmea foi observada diariamente para o registro do nascimento da ninhada. Este dia foi considerado como dia 0 de vida pós-natal. As infecções ocorreram 10 dias após o nascimento.

O mesmo procedimento foi realizado para os animais utilizados nas atividades enzimáticas (seção 3.2).

### **3.1.4 – Infecção**

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* (cepa B.H., Brasil) é mantido rotineiramente no Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz.

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, anteriormente infectados com miracídeos originários de ovos eliminados nas fezes de camundongos, são mantidos em aquários, e expostos à luz artificial para a liberação das cercárias. Um certo volume de água contendo grande quantidade de cercárias, cedidas pelo Departamento de Malacologia, foi transportado para o Laboratório de Toxicologia Ambiental onde a infecção teve lugar logo em seguida.

A pele de cada camundongo (lactente ou adulto) foi exposta a 100 cercárias da cepa BH - Brasil. Após o período de infecção, por via percutânea, o volume de água que continha as 100 cercárias foi examinado ao estereomicroscópio (*Zeiss Stemi SV11*,

*Germany*) para a contagem daquelas cercárias que não penetraram, possibilitando assim o cálculo do índice (%) de penetração.

#### 3.1.4.1 – Infecção de Camundongos Adultos

Os camundongos foram imobilizados em caixas de acrílico, especialmente desenhadas para este fim, de modo que apenas a cauda ficasse exposta. Na parte inferior da caixa (de onde saía a cauda) foi acoplado um tubo de ensaio com 10 ml de água contendo 100 cercárias, previamente contadas com o auxílio do estereomicroscópio.

Cada animal foi exposto à 100 cercárias durante 20 minutos.

#### 3.1.4.2 – Infecção de Camundongos Lactentes

Os filhotes foram separados da mãe e colocados em placas de *Petri* de plástico, com aproximadamente 3 ml de água destilada contendo 100 cercárias. Além da cauda, toda parte ventral do camundongo ficava exposta às cercárias. Após a exposição às cercárias por 20 minutos, o lactente era devolvido à mãe.

#### **3.1.5 – Recuperação de Vermes**

Os vermes adultos foram recuperados do sistema porta hepático através de perfusão com solução salina citratada (Cloreto de Sódio 0,85%; Citrato de Sódio 1,5%). A perfusão foi feita empregando uma bomba de água elétrica à qual adaptamos um tubo com uma agulha de 27 x 7 mm na extremidade. A vazão da bomba era de aproximadamente 40 ml / min.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A parede abdominal foi aberta através de uma ampla incisão longitudinal até a caixa torácica e uma outra transversal. A veia porta hepática foi seccionada e a agulha do sistema de perfusão introduzida no ventrículo esquerdo do coração. O líquido extravasado com o início da perfusão foi recolhido em um recipiente e filtrado em malha fina, onde os primeiros vermes foram recuperados. A cavidade abdominal do camundongo foi, então, lavada com

solução salina citratada e o lavado, filtrado como descrito acima. A perfusão de cada animal durou de 40 a 60 segundos, sendo o resultado considerado satisfatório quando os rins, o fígado e os intestinos apresentavam aspecto pálido. Após o término da perfusão, o mesentério de cada animal foi cuidadosamente observado, sendo os vermes restantes retirados com uma sonda exploratória de aço inoxidável, número 1. Os vermes recuperados foram contados com o auxílio do estereomicroscópio (aumento de 0,6 x) e separados, para contagem, em três grupos: machos, fêmeas e casais.

O procedimento relatado acima foi uma modificação do método descrito por Smithers & Terry (1965).

### ***3.1.6 – Contagem de Ovos***

Concluída a perfusão e a recuperação dos vermes, os fígados e os intestinos foram pesados e transferidos para cálices de 250 ml onde foram digeridos em solução de Hidróxido de Potássio a 4% p/v, mantida à 37 °C, por aproximadamente 16 horas. Após a digestão e sedimentação, o sobrenadante foi desprezado, sendo adicionada água destilada aos cálices. Após a sedimentação, o sobrenadante foi mais uma vez desprezado. Uma alíquota de 50 µl do sedimento foi, então, utilizada para fazer uma lâmina que foi examinada ao microscópio óptico (aumento de 100 x). O volume total do sedimento foi medido com pipeta para posterior cálculo do número de ovos.

A técnica para a contagem dos ovos foi executada tal como descrito por Cheever, 1968.

## **3.2 Avaliação das atividades de CYP em fígado de camundongos infectados com *S. mansoni***

### **3.2.1 – Animais**

Foram utilizados camundongos das linhagens *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, oriundos da criação mantida pelo CECAL-FIOCRUZ. Após o desmame (21 dias), os camundongos foram alojados em grupos de cinco, separados por sexo, em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco autoclavada. Água de torneira filtrada e ração comercial para camundongos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) foram fornecidas *ad libitum* a todos os animais.

Os animais foram mantidos no Biotério à temperatura de  $23 \pm 2$  °C, umidade relativa do ar em torno de 70 % e ciclo claro-escuro constante (período claro de 07 às 19 horas). As trocas das camas de maravalha foram feitas duas vezes por semana; água e ração foram substituídas diariamente.

### **3.2.2 – Grupos**

Os camundongos foram divididos ao acaso em dois grupos: Infectados e Controles. Cada grupo foi formado por camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 machos e fêmeas. Os animais do grupo infectado foram expostos a 100 cercárias no 10º dia de vida e sacrificados 55 dias após a infecção. Os controles não-infectados, mantidos em condições semelhantes, foram sacrificados com a mesma idade do grupo infectado (65 dias).

### **3.2.3 – Infecção**

O ciclo reprodutivo do *Schistosoma mansoni* é mantido pelo laboratório de Malacologia da Fundação Oswaldo Cruz. Os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados, são mantidos em aquários e expostos à luz artificial para a liberação das cercárias.

Os camundongos no 10º dia de vida foram separados da mãe e colocados em placas de *Petri* de plástico, com água destilada contendo 100 cercárias. Além da cauda, toda a parte ventral do camundongo ficava exposta as cercárias. Após 20 minutos de exposição, o lactente era devolvido à mãe.

Todo o período de exposição ocorreu sob iluminação artificial com luz de lâmpada de tungstênio.

Decorrido o tempo de infecção, a água de cada placa de *Petri* foi examinada ao estereomicroscópio (*Zeiss®Stemi SV11*) para a contagem das cercárias que não penetraram e o cálculo do índice de penetração.

### ***3.2.4 - Sacrifício e armazenamento dos órgãos***

Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, 55 dias após a infecção e aproximadamente 16 horas após o alimento ter sido retirado.

Imediatamente após o sacrifício, foi feita uma ampla incisão longitudinal e outra transversal na parede abdominal e o fígado foi rapidamente retirado e pesado em banho de gelo. A partir deste momento, todo o procedimento foi realizado a 4 °C. O baço de cada animal também foi retirado e pesado. Os fígados foram embalados individualmente em papel alumínio, acondicionados em caixas especiais de papelão e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da preparação da fração microsomal.

### ***3.2.5 - Preparação da fração microsomal***

Os fígados congelados em nitrogênio líquido, ainda embalados, foram colocados em placas de *Petri* e descongelados em banho de gelo. A partir deste momento, todo o procedimento ocorreu à temperatura de 4°C. Após o descongelamento, foi constituído um *pool* de três fígados. Os órgãos foram lavados em solução de sacarose 250 mM, secos em papel filtro, triturados em grau de porcelana e transferidos para homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. A primeira homogeneização (1 parte de *pool* : 4 partes de solução de sacarose 250 mM) foi feita através de movimentos ascendentes e descendentes do homogeneizador e pistilo de teflon a uma velocidade angular de aproximadamente 1200

rpm. A partir do momento em que foi constatada visualmente a homogeneização do tecido, foram realizados ainda 10 ciclos de movimentos ascendentes e descendentes.

O homogeneizado obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 9000 g durante 30 minutos a 4 °C (Centrífuga *Eppendorf*® 5804R). O sobrenadante foi novamente filtrado em gaze e submetido à ultracentrifugação a 100000 g durante 60 minutos a 4 °C (Ultracentrífuga *Beckman*®XL-80 optima).

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

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

### ***3.2.6 - Determinação da concentração de proteínas na fração microssomal***

A concentração de proteínas na preparação microssomal foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford *et al.*, (1976), utilizando o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm (espectrofotômetro *Shimadzu*® UV- 1601). Todas as leituras de DO foram realizadas em cubetas de plástico descartáveis.

As curvas de calibração foram realizadas com albumina sérica bovina – BSA Sigma Chemical Co - diluída em solução tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) para obter as seguintes concentrações de proteína: 70; 140; 350; 700 e 1400 µg/ml. A curva foi realizada como se segue: 3 mL do corante Azul de Coomassie G-250 Sigma,

foram adicionados a tubos de ensaio contendo 100 µL das diferentes concentrações de BSA. A formação do complexo proteína-corante é rápida e estável no período de 5 a 60 minutos. Assim, adotamos um intervalo constante de aproximadamente 30 minutos entre a adição do corante e a leitura da absorbância. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

Para a determinação da concentração de proteínas na fração microsomal, foram adicionados 3 ml do corante a tubos - em duplicata - contendo uma mistura de 50 µl da solução diluída da preparação microsomal (1:20 em solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) e 50 µl da mesma solução tampão para completar o volume final de 100 µl. Da mesma forma, foram adicionados 3 ml do corante a outros tubos - em duplicata - contendo 100 µl da solução diluída da preparação microsomal (1:20 em solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2).

Cada valor de DO obtido foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão. Feitas as correções para cada fator de diluição, as concentrações de proteína na fração microsomal foram calculadas como a média obtida (média final) a partir das médias de cada duplicata e expressas como mg de proteína / ml de preparação microsomal.

### **3.2.7 – *Quantificação dos níveis totais de citocromos P450***

O princípio do método baseia-se na capacidade de ligação da heme proteína reduzida, com o monóxido de carbono, apresentando um espectro de absorção característico com um máximo em 450 nm. A quantificação de citocromos P450 totais na fração microsomal foi realizada segundo o método descrito por Omura & Sato, 1964.

A fração microsomal foi descongelada em banho de gelo e diluída com uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM com 20% v/v de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4, de modo a alcançar a concentração de 1 mg de proteínas microsomais / ml. A solução diluída foi a partir de então mantida no gelo até o momento das determinações.

Para a determinação das concentrações de CYP totais, foram utilizadas cubetas de quartzo e espectrofotômetro *Shimadzu* UV160, em modo de varredura de 400 a 500 nm. O resultado obtido corresponde a média  $\pm$  DP de duas leituras.

Nas cubetas de referência e da amostra, foram adicionados 2 ml da solução de microsossomos e, em seguida, com o auxílio de uma espátula, uma pequena quantidade de ditionito de sódio. A diferença das absorbâncias medidas nas duas cubetas (de referência e da amostra) foram corrigidas (linha de base). A correção foi feita para cada leitura. A cubeta contendo a amostra foi então levemente borbulhada com monóxido de carbono por 1 minuto. Em seguida foi registrada a diferença de espectro de absorção entre 400 e 500 nm na cubeta da amostra (cubeta com monóxido de carbono) e na cubeta de referência (cubeta com solução de microsossomos e ditionito de sódio apenas).

Os resultados (nmol / mg proteína microsossomal) foram calculados a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\Delta A (450-490) \text{ nm} \times 1000 \times \text{vol. da amostra microsossomal (ml)} + \text{vol. do tampão (ml)}}{X \times 91 \times \text{vol. da amostra microsossomal (ml)}}$$

Onde:

$\Delta A (450 - 490) \text{ nm}$  = diferença entre a absorção máxima e a linha de base a 490 nm

X = concentração da fração microsossomal

91 = Coeficiente de extinção determinado por Omura & Sato (1964),  $91 \text{ cm}^2 / \text{nmol}$

### **3.2.8 – Determinações de atividade de enzimas CYP na fração microsossomal hepática**

#### **3.2.8.1 - Determinação da atividade da Cumarina-7-hidroxilase (CoH)**

A formação da 7-hidroxicumarina ou umbeliferona, a partir da hidroxilação da cumarina, pode ser quantificada por espectrofluorimetria já que o produto da reação é fluorescente. A principal isoenzima citocromo P450 responsável pela 7-hidroxilação da cumarina em fígado de camundongos parece ser CYP2A5 (Honkakoski *et al.*, 1992). A determinação da atividade da cumarina 7-hidroxilase foi realizada como descrito por Iersel *et al.* (1994) e Greenlee & Poland (1978), com algumas modificações.

Em banho de gelo, foram adicionados a tubos em triplicata, 100  $\mu\text{l}$  de tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4; água destilada na quantidade necessária para completar o volume

final de 1 ml; 10 µl de uma solução de cumarina 1 mM em metanol, correspondendo à concentração final de 10 µM e volume da fração microsomal que continha 0,5 mg de proteína. Os tubos foram pré-incubados por 3 minutos a 37 °C em banho-maria (banho com agitação Heto - Heto Lab Equipment) com agitação constante de 80 movimentos por minuto. Após 3 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de 55 µl de uma solução contendo o sistema regenerador de NADPH (β-NADP 0,5 mM; glicose-6-fosfato 10 mM; glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U / ml e cloreto de magnésio 10 mM). O tempo de reação foi de 10 minutos, sendo esta interrompida pela adição de 100 µl de HCl 2 N. Novamente no gelo, foram adicionados, a cada tubo, 2 ml de clorofórmio - em capela química com exaustão - para a extração da umbeliferona. A separação das fases ocorreu por aproximadamente 20 minutos e 1 ml da fase orgânica (inferior) foi, cuidadosamente, retirado com auxílio de micropipetas e transferido para outro tubo previamente gelado, contendo 1,5 ml de uma solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M. Os tubos foram levados ao vórtex para agitação e novamente retornaram ao gelo onde permaneceram por aproximadamente 10 minutos para uma nova separação de fases. A fase alcalina (superior) foi retirada e transferida para tubos tipo *ependorf* com capacidade para 1,5 ml.

Imediatamente antes da leitura da fluorescência, o conteúdo dos tubos *ependorfs* foi diluído 1:5 em solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M, e a intensidade da fluorescência, correspondente à umbeliferona formada nas amostras, foi medida em espectrofluorímetro *Shimadzu* ® RF-5000, com excitação a 368 nm, emissão a 465 nm e abertura de fenda igual a 3 nm. O volume final da mistura da solução de umbeliferona obtida a partir da reação e solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M foi de 2 ml na cubeta.

As curvas padrão foram construídas a partir de uma solução de umbeliferona 1 µM em solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M. Diferentes alíquotas da solução de umbeliferona 1 µM foram adicionadas à cubeta, bem como volumes da solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M para completar 2 ml na cubeta. As concentrações de umbeliferona, na cubeta, que construíram a curva padrão foram respectivamente 5; 25; 100 e 200 picomoles / ml.

Os resultados foram obtidos a partir da média de dois ensaios, sendo que em cada ensaio as determinações para cada *pool* de animais eram avaliadas em triplicata,

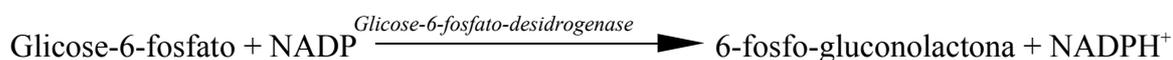
perfazendo um total de 6 determinações para cada *pool* de animais. A atividade de CoH foi expressa como picomoles de umbeliferona / minuto / mg de proteína.

Cubetas de quartzo foram utilizadas tanto para realização da curva padrão quanto para a leitura das amostras.

### 3.2.8.2 - Determinação da atividade das resorufina-*O*-desalquilases: Benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD), Etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e Pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD)

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

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



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

As reações de *O*-desalquilação ocorreram em cubetas de quartzo no espectrofluorímetro *Shimadzu* ®RF-5000. O acúmulo de resorufina (excitação 550 nm e emissão 582 nm; abertura da fenda, 5 nm) foi monitorado ao longo do tempo. O

espectrofluorímetro dispunha de um banho-maria com bomba de circulação externa acoplado ao aparelho (banho *LKB* ®Bromma Multitemp 2209), de modo que era possível manter constante em 37 °C a temperatura na cubeta durante a reação.

Foram adicionados à cubeta de quartzo:

- solução tampão  $K_2HPO_4$  100 mM, pH 7,8, em quantidade necessária para completar o volume final de 2000  $\mu$ L;
- 10  $\mu$ L do substrato específico (benziloxiresorufina, etoxiresorufina ou pentoxiresorufina 1 mM em DMSO), que atingiam a concentração final de 5  $\mu$ M na cubeta;
- preparação microsomal em volumes variáveis;
- sistema regenerador de NADPH.

Após cinco minutos de pré-incubação a 37 °C, microsomos e substrato eram adicionados à cubeta para um período adicional de pré-incubação de 2 minutos. Transcorridos os sete minutos iniciais, a reação enzimática era iniciada pela introdução do sistema regenerador de NADPH (glicose-6-fosfato 5 mM;  $\beta$ -NADP 0,25 mM; solução de  $MgCl_2$  2,5 mM; glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U/ml).

A reação foi registrada durante noventa segundos em registrador gráfico acoplado ao fluorímetro. Os valores de inclinação da reta obtidos a partir dos registros gráficos, a correspondência entre intensidade de fluorescência e a quantidade de resorufina produzida (obtida através da curva padrão), foram utilizados para cálculo da velocidade da reação (picomoles de resorufina produzida / minuto da reação / mg de proteína).

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

As curvas padrão foram construídas com diferentes quantidades de resorufina na cubeta obtidas a partir da diluição de uma solução padrão de resorufina 1  $\mu$ M em tampão fosfato  $K_2HPO_4$  100 mM pH 7,8 para completar o volume final de 2 ml na cubeta.

### ***3.2.9 – Determinação semiquantitativa de apoproteínas CYP por Western Blotting***

#### **3.2.9.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE)**

A técnica de eletroforese em gel foi realizada de acordo com Laemmli, 1970 com modificações (Phillips *et al.*, 1981).

Os géis foram aplicados entre duas placas de vidro, uma maior e uma menor. O espaço entre as placas de vidro era de 1,5 mm, obtido pela utilização de espaçadores nas laterais de cada placa. Inicialmente, cada placa de vidro foi desengordurada com etanol 70% v/v. Cada par de placas, uma maior e a outra menor, foi encaixado em aparato próprio para aplicação dos géis (gel de resolução e gel de empacotamento).

O gel de resolução (acrilamida 12% v/v) foi preparado adicionando-se 7,5 ml de solução de Acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 9,0 ml de tampão tris 1,5M / SDS 0,4 % p/v, pH 8,8, 180 µl de uma solução de Persulfato de amônio 10 % p/v, 18 µl de TEMED e 2 ml de água miliQ, e cuidadosamente aplicado entre as placas de vidro até cerca de 4 cm da borda superior. Após a aplicação, foram adicionados 500 µl de SDS 0,1 % p/v.

Verificada a polimerização do gel de resolução, a solução de SDS 0,1 % p/v foi retirada e o gel de empacotamento (acrilamida 3 % v/v) foi cuidadosamente aplicado até o completo preenchimento do espaço entre as placas de vidro. O gel de empacotamento foi preparado adicionando-se 3 ml de solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 7,5 ml de tampão tris 0,5 M / SDS 0,4 % p/v, pH 6,8, 200 µl de Persulfato de amônio 10 % p/v, 30 µl de TEMED e 18 ml de água miliQ.

Após a aplicação do gel de empacotamento, foi introduzido entre cada par de placas de vidro, e no gel, o pente com uma espessura de 1,5 mm e 10 canaletas. O tempo de polimerização durou cerca de 1 hora para o gel de resolução e aproximadamente 2 horas para o gel de empacotamento.

Visualizada a polimerização, retirava-se o pente, e as canaletas formadas eram então lavadas com tampão de eletroforese. Cada par de placas de vidro que continha os géis (resolução e empacotamento) foi transferido para a cuba de eletroforese marca *Bio-Rad*® Mini-Protean II Cell, contendo tampão de eletroforese.

Citocromos P450 da subfamília 1A e 2A de frações microssomais hepáticas de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster*, controles e infectados, dos dois sexos, foram analisados. A quantidade de proteína microssomal para cada corrida por amostra, variou entre 20, 22,5 e 50 µg. Para as amostras de animais DBA/2, analisadas para CYP2A5,

foram utilizados 22,5 µg de proteína microsomal e para as amostras oriundas de animais *Swiss Webster*, analisadas para a mesma isoenzima, foram utilizados 50 µg de proteínas microsomais por aplicação. Para a análise dos níveis de CYP1A, em ambas as linhagens, foram utilizados 20 µg de proteínas microsomais por aplicação.

As amostras foram diluídas em tubos tipo *ependorf* com 2 partes de tampão de amostra e 3 partes de microsomos para um volume final de 20 µl, e com a quantidade adequada de proteínas microsomais.

Feitas as diluições, foram adicionados 2 µl de 2-mercaptoetanol a cada amostra. Em seguida, cada tubo foi aquecido a 95 °C por 5 minutos, e deixado esfriar por mais 5 minutos, sendo então, novamente, adicionado 1 µl de 2-mercaptoetanol. Após centrifugação a aproximadamente 1000 rpm por 15 segundos em centrífuga de bancada, cada amostra foi aplicada em sua respectiva canaleta no gel.

Para determinar o peso molecular das proteínas em teste, foram aplicados, paralelamente aos microsomos, 20 µl do padrão de proteína de baixo peso molecular diluídos 1:20 em solução tampão.

A corrida eletroforética foi iniciada utilizando-se uma fonte Power Pac 300/*Bio-Rad* ® regulada a 40 mA. A corrida era finalizada no momento da chegada do corante à borda inferior do gel (aproximadamente 4 horas).

### 3.2.9.2 – Immunoblotting (Western blotting)

Cessada a corrida eletroforética, cada gel foi levado ao contato com uma membrana de nitrocelulose, sendo ambos comprimidos de cada lado por um pedaço de papel filtro e uma esponja, previamente imersos em solução tampão de transferência a 4 °C, e levados à cuba de transferência da marca *GibcoBRL*® Mini-V 8.10. O processo de transferência ocorreu ao longo de toda a noite, à 24 V e à temperatura de aproximadamente 4 °C. Durante a última hora do processo de transferência, a corrente elétrica foi alterada para 150 mA, mantendo-se a temperatura de aproximadamente 4 °C.

Retirado da cuba de transferência, cada padrão de baixo peso molecular foi cortado e corado com uma solução corante para o padrão durante 30 minutos, sendo depois lavado em água destilada por mais 1 hora. A membrana foi imersa em 200 ml de solução bloqueadora durante 1 hora e 30 minutos, sendo depois lavada com solução tampão Tris / Tween - TTBS - (duas lavagens durando 5 minutos cada uma). Finalizada esta primeira lavagem com TTBS, as membranas foram incubadas com a solução do anticorpo primário anti-CYP2A5 (anticorpo policlonal obtido a partir de CYP2A5 purificado de camundongos DBA/2N e inoculado em coelhos) ou anti-CYP1A (anticorpo policlonal obtido a partir de CYP1A purificado de ratos Wistar e inoculado em coelhos), diluído 1:500 em TTBS, durante 1 hora e 30 minutos. Todos os anticorpos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Felipe Ribeiro-Pinto, UERJ. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram submetidas a 4 novas lavagens com TTBS, duas vezes 10 minutos cada e outras duas, durante 5 minutos cada uma. Removida a última solução de lavagem, as membranas foram incubadas com 10 µl do anticorpo secundário (anti-IgG de coelho associado à fosfatase alcalina) em 50 ml de solução de gelatina 1 % p/v, diluída em tampão TTBS, durante 30 minutos. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TTBS, sendo desta vez efetuadas 3 lavagens de 10 minutos cada. Duas outras lavagens com TBS, cada uma correspondendo a duas etapas de 5 minutos cada, foram realizadas antes da revelação. As membranas foram incubadas com a solução de revelação de acordo com o kit *Bio-Rad*® (1 ml de tampão de revelação fosfatase alcalina, 250 µl do reagente fosfatase alcalina A e 250 µl do reagente fosfatase alcalina B para 25 ml de água miliQ) até

o aparecimento das bandas. Visualizadas as bandas, as membranas foram colocadas em banho com água destilada para finalizar o processo de revelação.

Todo o procedimento ocorreu à temperatura ambiente sob agitação leve e constante.

Para calcular os pesos moleculares das amostras, foi construída uma curva com os pesos moleculares do padrão *versus* as distâncias percorridas pela proteína entre o início do gel e o início das bandas. Os valores encontrados foram lançados em uma equação de regressão linear simples.

A análise semi-quantitativa das amostras foi realizada em um *scanner* acoplado a um espectrofluorímetro *Hitachi*® F 3010 com emissão fixada em 525 nm e abertura de fenda em 5 nm. A intensidade da luz refletida por cada banda foi transformada em picos e registrados em gráfico produzido pelo aparelho. Através do gráfico, foi determinada a área dos picos pelo cálculo segundo a fórmula  $S = B \times A / 2$ , onde S (área) é igual a medida da base do pico (B), multiplicado pela medida da sua altura (A), dividido por 2. Posteriormente, os valores das áreas obtidos para cada banda foram divididos pela concentração de proteínas microssomais aplicada em cada gel, o que possibilitou a obtenção de um valor arbitrário de área /  $\mu\text{g}$  de proteína microssomal. Deste modo, conseguimos comparar a expressão dos CYP pesquisados nos diferentes grupos experimentais.

### **3.2.10 – Análise estatística**

O tratamento estatístico dos dados foi feito pela análise de variância de uma via (ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis quando os dados não se ajustavam a uma curva normal. A existência de diferenças significativas entre dois grupos foi estabelecida pelo teste *t* de Student para amostras independentes, *i.e.*, não-pareadas ou, no caso de dados não-paramétricos, pelo teste *U* de Mann-Whitney. Os testes foram sempre bilaterais (*i.e.*, bicaudais) e foi respeitado, em todos os casos, o limite máximo de comparações estabelecido pelos graus de liberdade das análises de variância paramétrica ou não-paramétrica. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa estatístico MINITAB® (MTB, *University of Pennsylvania*, 1995).

### **3.2.11 – Soluções, Padrões, Substratos, Sistema Regenerador de NADPH e outras Substâncias utilizadas neste trabalho**

#### 3.2.11.1 - Soluções

#### **Soluções utilizadas na recuperação de vermes e contagens de ovos**

##### **- Solução de Cloreto de Sódio 0,85% (p/v) / Citrato de Sódio 1,5% (p/v)**

Cloreto de Sódio	8,5 g
Citrato de Sódio	15 g
Água destilada <i>qsp</i>	1000 ml

Ajustar o pH para 7,2 com NaOH 1 M ou HCl 1 N.

##### **- Solução de Hidróxido de Sódio 4% (p/v)**

NaOH	320 g
Água destilada	8000 ml

#### **Soluções utilizadas na preparação da fração microsomal**

##### **- Solução de Sacarose 250 mM**

Sacarose	21,4 g
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs: Preparar no dia de uso e manter no banho de gelo durante o ensaio

##### **- Solução Tris-HCl 100 mM com KCl 150 mM pH 7,4**

Preparar Tris 1 M

Tris	12,1 g
Água Destilada <i>qsp</i>	100 ml

Imediatamente antes do uso, diluir a solução de 1: 10 em água destilada e acrescentar 1,16 g de KCl. Solubilizar e, em seguida, ajustar o pH para 7,4 com HCl 10 N. Manter no banho de gelo durante o ensaio.

**- Solução Tampão K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	52,25g
Água destilada <i>qsp</i>	300 ml

Obs: Manter a 4°C

**- Solução Tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20,41 g
Água destilada <i>qsp</i>	150 ml

Obs: Manter a 4°C

**- Solução Tampão Fosfato de Potássio 100 mM com 20% v/v de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4**

**Solução A**

Solução Tampão K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	5 ml
Glicerol	10 ml
Solução EDTA 100 mM	500 µl
Água destilada <i>qsp.</i>	50 ml

**Solução B**

Solução Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	2,5 ml
Glicerol	5 ml
Solução EDTA 100 mM	250 µL
Água destilada <i>qsp</i>	25 mL

Ajustar o pH da solução A para 7,4 com a solução B

Obs: Preparar no dia de uso e manter no banho de gelo durante o ensaio.

**Soluções utilizadas na determinação da concentração de proteínas da fração microssomal**

**- Solução Tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM / NaCl 150 mM pH 7,2**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,680 g

NaCl 0,876 g

Dissolver em 60 mL de água destilada

Ajustar o pH para 7,2 com KOH 10 % p/v

Água destilada *qsp.* 100 ml

Obs: Preparar no dia de uso

**Solução utilizada na quantificação de citocromos P450 totais**

**- Solução Tampão Fosfato de Potássio 100 mM com 20% v/v de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4**

**Solução A**

Solução Tampão  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M 5 ml

Glicerol 10 ml

Solução EDTA 100 mM 500  $\mu\text{l}$

Água destilada *qsp.* 50 ml

**Solução B**

Solução Tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M 2,5 ml

Glicerol 5 ml

Solução EDTA 100 mM 250  $\mu\text{L}$

Água destilada *qsp* 25 mL

Ajustar o pH da solução A para 7,4 com a solução B

Obs: Preparar no dia de uso e manter no banho de gelo durante o ensaio.

## Soluções utilizadas nas atividades enzimáticas

### Atividade da Cumarina 7-hidroxilase

#### - Solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M

NaOH	0,2 g
NaCl	29,2 g
Água destilada <i>qsp</i>	500 ml

#### - Solução tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4

Preparar Tris 1 M

Tris	30,285 g
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs.: Manter a 4 °C

No momento de uso, diluir Tris 1 M 1:2 e ajustar o pH para 7,4 com HCl 10 N.

#### - HCl 2 N

HCl	6 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 50 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 6 ml de HCl e completar para 100 ml com água destilada.

Obs.: Preparar em capela química.

#### - HCl 10 N

HCl	31 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 50 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 31 ml de HCl e completar para 100 ml com água destilada.

Obs.: Preparar em capela química.

### **Atividade das resorufina-*O*-desalquilases.**

#### **- Solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM pH 7,8**

##### **- Solução A**

Solução Tampão K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	25 ml
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs.: Manter a 4 °C

##### **- Solução B**

Solução Tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	10 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Obs.: Manter a 4 °C

No momento de uso, ajustar o pH da solução A com a solução B para 7,8

### **Soluções Utilizadas nos Ensaios de SDS/PAGE e Western Immunoblotting.**

#### **- Solução Tris 1,5M / SDS 0,4 % pH 8,8**

Tris	18,17 g
SDS	0,4 g
Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	80 ml

Homogeneizar e ajustar o pH para 8,8 com HCl 6 N

Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	100 ml
---------------------------------------	--------

Obs: Manter à temperatura ambiente

#### **- Solução Tris 0,5 M / SDS 0,4 pH 6,8**

Tris	6,05 g
SDS	0,4 g
Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	80 ml

Homogeneizar e ajustar o pH para 6,8 com HCl 6N

Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	100 ml
---------------------------------------	--------

#### **- Solução Tampão de Eletroforese ( Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1 %)**

Tris	3,03 g
Glicina	14,41 g
SDS	1 g
Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	1000 ml

**- Solução Tampão de Transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %)**

Tris	3,03 g
Glicina	14,41 g
Metanol	200 ml
Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	1000 ml

**- Solução Tampão Tris (TBS)**

Tris	7,26 g
NaCl	87,66 g
Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	2000 ml
Ajustar o pH para 7,5 com HCl 6 N	
Água pura (sistema milliQ) <i>qsp</i>	1000 ml
Obs: Manter a 4 °C	

**- Solução Tampão Tris/Tween (TTBS)**

Solução TBS	1000 ml
Tween	500 µl
Obs: Manter a 4 °C	

**- Tampão de Amostra (Tris-HCl 2 mM, pH 6,8 / Glicerol 40% v/v/ Azul de Bromofenol 4 % p/v e SDS 40 % p/v)**

Glicerol	4 ml
Azul de Bromofenol	0,4 g
SDS	4 g
Tris-HCl 2 mM pH 6,8 <i>qsp</i>	10 ml

**- Solução Bloqueadora**

Solução tampão TBS	200 ml
Gelatina	6 g

**- Solução Corante de Padrão (amido-black 0,05% p/v, ácido acético 10% v/v e isopropanol 25% v/v)**

Amido-Black	0,05 g
Ácido Acético	10 ml
Isopropanol	25 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

3.2.11.2 - Padrões

**- Solução de umbeliferona 1  $\mu$ M**

Preparar solução de umbeliferona 1 mM

Umbeliferona	0,0162 g
Solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M <i>qsp</i>	100 ml
Solução de umbeliferona 1 $\mu$ M	
Solução de umbeliferona 1 mM	25 $\mu$ l
Solução de NaOH 0,01 N / NaCl 1 M <i>qsp</i>	25 ml

Obs: Preparar no momento de uso e ao abrigo da luz

**- Solução de Resorufina 1  $\mu$ M**

Preparar solução de resorufina 1 mM

Resorufina	23,5 mg
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml
Solução de resorufina 1 $\mu$ M	
Solução de Resorufina 1 mM	50 $\mu$ l
Tampão K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 M pH 7,8 <i>qsp</i>	50 ml

Obs: Preparar em balão volumétrico aferido, imediatamente antes do uso e manter ao abrigo da luz

**- Solução de Albumina Sérica Bovina 1,40 mg / ml**

BSA 1,98 mg

Solução tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM / NaCl 150 mM pH 7,2 1,4 ml

Obs: Manter a 4°C pelo período de 60 dias ou a - 20°C distribuído em alíquotas.

**- Padrão de Baixo Peso Molecular Pharmacia Biotech 17-0446**

Fosforilase B 94 kDa

Albumina Sérica Bovina 67 kDa

Ovoalbumina 43 kDa

Anidrase Carbônica 30 kDa

3.2.11.3 - Substratos

**- Solução de cumarina 1 mM**

Preparar solução de cumarina 0,1 M em *ependorf* de 2 ml

Cumarina 0,0292 g

Metanol 2 ml

Homogeneizar em vórtex

Obs.: Preparar no momento de uso e ao abrigo da luz.

Diluir solução de cumarina 0,1 M para 1 mM em *ependorf* de 1,5 ml

Solução de cumarina 0,1 M 10  $\mu\text{l}$

Metanol 990  $\mu\text{l}$

Homogeneizar em vórtex

Obs.: Preparar no momento de uso ao abrigo da luz

**- Solução de etoxiresorufina, pentoxiresorufina e benziloxiresorufina 1 mM**

- 1) Pesar 3 a 5 mg do substrato
- 2) Adicionar 2 ml de clorofórmio
- 3) Distribuir alíquotas de modo a obter 0,5  $\mu$ mol de substrato por tubo
- 4) Aguardar a evaporação do clorofórmio em capela química
- 5) Manter a temperatura ambiente e ao abrigo da luz
- 6) No momento de uso, adicionar volume de DMSO a cada tubo, de modo a obter uma solução 1 mM.

3.2.11.4 - Sistema Regenerador de NADPH

3.2.11.4.1. - *Atividade das resorufina-O-desalquilases.*

**- Solução de MgCl<sub>2</sub> 1 M**

MgCl <sub>2</sub>	1,015 g
Água destilada <i>qsp</i>	5 ml
Obs: Manter a 4°C	

**- Solução de Glicose-6-fosfato 500mM**

Glicose-6-fosfato	0,3 g
Solução Solução K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM pH 7,8	2 ml
Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo <i>ependorf</i> e manter a - 20°C	

**- Solução de  $\beta$ -NADP 25 mM**

$\beta$ -NADP	0,037 g
Solução tampão K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 100 mM pH 7,8	2 ml
Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo <i>ependorf</i> e manter a - 20°C	

**- Solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 µl**

Glicose-6-fosfato desidrogenase 250 U

Acrescentar 2,5 ml de Solução Tampão  $K_2HPO_4$  100 mM pH 7,8 ao frasco de 250 U da glicose-6-fosfato-desidrogenase.

Obs.: Distribuir alíquotas em *eppendorfs* de 1,5 ml e manter a - 20°.

Nota: O sistema regenerador de NADPH é preparado como uma solução única. No momento de uso, as soluções de  $\beta$ -NADP 25 mM, glicose-6-fosfato 500 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 µl, são degeladas em banho de gelo e adicionadas, juntamente com a solução de  $MgCl_2$  1 M, a um tubo tipo *eppendorf*, em volumes suficientes para atingir na cubeta onde se processa a reação enzimática, as concentrações desejadas dos respectivos componentes. O sistema regenerador de NADPH deve ser mantido no banho de gelo durante todo o ensaio.

*3.2.11.4.2. - Atividade da cumarina-7-hidroxilase*

**- Solução de  $MgCl_2$  1 M**

$MgCl_2$  1,015 g

Água destilada *qsp* 5 ml

Obs: Manter a 4°C

**- Solução de Glicose-6-fosfato 500 mM**

Glicose-6-fosfato 0,3 g

Solução Tris-HCl 500 mM pH 7,4 2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo *eppendorf* e manter a - 20°C

**- Solução de  $\beta$ -NADP 25 mM**

$\beta$  -NADP 0,037 g

Solução Tris-HCl 500 mM pH 7,4 2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo *eppendorf* e manter a - 20°C

### 3.2.11.5 - Substâncias

- $\beta$ -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, N0505, *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA.
- 2-mercaptoetanol, 127991A, *Bio-Rad*
- Ácido Clorídrico, 1789 *Merck Ind. Químicas*.
- Albumina Sérica Bovina, P7656 - *Sigma Chemical Co.*, St Louis, MO, USA.
- Amido-Black, A8181 *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO, USA.
- Anticorpo Anti-IgG de Coelho conjugado, 1434, *Sigma Immunochemicals*
- Azul de Bromofenol, 130777A, *Bio-Rad*
- Benziloxiresorufina, 1 004 603, *Boehringer Mannheim GmbH*, Germany.
- Citrato de Sódio, *Vetec* 982871
- Cloreto de Magnésio 21561 - *Merck Ind. Químicas*.
- Cloreto de Potássio, 4936 *Merck Ind. Químicas*.
- Cloreto de Sódio, 10065, *Reagen Ind. Com. de Produtos Químicos LTDA*.
- Clorofórmio, 21506 - *Merck Ind. Químicas*.
- Cumarina, C-4261, *Sigma Chemical Co.*, St Louis, MO, USA.
- Dimetil Sulfoxido 802912 - *Sigma Chemical Co.*, St Louis, MO, USA.
- Ditionito de Sódio, 106507 *Merck Ind. Químicas*
- Dodecil Sulfato de Sódio, 817034, *Merck Ind. Químicas*
- D-Glicose-6-fosfato, G 7250, *Sigma Chemical Co.*, St Louis, MO, USA.
- EDTA, 25,404-5, *Aldrich*
- Etoxiresorufina, 1004611, *Boehringer Mannheim GmbH*, Germany
- Fosfato de Potássio Dibásico, 1.05.101 *Merck Ind. Químicas*
- Fosfato de Potássio Monobásico, 4873 *Merck Ind. Químicas*
- Gelatina, 13123813, *Bio-Rad*
- Glicerol, 10103 *Reagen - Quimibrás Ind. Químicas*
- Glicina P.A., 104169, *Merck Ind. Químicas*
- Glicose-6-fosfato-desidrogenase 250 U, G 6378, *Sigma Chemical Co.*, St Louis, MO, USA.
- Hidróxido de Potássio, 5033 *Merck Ind. Químicas*.

- Hidróxido de Sódio, 10109 *Reagen - Quimibrás Ind. Químicas*
- Isopropanol, UN 1447 - *Merck Ind. Químicas.*
- Kit de Revelação Fosfatase Alcalina, 170 6432, *Bio-Rad*
- Metanol, UN1230 - *Merck Ind. Químicas*
- Metileno bis- Acrilamida, K9166, *Pharmacia Biotech*
- N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, 50428B, *Bio-Rad*
- Pentoxiresorufina, 1 004 620, *Boehringer Mannheim GmbH, Germany*
- Persulfato de Amônio, 1.01201.100, *Merck Ind. Químicas*
- Reagente de Bradford (Azul de Comassie G-250), B-6916 - *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.*
- Resorufina, 23,015-4 R, *Aldrich*
- Sacarose, Sacarose Qeel C12H22O11 C.0980,08
- Tris, UN 8382 – *Merck Ind. Químicas.*
- Umbeliferona, U-7626, *Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.*

## 4 – RESULTADOS

### 4.1- Evolução da esquistossomose em camundongos: Influência da linhagem e da idade em que os animais foram infectados com *Schistosoma mansoni*.

#### 4.1.1 – Mortalidade e alterações de peso corporal.

O peso corporal no dia da infecção é apresentado na Tabela 4.1. Os dados de peso corporal no dia da infecção mostraram que o desenvolvimento pós-natal das duas linhagens estudadas (*Swiss Webster* e DBA/2) é bem diferente. O peso corporal dos camundongos da linhagem isogênica (*inbred*) DBA/2 é maior no dia 10 mas, aos 45 dias de vida, é bem menor do que o peso dos animais *outbred* (*Swiss Webster*). Possivelmente o maior peso no dia 10 de vida pós-natal reflete o fato de que as ninhadas de cepas isogênicas (e.g. DBA/2) são via de regra bem menores do que as linhagens de camundongos *outbred* (e.g. *Swiss Webster*). É bem conhecido que o menor tamanho da ninhada possibilita o maior ganho de peso dos filhotes (média de peso por ninhada) durante as fases iniciais da amamentação porque diminui a competição pelo leite materno. O menor peso dos camundongos DBA/2 na idade adulta (45 dias), por outro lado, parece ser uma característica desta linhagem *inbred* que, em vários outros aspectos, mostrou-se também menos robusta que a cepa *Swiss Webster*.

Não ocorreram mortes, ao longo do experimento, entre os animais não infectados (controles) das duas linhagens (Tabela 4.2). Entre os camundongos infectados (aos 10 ou aos 45 dias), entretanto, houve mais mortes na linhagem DBA/2 do que na *Swiss Webster*, ocorrendo a maioria dos óbitos a partir dos 55 dias de infecção, época em que o comprometimento hepatoesplênico já é evidente. Estes resultados sugerem portanto, que os camundongos *Swiss Webster* foram mais resistentes do que os DBA/2 em termos da morbimortalidade da esquistossomose mansônica (Tabela 4.2).

A partir dos pesos corporais no dia do sacrifício foi possível calcular o ganho de peso (peso no dia do sacrifício – peso no dia da infecção) durante os três períodos de evolução da doença (35, 55 e 90 dias pós-infecção) para cada grupo estudado (sexo, linhagem, época da infecção). Pode-se dizer que, de um modo geral, há uma tendência ao

ganho de peso - em determinado período - ser menor entre os animais infectados do que entre os seus respectivos controles não infectados. Todavia, uma redução de ganho de peso estatisticamente significativa só foi detectada entre os camundongos *Swiss Webster* infectados com 45 dias de vida (adultos) e sacrificados 90 dias após a infecção (Tabelas 4.3 e 4.4). Diferentemente do que ocorreu neste experimento preliminar, o menor ganho de peso dos camundongos infectados em relação aos seus respectivos controles foi detectado pela análise estatística de forma mais clara no estudo subsequente (ensaios enzimáticos - seção 4.2). A diferença de poder de detecção dos testes estatísticos nos dois casos se deveu provavelmente ao número ( $n$ ) de animais por grupo, *i.e.* 5 camundongos por grupo no estudo preliminar e 15 por grupo no segundo experimento (ensaios enzimáticos).

Tabela 4.1 – Peso (g) dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 no dia da infecção. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :		10 dias			45 dias			
Tempo de evolução após a infecção (dias):		35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss</i>	Controles	♂	5,06±0,46	3,85±0,41	4,02±0,31	37,7±2,37	33,08±3,53	37,49±2,01
		♀	4,21±0,85	3,75±0,25	3,79±0,61	39,1±2,76	35,02±2,56	34,98±3,81
<i>Webster</i>	Infectados	♂	4,71±0,85	4,46±0,26	4,65±0,19	35,92±3,36	37,54±4,12	40,83±2,86
		♀	4,23±1,04	4,68±0,63	4,64±0,61	35,06±2,75	37,53±5,22	38,62±1,03
DBA/2	Controles	♂	6,02±0,64	6,03±0,15	4,01±0,57	19,20±0,91	14,84±3,37	17,78±1,46
		♀	5,38±0,35	5,44±0,64	5,37±0,97	15,46±1,07	15,83±1,09	15,79±1,16
	Infectados	♂	5,66±0,76	5,58±0,69	3,29±0,23	17,77±2,89	19,38±2,47	17,82±2,47
		♀	5,16±0,52	5,63±0,74	4,96±1,2	17,03±0,75	17,69±1,02	16,76±1,34

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos em gramas. ( $n = 5$  por grupo)

Tabela 4.2 – Percentagem (%) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 controles (não-infectados) e infectados com *S. mansoni* que morreram durante o experimento. Os grupos experimentais foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :			10 dias			45 dias		
Tempo de evolução após a			35	55	90	35	55	90
infecção (dias):								
<i>Swiss</i>	Controles	♂	0	0	0	0	0	0
		♀	0	0	0	0	0	0
<i>Webster</i>	Infectados	♂	0	0	33,0	0	25,0	11,1
		♀	0	0	33,0	0	0	11,1
DBA/2	Controles	♂	0	0	0	0	0	0
		♀	0	0	0	0	0	0
	Infectados	♂	0	25,0	66,6	0	25,0	0
		♀	0	25,0	44,4	12,0	0	44,4

Os dados estão apresentados como percentual de óbitos por grupo

Tabela 4.3 – Peso (g) dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 no dia do sacrifício. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :		10 dias			45 dias			
Tempo de evolução após a		35	55	90	35	55	90	
infecção (dias):								
<i>Swiss</i>	Controles	♂	31,18±0,68	34,44±3,74	45,46±2,14	43,47±5,01	44,66±1,26	45,20±2,8
		♀	31,27±2,08	34,34±2,33	36,69±3,26	42,23±3,05	40,0±5,91	43,51±3,03
<i>Webster</i>	Infectados	♂	33,38±3,52	30,02±4,73	39,46±6,27	44,58±1,95	44,98±5,65	42,88±3,76
		♀	32,96±2,95	30,69±4,9	34,57±6,88	39,26±4,4	39,8±5,23	43,61±3,92
DBA/2	Controles	♂	15,92±2,05	19,82±2,1	22,91±1,18	24,17±1,0	21,45±1,87	26,25±1,09
		♀	12,46±1,55	18,1±1,74	19,6±1,79	17,52±1,74	18,23±1,57	19,59±1,65
	Infectados	♂	17,46±0,71	17,72±1,31	21,85±4,7	22,77±2,16	22,94±2,43	22,93±3,37
		♀	14,37±0,65	15,25±1,28	16,33±2,6	20,88±1,17	21,97±0,83	21,7±1,17

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos em gramas. ( $n = 5$  por grupo)

Tabela 4.4 – Ganho ponderal (g) dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, dos diferentes grupos experimentais, entre o dia da infecção e o de sacrifício. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :			10 dias			45 dias		
Tempo de evolução após a			35	55	90	35	55	90
infecção (dias):								
<i>Swiss</i>	Controles	♂	26,12±1,11	30,59±4,13	41,44±2,31	5,77±3,69	11,57±4,32	7,70±0,81
		♀	27,07±2,12	30,59±2,32	32,9±3,38	3,10±4,7	4,99±8,47	8,53±3,67
<i>Webster</i>	Infectados	♂	28,67±3,09	25,57±4,78	34,81±6,18	8,66±2,08	7,44±4,93	2,05±4,82*
		♀	28,74±3,85	26,01±4,75	29,93±6,75	4,2±2,8	2,27±3,33	4,99±3,69
DBA/2	Controles	♂	9,8±2,67	13,8±2,12	18,9±1,54	4,97±0,95	6,62±2,92	8,47±2,22
		♀	7,08±1,52	12,66±1,4	14,23±1,83	2,06±1,27	2,4±0,66	3,8±2,24
	Infectados	♂	11,8±1,05	12,14±1,73	17,46±3,98	5,0±1,21	3,56±1,28	5,11±2,4
		♀	9,21±1,0	9,62±1,82	10,37±3,36	3,83±0,9	4,28±1,65	4,94±1,83

O Δp foi analisado pelo Kruskal-Wallis seguido do teste de U de Mann-Whitney. Os valores que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles estão assinalados com um asterisco (p<0,05).

#### 4.1.2 – Índice de Penetração das Cercárias de *S. mansoni* na Infecção Experimental de Camundongos Swiss Webster e DBA/2.

Para comparar a efetividade dos 2 métodos experimentais de infecção dos camundongos determinamos, inicialmente, o índice de penetração das cercárias de *S. mansoni* em animais lactentes (10 dias) e adultos (45 dias). Cada animal (no caso de lactentes, a parte ventral do corpo; no caso de adultos, a cauda) foi exposto durante 20 minutos a um volume de água destilada contendo 100 cercárias. Em seguida, a água foi examinada ao estereomicroscópio, e apenas os corpos íntegros de cercárias remanescentes foram contados para determinação da percentagem de cercárias que penetraram (índice de penetração). O índice de penetração através da pele dos camundongos, tanto no caso de adultos quanto de lactentes, nas duas linhagens, foi de aproximadamente 98%. Como pode ser visto na tabela 4.5, a penetração percutânea das cercárias foi altamente eficiente em todos os casos, não havendo diferenças a este respeito entre os vários grupos de camundongos.

Tabela 4.5 – Índice de penetração (%) das cercárias de *S. mansoni* na infecção experimental de camundongos Swiss Webster e DBA/2, lactentes e adultos. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :		10 dias			45 dias		
		Tempo de evolução após a infecção (dias):					
		35	55	90	35	55	90
Swiss Webster	♂	99,6±0,55	100,0±0,0	99,0±1,0	100,0±0,0	99,0±1,0	99,8±0,45
	♀	99,2±0,45	99,2±0,4	100,0±0,0	96,0±0,89	99,6±0,89	99,0±1,0
DBA/2	♂	99,2±0,45	99,8±0,45	99,7±0,58	98,0±4,47	98,0±1,87	98,0±3,39
	♀	99,2±1,3	99,6±0,55	99,8±0,45	98,2±2,95	99,0±1,22	96,2±2,49

Valores representados como média ± DP das percentagens de cercárias que penetraram durante vinte minutos de exposição por via percutânea. (n por grupo = 5). O índice de penetração foi analisado pelo Kruskal-Wallis. Neste caso, a diferença entre controles e infectados não foi estatisticamente significativa (p>0,05).

Assim sendo, eventuais diferenças entre os grupos de camundongos quanto à severidade de evolução da esquistossomose, não se devem as dessemelhanças quanto a penetração do *S. mansoni*, mas sim à capacidade de sobrevivência do parasito após a penetração, *i.e.* a capacidade dos esquistossômulos de se transformarem em vermes

adultos. A alta eficiência de penetração obtida neste estudo indica que as condições laboratoriais foram adequadas e asseguraram a manutenção da vitalidade das cercárias durante o processo de infecção.

#### 4.1.3 – Número de Vermes Recuperados

Embora a penetração percutânea das cercárias de *S. mansoni* em camundongos seja altamente eficiente, na melhor das hipóteses, apenas 35 a 40% delas são recuperadas posteriormente como vermes adultos (Warren & Peters, 1967; Ghandour & Webbe, 1976). A proporção de helmintos recuperados posteriormente como vermes adultos parece depender de variáveis tais como a cepa de *S. mansoni* a que pertencem as cercárias, a linhagem do hospedeiro, a idade do hospedeiro e a outros fatores. Neste estudo, constatamos que o percentual de vermes adultos recuperados foi função da linhagem do camundongo, da idade em que ocorreu a infecção e do tempo de evolução da doença após a infecção (Tabela 4.6).

As percentagens de recuperação obtidas por Warren & Peters (1967) e por Ghandour & Webbe (1976) foram semelhantes às que obtivemos com camundongos *Swiss Webster* infectados aos 10 dias de vida e sacrificados 35 dias após a infecção, apesar das diferenças quanto a cepa de *S. mansoni* (*Porto Rico*), a carga parasitária, ao tempo de duração da doença, e a idade do hospedeiro no momento da infecção. Por outro lado, De-Carvalho *et. al.*; (1994) utilizando camundongos *Swiss Webster* infectados na idade adulta, cargas parasitárias semelhantes e cercárias de *S. mansoni* da cepa BH, obtiveram índices de penetração semelhantes e percentual de recuperação de vermes adultos próximos do encontrado neste estudo.

Como o índice de penetração foi praticamente idêntico para todos os grupos, os percentuais de recuperação mais elevados, nas duas linhagens, foram observados nos animais infectados com 10 dias de vida e sacrificados 55 dias após a infecção (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Número de vermes adultos (*S. mansoni*) recuperados em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção:	10 dias	45 dias
--------------------	---------	---------

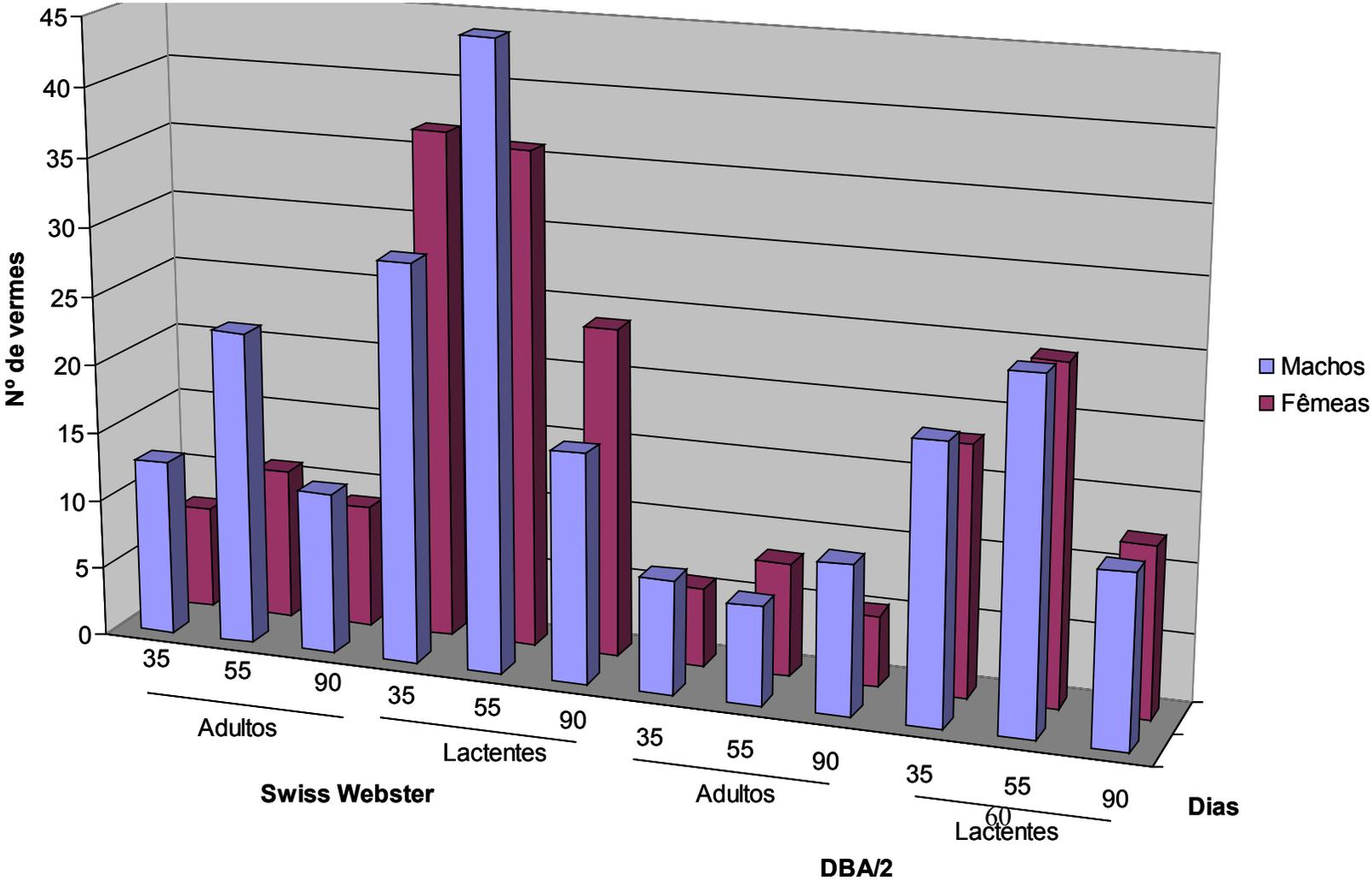
Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss Webster</i>	♂	35,2±10,1	51,0±10,5 <sup>abc</sup>	14,6±3,72 <sup>b</sup>	15,0±3,0	22,0±2,83 <sup>a</sup>	11,8±1,77
	♀	40,4±7,98 <sup>a</sup>	36,4±3,76 <sup>ab</sup>	21,8±2,65 <sup>b</sup>	11,4±3,0 <sup>a</sup>	11,6±2,0 <sup>a</sup>	8,8±3,31
DBA/2	♂	18,6±5,8	27,2±3,62 <sup>ac</sup>	13,3±4,98	8,4±2,25	8,0±0,83 <sup>a</sup>	10,6±0,81
	♀	19,2±2,89 <sup>a</sup>	23,6±3,56 <sup>a</sup>	12,4±1,29 <sup>a</sup>	6,4±1,29 <sup>a</sup>	10,6±1,03 <sup>a</sup>	4,6±1,21 <sup>a</sup>

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão do número de vermes recuperados em cada grupo estudado ( $n=5$  por grupo). O número de vermes recuperados foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste  $U$  de Mann-Whitney, sendo considerados significativos quando  $p<0,05$ . Os valores que diferiram quando comparações entre animais infectados lactentes e adultos foram feitas, estão assinalados com  $a$  (mesma linha). Aqueles que diferiram quando foram feitas comparações entre os tempos de evolução da doença (35, 55 e 90) para cada idade de infecção (lactentes e adultos) estão assinalados com  $b$ , e os valores diferentes para as comparações entre linhagens estão assinalados com  $c$  (mesma coluna).

Como pode ser visto no gráfico 4.1 e na tabela 4.6 a recuperação de vermes adultos foi: 1) menor nos camundongos da linhagem DBA/2 quando comparado aos *Swiss Webster*; 2) maior nos animais infectados com 10 dias de vida em comparação com os da mesma linhagem os infectados com 45 dias; 3) maior aos 55 dias de evolução da doença do que 35 ou 90 dias após a infecção.

O exame ao estereomicroscópio dos vermes recuperados revelou diferenças interessantes entre helmintos obtidos 35, 55 ou 90 dias após a infecção. Em geral, os helmintos recuperados após 35 dias de infecção eram muito alongados e finos e, além disso, não diferiam muito -externamente- entre sexos. Esta observação sugerindo que, neste momento, os vermes ainda não haviam atingido plenamente a maturidade sexual é coerente com o escasso número de ovos encontrados, tanto no fígado quanto no intestino, nos camundongos sacrificados 35 dias após a infecção. Já os vermes obtidos de camundongos sacrificados 55 e 90 dias após a infecção, exibiam claro dimorfismo sexual e, freqüentemente, apareciam acasalados (*i.e.* a fêmea no canal ginecóforo do macho).

Gráfico 4.1 – Vermes adultos (*S. mansoni*) recuperados após perfusão do fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com 10 (lactentes) e 45 (adultos) dias de vida e sacrificados com 35, 55 e 90 dias da evolução da doença.



Além do número total de vermes, registramos também o número de machos e fêmeas encontrados em cada camundongo. A partir deste registro, analisamos o número de “casais” de vermes por animal. A intensidade da ovoposição e, conseqüentemente, da formação de granulomas no tecido hepático, estaria, em princípio, mais diretamente relacionada ao número de “casais” do que ao número total de vermes encontrados em cada animal. Os resultados mostraram entretanto que o número de “casais” de vermes acompanhou o número total de helmintos encontrados em cada camundongo (gráfico 4.1 e tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Número de “casais” de vermes (*S. mansoni*) recuperados em camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção:		10 dias			45 dias		
Tempo de evolução após a infecção (dias):		35	55	90	35	55	90
<i>Swiss</i>	♂	15,4±5,23	22,8±2,06	6,2±1,39	6,8±1,07	10,2±1,39	5,4±1,03
<i>Webster</i>	♀	17,4±3,04	16,6±2,04	9,4±1,60	5,20±1,59	5,4±0,87	3,8±1,39
<i>DBA/2</i>	♂	7,8±3,06	12,2±1,62	6,0±2,31	3,8±1,16	3,6±0,4	4,8±0,37
	♀	6,8±0,91	8,0±1,38	5,6±0,51	2,8±0,58	5,0±0,54	1,4±0,24

Os valores estão apresentados como média±erro padrão do número de vermes recuperados em cada grupo estudado ( $n = 5$ ).

#### 4.1.4 – Número de ovos encontrados no fígado e nos intestinos.

Após a perfusão e recuperação dos vermes, o fígado e os intestinos de cada camundongo foram retirados e digeridos com hidróxido de potássio a 4%. Aproximadamente 16 horas depois, o número de ovos existentes em cada órgão foi contado.

Além da infecção por *S. mansoni* os camundongos utilizados neste estudo estavam parasitados por outros helmintos. Ovos de três outros parasitas foram detectados após a digestão com hidróxido de potássio a 4%: *Aspiculuris sp*, *Syphacia sp* e *Vampirolepis sp*. A prevalência destes parasitas, tanto nos camundongos do experimento preliminar quanto nos camundongos dos ensaios enzimáticos, ocorreu na mesma intensidade em controles e infectados das duas linhagens e nas duas idades de infecção com *S. mansoni* (dados não

apresentados). Padrão semelhante de infecção de animais de laboratório por helmintos já havia sido relatado por Gonçalves *et. al.*, (1998) em estudo recentemente realizado no Brasil.

Os dados aqui apresentados sugerem que a ovoposição teve início aproximadamente 35 dias após a infecção, nas duas linhagens e independentemente da idade em que o camundongo foi infectado. A análise macroscópica dos fígados dos camundongos sacrificados 35 dias após a infecção mostrou órgãos aparentemente normais. Nos animais sacrificados 55 e 90 dias após a infecção, entretanto, foi possível observar a olho desarmado que o fígado apresenta-se mais escuro e com a superfície rugosa. Poucos e, freqüentemente nenhum ovo era encontrado nos fígados e intestinos de camundongos sacrificados 35 dias após a infecção, independente da linhagens ou idade de infecção. Camundongos *Swiss Webster*, independente das idades de infecção, possuíam via de regra mais ovos por fígado do que os correspondentes DBA/2. Por outro lado, dentro de cada linhagem, os animais infectados enquanto lactentes (10 dias) apresentaram maior número de ovos do que os animais infectados quando adultos (45 dias) (Gráfico 4.2).

No gráfico 4.2 e tabela 4.8 pode-se notar que o número de ovos por fígado tende a aumentar com a duração da evolução da doença, *i.e.* com o tempo decorrido entre a infecção e o sacrifício dos animais (35, 55 ou 90 dias).

De um modo geral, independente do grupo, os intestinos abrigaram uma quantidade substancialmente maior de ovos do que o fígado dos animais. Observamos até 750.000 ovos por intestino, enquanto no fígado o valor máximo encontrado foi de 250.000 ovos / órgão.

O número de ovos no intestino variou de forma semelhante àquela observada no fígado. Camundongos DBA/2 apresentaram quantidade de ovos menor nos intestinos do que os seus correspondentes *Swiss Webster*, sendo que o número de ovos nos animais daquela linhagem *inbred* infectados enquanto lactentes foi maior do que o número de ovos

encontrados nos que foram infectados com 45 dias ( Gráfico 4.3). Tal como constatado no fígado, o número de ovos por intestino também aumentou com o tempo de evolução da doença (Gráfico 4.3, Tabela 4.9).

Gráfico 4.2 – Número de ovos de *S. mansoni* no fígado de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, infectados com 10 (lactentes) e 45 (adultos) dias de idade e sacrificados com 35, 55 e 90 dias da evolução da doença.

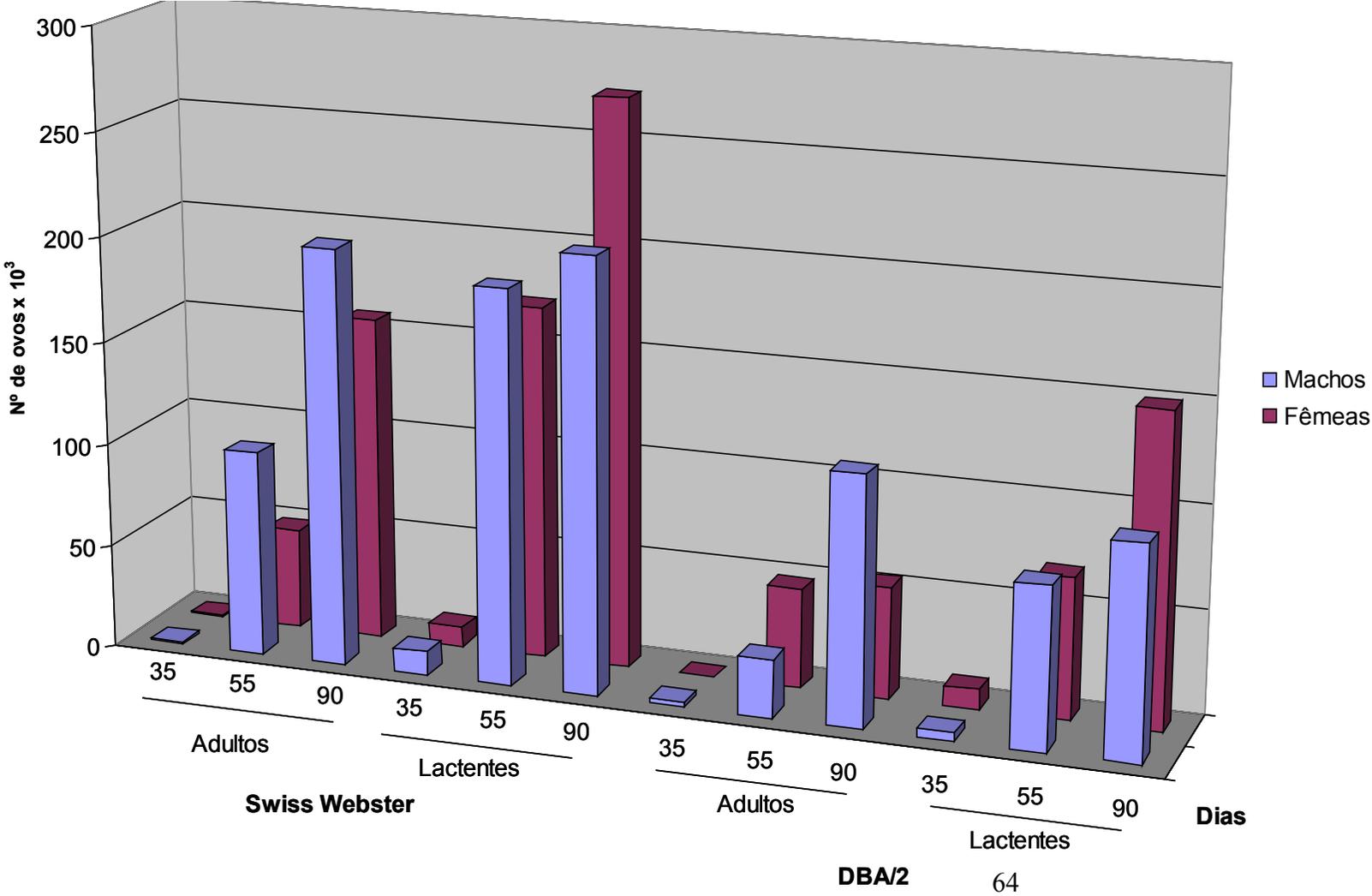


Gráfico 4.3 – Número de ovos de *S. mansoni* no intestino de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, infectados com 10 (lactentes) e 45 (adultos) dias de idade e sacrificados com 35, 55 e 90 dias da evolução da doença.

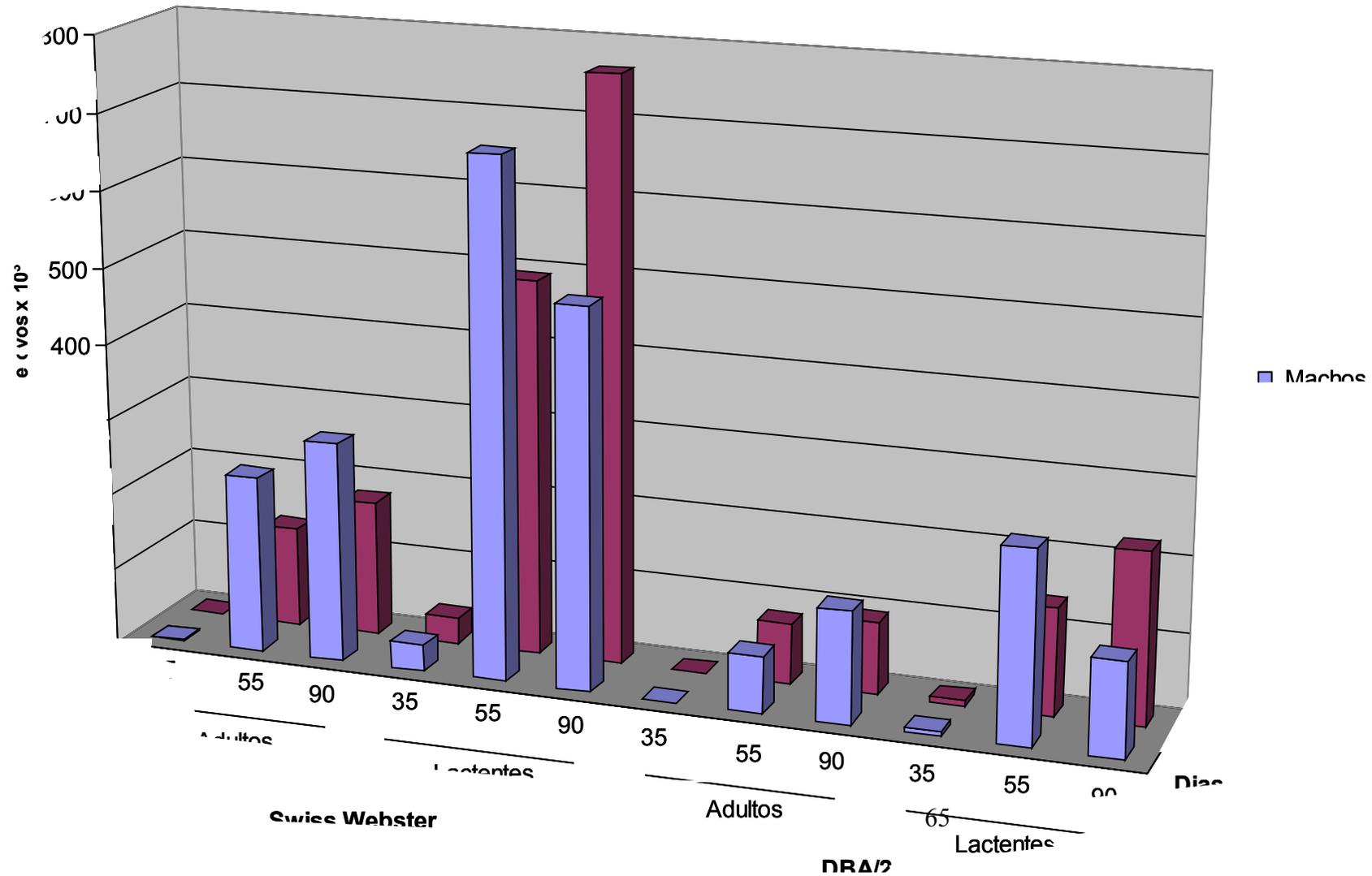


Tabela 4.8 – Número de ovos ( $\times 10^3$ ) de *S. mansoni* recuperados nos fígados de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção:		10 dias			45 dias		
		35	55	90	35	55	90
Tempo de evolução após a infecção (dias):							
<i>Swiss Webster</i>	♂	1,58±0,33 <sup>abc</sup>	23,65±3,41 <sup>abc</sup>	22,86±2,66	0,10±0,01 <sup>ab</sup>	10,6±1,27 <sup>abc</sup>	22,8±3,34 <sup>c</sup>
	♀	1,23±0,22 <sup>abc</sup>	16,18±1,81 <sup>abc</sup>	27,36±3,2 <sup>b</sup>	0,01±0,06 <sup>ab</sup>	4,8±0,38 <sup>ab</sup>	18,74±3,0 <sup>b</sup>
<i>DBA/2</i>	♂	0,43±0,08 <sup>abc</sup>	7,90±0,87 <sup>abc</sup>	17,12±3,24 <sup>b</sup>	0,076±0,04 <sup>a</sup>	3,34±0,48 <sup>ac</sup>	13,41±0,88 <sup>c</sup>
	♀	0,63±0,23 <sup>bc</sup>	7,27±1,93 <sup>abc</sup>	15,01±3,32 <sup>ab</sup>	0,0±0,0	3,25±0,54 <sup>a</sup>	3,84±0,43 <sup>a</sup>

Os valores estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão do número de ovos recuperados a partir de fígados em cada grupo estudado ( $n=5$  por grupo). O número de ovos foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *U* de Mann-Whitney. Valores estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ) são assinalados com letras sobrescritas: *a* comparações entre idades em que ocorreu a infecção (mesma linha); *b* comparações entre os tempos de evolução da doença (35, 55 e 90) (mesma linha); *c* comparações entre linhagens estão assinalados com (mesma coluna).

Tabela 4.9 – Número de ovos de *S. mansoni* recuperados nos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção:		10 dias			45 dias		
Tempo de evolução após a		35	55	90	35	55	90
infecção (dias):							
<i>Swiss Webster</i>	♂	2,85±0,48 <sup>abc</sup>	69,03±5,7 <sup>abc</sup>	42,93±8,0 <sup>b</sup>	0,11±0,02 <sup>ab</sup>	21,4±2,4 <sup>abc</sup>	32,6±6,3 <sup>b</sup>
	♀	1,41±0,24 <sup>abc</sup>	46,28±5,6 <sup>abc</sup>	36,48±4,2 <sup>c</sup>	0,08±0,05 <sup>a</sup>	13,9±0,5 <sup>ac</sup>	27,4±4,3 <sup>c</sup>
<i>DBA/2</i>	♂	0,75±0,28 <sup>bc</sup>	27,89±3,33 <sup>abc</sup>	23,17±0,9 <sup>a</sup>	0,0±0,0	8,90±1,44 <sup>ac</sup>	15,18±1,61 <sup>a</sup>
	♀	0,71±0,08 <sup>bc</sup>	11,30±1,8 <sup>bc</sup>	22,54±3,18 <sup>abc</sup>	0,0±0,0	8,75±1,72 <sup>c</sup>	6,43±1,0 <sup>ac</sup>

Os valores estão apresentados como média ± erro padrão do número de ovos recuperados a partir de intestinos em cada grupo estudado ( $n=5$  por grupo). O número de ovos foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *U* de Mann-Whitney. Valores estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ) são assinalados com letras sobrescritas: *a* comparações entre idades em que ocorreu a infecção (mesma linha); *b* comparações entre os tempos de evolução da doença (35, 55 e 90) (mesma linha); *c* comparações entre linhagens estão assinalados com (mesma coluna).

#### 4.1.5 – Conclusões

Este estudo preliminar foi necessário para conhecer melhor o modelo experimental (inflamação granulomatosa hepática pela infecção por *S. mansoni*) escolhido para investigar os efeitos da esquistossomose e de processos inflamatórios sobre enzimas citocromos P450. Necessitávamos conhecer a susceptibilidade dos hospedeiros (linhagens), a carga parasitária ideal e fixar o momento da infecção e o tempo pós-infecção em que realizaríamos os ensaios para determinar a atividade de isoformas CYP hepáticas.

É relativamente extensa a literatura sobre a infecção de camundongos *Swiss Webster* por *S. mansoni*, empregando os mais variados desenhos experimentais. Bem mais escassas, entretanto, são as informações sobre a infecção de linhagens *inbreed* e, quase inexistentes, são os estudos que utilizam como hospedeiro definitivo os camundongos DBA/2 (Fanning *et al.*, 1981; Colley & Freeman, 1983; Cheever *et al.*, 1987). Neste caso a linhagem DBA/2, por ser esta uma das poucas linhagens de camundongos que expressa bem CYP2A5 (Iersel *et al.*, 1994), é de suma importância para alcançar os objetivos do estudo.

Os resultados do experimento preliminar indicaram que, via de regra, os camundongos DBA/2 apresentaram índices de recuperação de vermes adultos e número de ovos no fígado e intestinos menores do que aqueles exibidos pela linhagem *outbred Swiss Webster*. Estes achados sugerem que os DBA/2 seriam menos susceptíveis à infecção (proporção menor das cercárias que penetraram dariam origem a vermes maduros). Por outro lado, entretanto, a morbi-mortalidade da esquistossomose pareceu ser maior entre os camundongos DBA/2 do que entre os *Swiss Webster*.

Outra forma de investigar diferenças entre linhagens é investigar a natureza da lesão hepática (granuloma) empregando técnicas histopatológicas e/ou imunohistoquímicas, o que está além dos objetivos deste trabalho. Vale a pena citar todavia alguns relatos neste sentido. Fanning *et al.* (1981), por exemplo, observaram pequenos granulomas em camundongos DBA/2 infectados por *S. mansoni* o que contrasta com os achados de Colley & Freeman (1983) que viram grandes granulomas em camundongos desta linhagem sacrificados após 8 semanas de infecção. Cheever *et al.*, (1987) relataram que os fígados de camundongos *outbred* infectados por *S. mansoni*

exibem, geralmente, granulomas de maior tamanho e com fibrose mais extensa do que os camundongos *inbred*. É conhecido porém, que não é o tamanho do granuloma, mas sim o grau de fibrose causado no órgão que está relacionado à gravidade da doença. É importante considerar que estes indicadores da patologia hepática dependem do tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (Cheever et al., 1987).

Camundongos das duas linhagens infectados enquanto lactentes (10 dias após o nascimento) apresentaram índices de recuperação de vermes adultos e número de ovos no fígado e intestinos maiores do que os infectados com 45 dias de vida. Está fora dos objetivos deste estudo investigar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a estas diferenças. Vale lembrar que as relações parasito hospedeiros são complexas e estão longe de serem óbvias. É sabido, por exemplo, que no caso da esquistossomose mansônica a imunodepressão pós-infecção reduz a recuperação de vermes adultos (Harrison & Doenhoff, 1983), *i.e.* prejudica o amadurecimento do parasito no organismo.

Os dados deste estudo preliminar, sugerindo que a ovoposição, independente da linhagem e idade de infecção, tem início aproximadamente 35 dias após a infecção, encontra amparo nos dados publicados por Lenzi *et al.*, (1998). Estes autores relataram que a oviposição começa aproximadamente 35 dias após a infecção, estando completamente estabelecida aos 55 dias e envolvendo por volta de 90 dias após a infecção (Lenzi *et al.*, 1998).

A infecção dos animais aos 10 dias de vida (lactentes) nos pareceu vantajosa sob vários aspectos. Como vimos, em termos de penetração das cercárias no hospedeiro, as duas idades e os dois métodos de infecção são igualmente eficientes. Assim sendo, a primeira vantagem, sem dúvida, é a facilidade da técnica de infecção nesta idade (10 dias), de execução mais simples e de menor risco, comparada à infecção de camundongos adultos. Outro ponto importante a ser considerado é o fato de que os animais que são infectados quando adultos (aprox. 45 dias), estão muito mais velhos no momento do sacrifício (35, 55 ou 90 dias após a infecção) o que não é interessante porque os efeitos da doença que pretendemos estudar podem se superpor aos do envelhecimento.

Em conclusão, a partir dos dados do estudo preliminar definimos que o experimento subsequente para investigar as alterações causadas pela esquistossomose mansônica em CYP hepáticos envolveria camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e

fêmeas, infectados enquanto lactentes (10 dias de vida) e sacrificados 55 dias após a infecção. Procuramos, neste trabalho inicial, evidenciar apenas o que ocorre na fase intermediária do desenvolvimento da doença e, por esta razão, o sacrifício ocorreu 55 dias após a infecção. Estudos posteriores estão previstos para avaliar as alterações de CYP que ocorrem aos 35 e 90 dias de evolução da esquistossomose mansônica murina.

## 4.2 – Alterações de CYP das subfamílias 1A, 2A e 2B no fígado de camundongos 55 dias após a infecção com *S. mansoni*.

### 4.2.1 – Infecção de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2* aos 10 dias de vida: Índice de penetração das cercárias de *S. mansoni*.

A eficiência da infecção foi avaliada determinando-se a taxa de penetração das cercárias no hospedeiro. Como descrevemos nos métodos, cada camundongo foi exposto, em placa de Petri contendo água destilada, a 100 cercárias, por vinte minutos. Em seguida a placa de Petri foi examinada ao estereomicroscópio sendo contadas as cercárias íntegras que restavam, *i.e.* as que não haviam penetrado, obtendo-se assim o índice (percentual) de penetração. É descrito na literatura que apenas cerca de um terço das cercárias que penetram através da pele de camundongos são posteriormente recuperadas como vermes adultos vivos, o que sugere que a maior parte das cercárias que penetram morrem antes de atingir a maturidade reprodutiva no hospedeiro definitivo.

Confirmando o que havíamos observado nos experimentos preliminares (seção 4.1.2), e o que é relatado na literatura, constatamos que o índice de penetração, em ambos os sexos e nas duas linhagens de camundongos, variou de 94 a 100 % o que comprova a alta eficiência do parasito em penetrar através da pele do hospedeiro definitivo. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre sexos ou entre linhagens de camundongos quanto ao índice de penetração. Os índices de penetração obtidos são apresentados na tabela 4.10

Tabela 4.10 – Infecção experimental de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, com 10 dias de vida, com *S. mansoni* : Índice de penetração (%) das cercárias.

<b>Linhagem:</b>	<i>Swiss Webster</i>		<i>DBA2</i>	
Sexo:	♂	♀	♂	♀
IP (%):	98±2	98±2	97±3	99±2

Valores apresentados como média ± DP das percentagens de cercárias que penetraram durante vinte minutos de exposição por via percutânea. (N por grupo = 15). O teste de Kruskal-Wallis não revelou diferenças entre os quatro grupos quanto ao índice de penetração ( $p > 0,05$ ).

#### ***4.2.2 - Alterações do peso corporal e dos pesos do fígado e baço em camundongos infectados por *S. mansoni*.***

O peso corporal de cada animal foi registrado, inicialmente, no momento da infecção aos 10 dias de vida (peso na infecção) e 55 dias depois quando os camundongos foram sacrificados (65 dias de vida, peso do sacrifício).

Como pode ser visto na tabela 4.11, os pesos corporais no dia da infecção foram razoavelmente homogêneos entre grupos, não diferindo estatisticamente entre controles não infectados e infectados, exceto quanto ao fato das fêmeas DBA/2 infectadas terem apresentado peso ligeiramente inferior ao das não infectadas ( $p = 0,039$ ).

Os pesos corporais no momento do sacrifício (55 dias pós-infecção), e os ganhos de peso entre os dias da infecção e do sacrifício (peso no dia do sacrifício – peso no dia da infecção), são apresentados na tabela 4.11.

É interessante notar que os *déficits* de variação ponderal ou ganho de peso entre a infecção e o sacrifício, refletem os efeitos da doença - esquistossomose mansônica – sobre o desenvolvimento pós-natal dos camundongos do período de amamentação (10 dias) até a idade adulta (65 dias de vida). Como pode ser constatado na tabela 4.11, a infecção pareceu diminuir o ganho de peso dos camundongos das linhagens *Swiss Webster* e DBA/2 de ambos os sexos.

O ganho de peso dos camundongos controles não-infectados das linhagens *Swiss Webster* e DBA/2 foi diferente. Os camundongos *Swiss Webster* ganharam ao longo dos 55 dias aproximadamente 2,5 vezes mais peso do que os da linhagem DBA/2 (tabela 4.11). Nas duas linhagens e em ambos os sexos, os animais infectados tiveram ganho de peso menor do que os seus respectivos controles não infectados mostrando que a esquistossomose mansônica reduziu o ganho ponderal dos camundongos (tabela 4.11).

Tabela 4.11 – Evolução ponderal de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni*: Peso corporal (g) nos dias da infecção (dia PN 10) e do sacrifício (dia PN 65) e ganho de peso ( $\Delta p$ ) (g).

	<i>Swiss Webster</i>				DBA/2			
	Controle		Infectado		Controle		Infectado	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Infecção (g)	5,68±0,99	4,89±1,12	5,56±0,91	5,75±0,80	4,91±1,13	4,94±0,65	4,39±0,55	4,29±0,81*
Sacrifício(g)	39,20±4,87	35,08±4,19	31,91±4,60*	28,53±4,57*	19,55±1,52	16,56±3,96	14,11±3,17*	13,12±2,76*
$\Delta p$ (g)	33,5±4,9	30,2±4,0	26,2±3,7*	22,78±3,7*	14,6±1,0	11,6±3,9	9,7±3,2*	8,8±2,35*

Os dados são a média±DP dos pesos corporais do ganho de peso ( $\Delta p$ ) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 15$  por grupo). PN : dia de vida pós-natal.  $\Delta p =$  peso 65 PN – peso 10 PN. Os pesos corporais foram analisados pela ANOVA seguida do teste *t* de Student. O  $\Delta p$  foi analisado pelo Kruskal-Wallis seguido do teste de *U* de Mann-Whitney. Os valores que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não-infectados estão assinalados com um asterisco ( $p < 0,05$ ).

Os pesos absoluto e relativo do fígado dos animais não infectados variaram pouco entre linhagens e sexos (tabela 4.12). Entretanto, o peso do fígado dos camundongos *Swiss Webster* infectados foi maior do que dos seus respectivos controles não infectados. Este aumento da massa hepática em decorrência da infecção foi ainda mais evidente quando o peso relativo do órgão dos infectados é comparado com aquele dos controles não infectados (tabela 4.12). O aumento do peso absoluto do fígado dos camundongos da linhagem DBA/2 infectados foi menos evidente (não diferindo estatisticamente dos não infectados) possivelmente porque estes animais exibiram também uma acentuada diminuição de peso corporal em relação aos seus controles. Assim sendo, quando as comparações são feitas em termos de peso hepático relativo torna-se claro que esta linhagem isogênica (DBA/2) também apresentou um aumento do fígado em consequência da infecção (tabela 4.12).

Ainda mais evidente do que o aumento do fígado, foi crescimento esplênico em decorrência da infecção. Neste caso, o peso absoluto do baço foi maior nos infectados, machos e fêmeas *Swiss Webster* e machos DBA/2, em relação aos seus respectivos controles não infectados. O peso do baço das fêmeas DBA/2 infectadas não diferiu estatisticamente daquele das controles não infectadas provavelmente em virtude da grande variabilidade dos valores obtidos (grande desvio padrão). Quando o peso relativo dos baços foram calculados e comparados, o aumento do peso esplênico dos camundongos infectados em relação aos respectivos controles foi detectado estatisticamente em todos os casos, *i.e.* nas duas linhagens e nos dois sexos (tabela 4.12).

#### ***4.2.3 – Alterações dos níveis totais de citocromos P450 no fígado.***

Os resultados da quantificação dos níveis totais de CYP são apresentados na tabela 4.13 e no gráfico 4.4.

Os camundongos infectados das duas linhagens, quando comparados aos respectivos controles não infectados, apresentaram uma drástica redução da concentração total de CYPs hepáticos. Os camundongos DBA/2 machos infectados apresentaram níveis totais de CYP aproximadamente 4,75 vezes menores do que os seus respectivos controles não

infectados. As fêmeas DBA/2 infectadas mostraram uma diminuição ainda mais acentuada - cerca de 7,8 vezes - dos níveis totais de CYP em relação às controles não infectadas. Os camundongos *Swiss Webster* machos infectados tiveram uma redução de cerca de 7,0 vezes nos níveis de CYP totais em relação aos respectivos controles não infectados. No caso das fêmeas *Swiss Webster* infectadas a diminuição observada em relação às não infectadas, aproximadamente 2,1 vezes, foi menos acentuada do que a constatada nos machos da mesma linhagem (7,0 x) ou nas fêmeas DBA/2 (7,8 x).

Tabela 4.12 – Alterações do peso absoluto (g) e relativo do fígado e baço em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

	<i>Swiss Webster</i>				DBA/2			
	Controle		Infectado		Controle		Infectado	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<b>Peso do Fígado</b>								
Absoluto (g)	1,69±0,31	1,47±0,37	2,30±0,47*	2,35±0,37*	0,99±0,09	0,88±0,1	1,05±0,33	0,98±0,21
Relativo (%)	4,33±0,64	4,22±1,0	7,21±1,3*	8,24±2,0*	5,08±0,49	5,62±1,4	7,44±1,32*	7,51±0,67*
<b>Peso do Baço</b>								
Absoluto (g)	0,202±0,07	0,213±0,04	0,48±0,16*	0,48±0,12*	0,092±0,02	0,10±0,03	0,13±0,06*	0,21±0,22
Relativo (%)	0,52±0,16	0,61±0,09	1,52±0,46*	1,67±0,41*	0,47±0,12	0,61±0,23	1,52±0,46*	1,67±0,41*

Os dados são a média±DP do peso absoluto em gramas e o peso relativo ([peso do órgão / peso corporal] x 100) do fígado e baço de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 (N = 15 por grupo). Os pesos absolutos foram analisados pela ANOVA seguida do teste *t* de Student e os pesos relativos pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de *U* de Mann-Whitney. Os valores que diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos seus respectivos controles não infectados são assinalados com um asterisco.

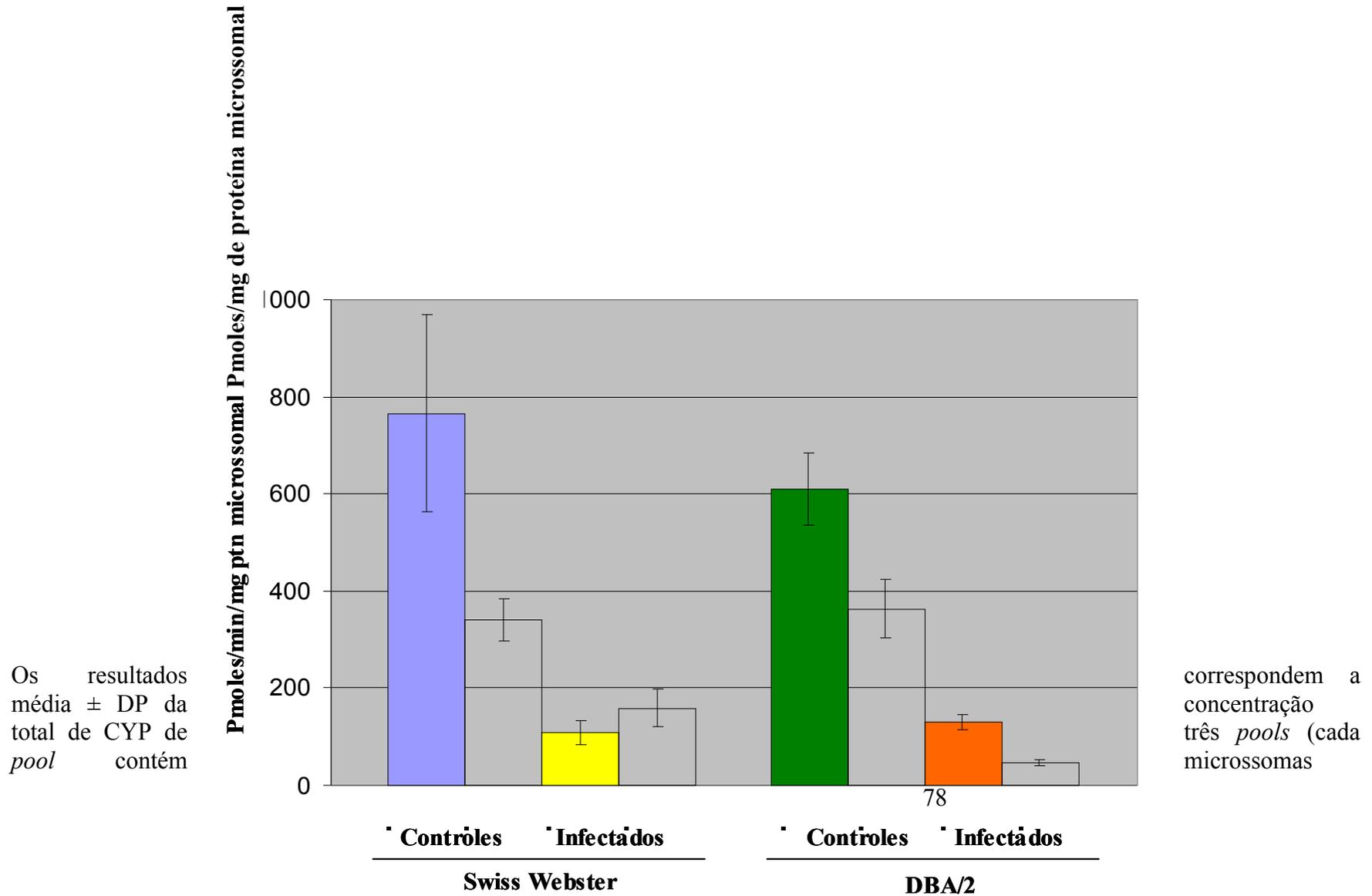
Tabela 4.13 – Diminuição dos níveis totais de CYP hepáticos em camundongos, machos e fêmeas, *Swiss Webster* e DBA/2, infectados por *S. mansoni* em relação aos respectivos controles não infectados.

Linhagem	Sexo	Diminuição de CYP Totais
		(níveis em controles ÷ níveis em infectados)
<i>Swiss Webster</i>	♂	7,0 x
	♀	2,1 x
DBA/2	♂	4,75 x
	♀	7,8 x

As concentrações totais de CYP em animais não infectados, aparentemente, não diferiram entre linhagens. Machos *Swiss Webster* e DBA/2 controles não infectados apresentaram níveis de CYP totais da ordem de 765,6±202,0 e 610,3±73,4 pmoles/mg de proteína microssomal, respectivamente ( $p>0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre linhagens também com as fêmeas não infectadas. Fêmeas controle *Swiss Webster* e DBA/2, apresentaram concentrações de CYP totais da ordem de 340,7±42,6 e 363,2±59,5 pmoles/mg de proteína microssomal, respectivamente ( $p>0,05$ ).

Entretanto, considerando agora a mesma linhagem, diferenças entre sexos foram marcantes. Controles *Swiss Webster* machos apresentaram valores de 765,6±202,0 pmoles/mg de proteína microssomal, enquanto as fêmeas controle da mesma linhagem 340,7±42,9 pmoles/mg de proteína microssomal ( $p\leq 0,05$ ). O mesmo ocorreu para os camundongos controle DBA/2 machos, apresentando 610,3±73,4 pmoles/mg de proteína microssomal, e as fêmeas, 363,2±59,5 pmoles/mg de proteína microssomal ( $p\leq 0,05$ ).

Gráfico 4.4 – Alterações da concentração total de citocromos P450 no fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 55 dias após a infecção por *S.mansoni*.



hepáticos de 3 animais) e são expressos em pmoles de CYP/mg de proteína microsomal. Os dados foram analisados por ANOVA seguida do teste *t* de Student. Os valores que diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos respectivos controles não infectados estão assinalados com um asterisco.

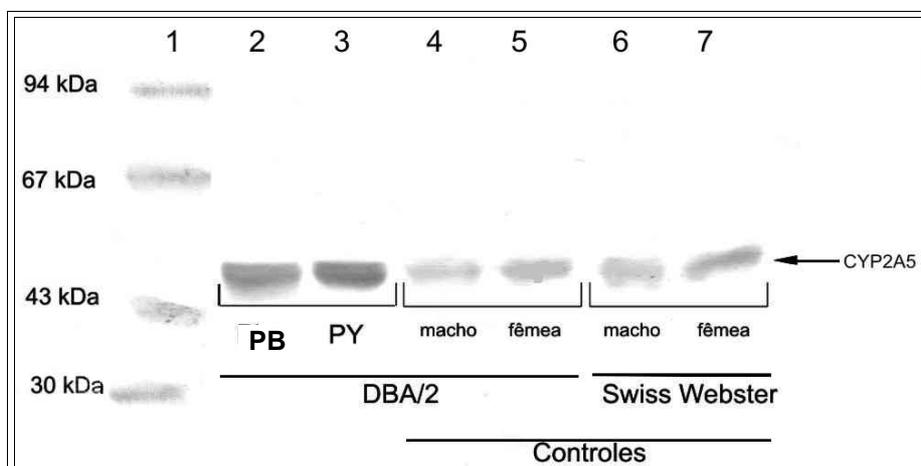
#### ***4.2.4 – Expressão das apoproteínas CYP2A5 e CYP1A no fígado de camundongos controles e infectados com *S.mansoni* avaliada por meio de Western Blotting***

##### ***4.2.4.1 – CYP2A5***

O anticorpo anti-CYP2A5 reconheceu bandas de peso molecular semelhante ao peso descrito de CYP2A5 (aproximadamente 49,5 kDa, Lang *et al.*, 1989) em todos os animais testados (Figuras 4.1 a 4.3). Para confirmar que estas bandas correspondiam de fato a CYP2A5, incluímos amostras de fração microssomal hepática de animais previamente tratados com indutores clássicos desta isoenzima tais como o pirazol (PY) e o fenobarbital (PB). As frações microssomais do *pool* PY bem como do *pool* PB foram gentilmente cedidas pela Pesquisadora Ana Cecília A.X. De-Oliveira - FIOCRUZ. Os animais induzidos com pirazol receberam 100 mg de PY /kg /dia por via i.p durante 5 dias, tal como sugerido por Juvonen *et al.*, (1985). Os camundongos induzidos com fenobarbital também foram tratados durante 5 dias por via i.p, recebendo a dose de 30 mg/kg no primeiro dia e a dose de 60 mg/kg/dia nos 4 dias subseqüentes do tratamento. A fração microssomal foi obtida de *pools* de 5 fígados de camundongos DBA/2 fêmeas com aproximadamente 10 semanas de idade, oriundos do CECAL-FIOCRUZ. Além destes dois controles (não-infectados) induzidos, quatro outros controles (não infectados e não induzidos) foram incluídos, correspondendo a um macho e uma fêmea DBA/2, e um macho e uma fêmea *Swiss Webster*.

A membrana obtida (figura 4.1) revelou bandas densas, correspondentes a proteínas com peso molecular próximo a 49,5 kDa, nos animais tratados PY e PB. Bandas de proteínas com o mesmo peso molecular também foram observadas nos outros animais testados, porém com menor intensidade, o que sugere maiores quantidades da apoproteína CYP2A5 nos animais tratados com PB e PY, quando comparados aos controles não induzidos.

Figura 4.1 – Análise da expressão de CYP2A5 por *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP2A5 de camundongos.



Nas canaletas do gel relativas aos camundongos DBA/2 foram adicionados 20  $\mu$ g de proteína microssomal e 50  $\mu$ g de proteína microssomal nas canaletas relativas aos camundongos *Swiss Webster*.

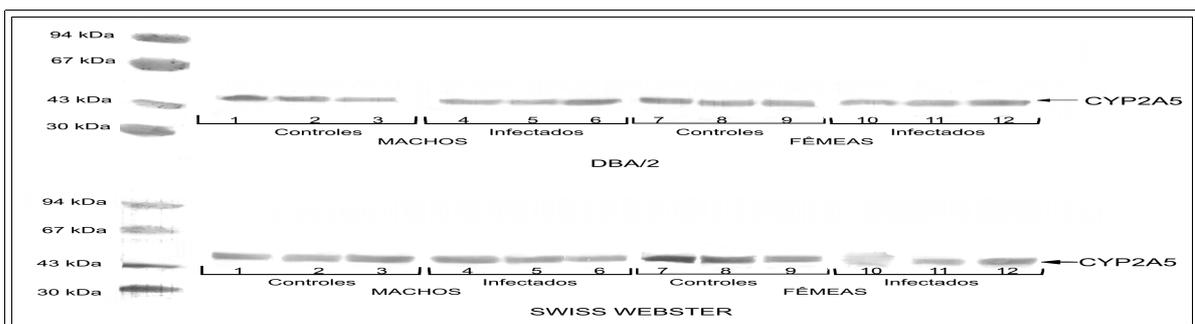
Confirmado que a banda reconhecida pelo anticorpo correspondia a CYP2A5, o efeito da infecção com *S.mansoni* sobre a expressão desta isoenzima foi avaliada em seguida. As Figuras 4.2 e 4.3 referem-se portanto a expressão de CYP2A5 em animais infectados e controles não-infectados, machos e fêmeas, das 2 linhagens de camundongos estudadas. Como todos os animais expressaram – em maior ou menor intensidade – CYP2A5, realizamos uma análise semi-quantitativa das bandas por densitometria para comparar intensidade das bandas obtidas a partir das diferentes amostras. A análise densitométrica não mostrou diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a fração microssomal de animais infectados, machos e fêmeas, DBA/2 e *Swiss Webster*, e seus respectivos controles não infectados (tabela 4.14). Portanto, os dados obtidos pela análise densitométrica não foram sensíveis o suficiente para confirmar os aumentos da atividade marcadora de CYP2A5 detectados quando mediamos a atividade da cumarina 7-hidroxilase) nas mesmas frações microssomais.

Tabela 4.14 – Análise semi-quantitativa da expressão de CYP2A5 em fígado de camundongos infectados por *S.mansoni* (55 dias pós-infecção) e controles não-infectados.

Linhagem/grupo	Sexo	Unidades arbitrárias de área/ $\mu$ g de proteína microsomal	
<i>Swiss Webster</i>	Controles	♂	0,582 $\pm$ 0,050
		♀	0,550 $\pm$ 0,110
	Infectados	♂	0,429 $\pm$ 0,050
DBA/2	Controles	♂	0,873 $\pm$ 0,118
		♀	1,050 $\pm$ 0,050
	Infectados	♂	0,827 $\pm$ 0,021
		♀	0,950 $\pm$ 0,260

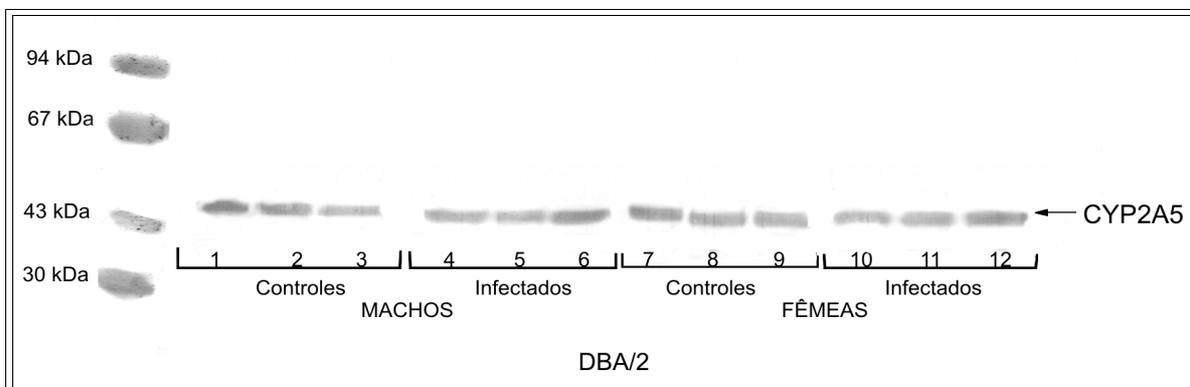
Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP das unidades arbitrárias de área /  $\mu$ g de proteínas microsossomais de 3 bandas. Os valores não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste *t* de Student;  $p > 0,05$ ) entre camundongos infectados e respectivos controles não infectados.

Figura 4.2 – Análise da expressão de CYP2A5 no fígado de camundongos *Swiss Webster* por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP2A5 murino.



Em cada canaleta do gel foi utilizado 50  $\mu$ g de proteína microsomal. Infectados: 55 dias pós-infecção com 100 cercárias de *S.mansoni*.

Figura 4.3 – Análise da expressão de CYP2A5 no fígado de camundongos DBA/2 por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP2A5 murino.



Em cada canaleta do gel foram adicionados 22,5 µg de proteína microsomal. Infectados: 55 dias pós-infecção com 100 cercárias de *S.mansoni*.

Os padrões de peso molecular utilizados no *SDS-PAGE* foram os seguintes: Fosforilase B (94 kDa), Albumina Sérica Bovina (67 kDa), Ovoalbumina (43kDa) e Anidrase Carbônica (30 kDa).

#### 4.2.4.2 – CYP1A

A análise da expressão de CYP1A por meio de *Western blotting* foi realizada utilizando anticorpos anti-CYP1A de ratos e, da mesma forma que havia ocorrido com CYP2A5, todos os animais testados expressaram banda com peso molecular característico da subfamília 1A (58 a 59 kDa). Estes resultados iniciais sugerem que há reação cruzada, *i.e.* indica que os anticorpos desenvolvidos contra CYP1A de ratos reconhecem isoenzimas da subfamília correspondente em camundongos (Figura 4.4 e 4.5).

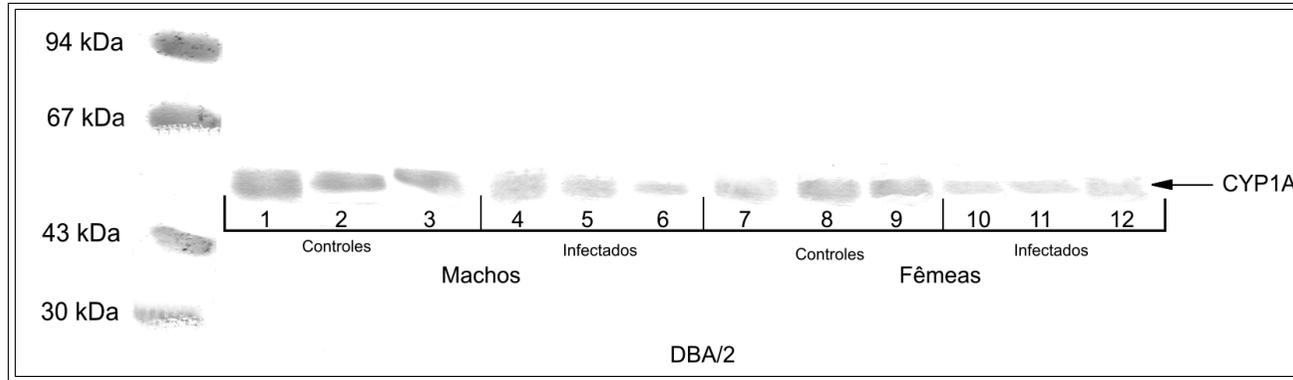
A densitometria das bandas relativas a citocromos P450 da subfamília 1A confirmou a diminuição observada na atividade de EROD (marcador da subfamília 1A) na fração microsomal hepática de camundongos infectados com *S. mansoni*. Os resultados da densitometria mostraram que, excetuando-se as fêmeas *Swiss Webster*, houve, via de regra, uma clara diminuição da expressão de CYP1A quando os animais infectados são comparados aos seus respectivos controles não infectados (tabela 4.15).

Tabela 4.15 – Análise semi-quantitativa da expressão de CYP1A em fígado de camundongos infectados por *S.mansoni* (55 dias pós-infecção) e controles não-infectados.

Linhagem/grupo	Sexo	Unidades arbitrárias de área/ $\mu$ g de proteína microssomal	
<i>Webster</i>	Controles	$\rightarrow$	0,52 $\pm$ 0,04
		$\rightarrow$ +	0,45 $\pm$ 0,07
	Infectados	$\rightarrow$	0,30 $\pm$ 0,05*
<i>Swiss</i>	Infectados	+	0,33 $\pm$ 0,02
DBA/2	Controles	$\rightarrow$	0,35 $\pm$ 0,02
		$\rightarrow$ +	0,37 $\pm$ 0,02
	Infectados	$\rightarrow$	0,23 $\pm$ 0,03*
		+	0,26 $\pm$ 0,02*

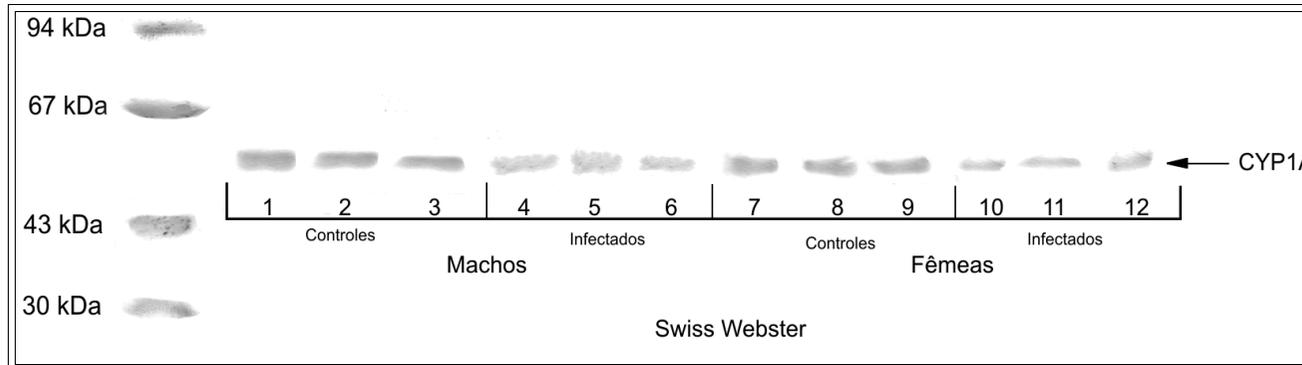
Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP das unidades arbitrárias de área /  $\mu$ g de proteínas microssomais de 3 bandas. Os valores que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste *t* de Student;  $p < 0,05$ ) em relação aos respectivos controles não infectados estão assinalados com um asterisco ( \* )

Figura 4.4 – Análise da expressão de CYP1A em fígado de camundongos DBA/2 por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP1A de ratos.



Em cada canaleta do gel foram adicionados 20  $\mu$ g de proteína microsomal. Infectados: 55 dias pós-infecção com 100 cercárias de *S.mansoni*.

Figura 4.5 – Análise da expressão de CYP1A em fígado de camundongos *Swiss Webster* por meio de *Western blotting* utilizando anticorpos anti-CYP1A de ratos.



Em cada canaleta do gel foram adicionados 20  $\mu$ g de proteína microsomal. Infectados: 55 dias pós-infecção com 100 cercárias de *S.mansoni*.

#### 4.2.5 – Determinação das atividades da Cumarina-O-Hidroxilase

O gráfico 4.5 mostra o efeito da infecção sobre a atividade de CoH em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 machos e fêmeas.

Como esperado, a atividade de CoH nos microsossomos hepáticos de camundongos da linhagem DBA/2 foi muito mais alta do que aquela observada em *Swiss Webster*. Este fato, indicativo de que a linhagem DBA/2 expressa bem CYP2A5, já havia sido constatado por outros pesquisadores (Wood & Conney, 1974; Iersel *et al.*, 1994; Juvonen *et al.*, 1985). Como pode ser visto no gráfico 4.5, os animais controles não infectados da linhagem DBA/2 apresentaram a atividade de CoH, em média, aproximadamente 5 vezes mais elevada do que a exibida pelos camundongos *Swiss Webster*.

Foi possível observar um aparente dimorfismo sexual quanto a atividade de CoH no fígado de camundongos já que as fêmeas controles não infectadas, de ambas as linhagens, apresentaram atividade maior do que aquela exibida pelos respectivos controles não infectados do sexo masculino. As fêmeas controle *Swiss Webster* formaram  $30,21 \pm 4,98$  pmoles de 7-hidroxycumarina / min / mg de proteína microsossomal, enquanto o macho controle da mesma linhagem formou  $16,95 \pm 2,23$  pmoles de 7-hidroxycumarina/min/mg de proteína microsossomal. Do mesmo modo, porém num patamar maior de atividade, as fêmeas controles não infectadas da linhagem DBA/2 apresentaram atividades de  $164,8 \pm 37,0$  pmoles /min/mg de proteína enquanto os machos correspondentes exibiram atividade da ordem de  $76,16 \pm 26,48$  pmoles /min/mg de proteína microsossomal (gráfico 4.5).

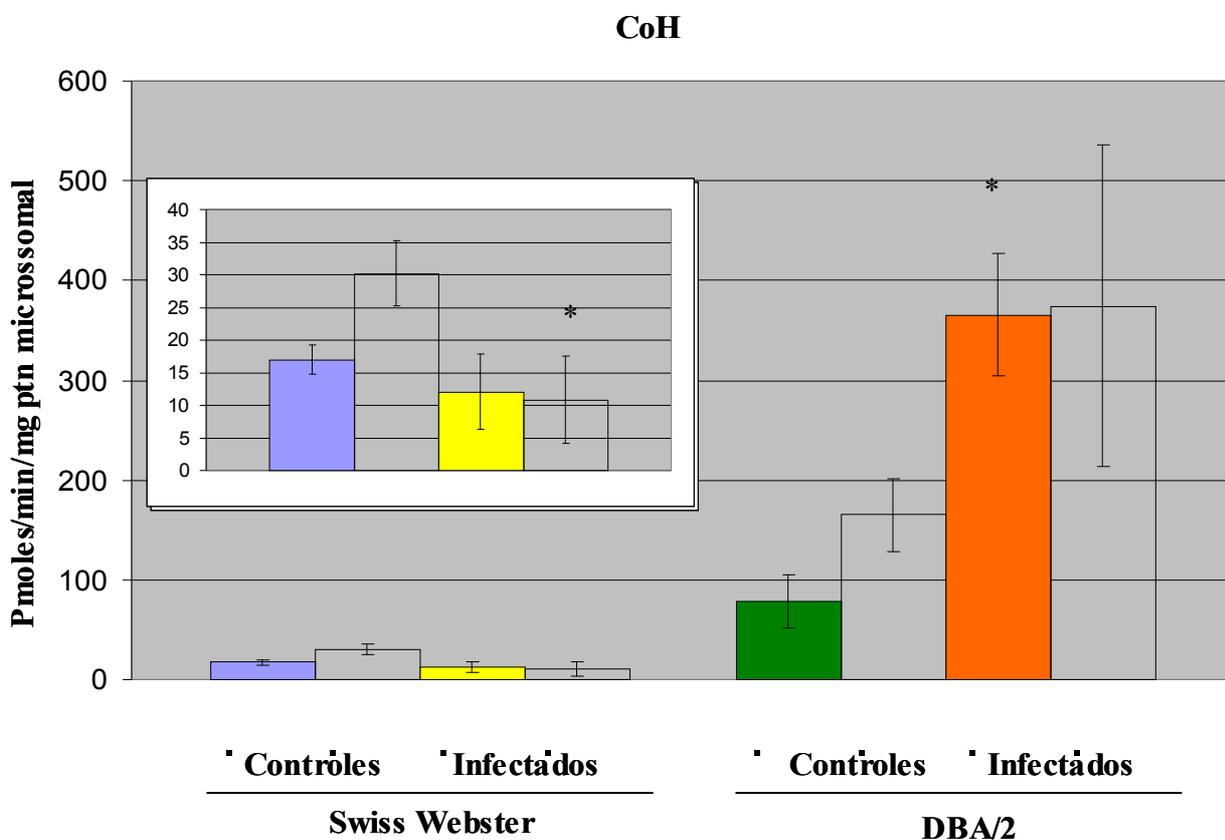
Os efeitos da infecção com *S. mansoni* sobre as atividades da cumarina 7-hidroxilase, foram diferentes nas duas linhagens de camundongos. Na linhagem *Swiss Webster*, as fêmeas controles apresentaram atividade de  $30,21 \pm 2,23$  pmoles de 7-hidroxycumarina/min/mg de proteína, enquanto nas infectadas a atividade foi  $10,8 \pm 6,7$  pmoles / min /mg de proteína microsossomal ( $p \leq 0,05$ ). A atividade de CoH nos machos *Swiss Webster* infectados porém não diferiu estatisticamente da atividade registrada no respectivo controle não infectado (infectado:  $12,04 \pm 5,88$  e controle:  $16,95 \pm 2,23$  pmoles / min / mg de proteína microsossomal) (detalhe do gráfico 4.5). Nos camundongos DBA/2, por outro lado, observou-se um claro aumento da atividade da cumarina hidroxilase nos machos infectados ( $p < 0,05$ ) mas, entre as fêmeas, a atividade não diferiu estatisticamente

entre infectadas e não infectadas. Nos machos infectados, a atividade de CoH foi  $365,4 \pm 61,7$  pmoles/min/mg de proteína microssomal, o que corresponde a 4,7 vezes a atividade medida no respectivo controle não infectado (*i.e.*  $78,16 \pm 26,48$  pmoles/min/mg de proteína microssomal). Nas fêmeas DBA/2 a infecção não alterou significativamente ( $p=0,086$ , teste *t* de Student bicaudal) a atividade de CoH, em comparação com o grupo controle não infectado (média  $\pm$  DP; infectadas:  $374,7 \pm 161,9$  pmoles/min/mg de proteína, controle:  $164,8 \pm 37,02$  pmoles/min/mg de proteína microssomal). Como pode ser visto pelos valores anteriormente apresentados, nos grupos infectados, foi alta a variabilidade entre indivíduos quanto a atividade de cumarina 7-hidroxilase. Assim, embora haja uma clara tendência ao aumento da atividade de CoH nos infectados, a alta variabilidade de resposta entre indivíduos do mesmo grupo, provavelmente impediu que em alguns casos, este aumento fosse detectado estatisticamente ao nível de significância de 0,05 % com o teste bicaudal. Entretanto, é digno de nota que se tivéssemos formulado uma hipótese alternativa com um sentido definido (*i.e.* aumento nos infectados) e aplicado portanto, testes unicaudais, teríamos evidenciado estatisticamente esta diferença também nas fêmeas da linhagem DBA/2 infectadas (Tabela 4.5).

#### **4.2.6 – Determinação das atividades das resorufina-O-desalquilases**

Foram avaliadas as velocidades de desalquilação de três éteres da fenoxazona – etoxiresorufina, pentoxiresorufina e benziloxiresorufina – através da medida do acúmulo de resorufina (7-hidroxiresorufina) formada. Tem sido constatado que algumas isoformas de CYP apresentam certa seletividade para a catálise de reações de desalquilação destes substratos (Burke et al, 1985, 1994). A subfamília 1A parece ser responsável, nos camundongos, pela desetilação da etoxiresorufina (Weaver *et al.*, 1994). Por outro lado, os outros dois éteres (pentoxiresorufina e benziloxiresorufina) são substratos relativamente específicos para a subfamília 2B em ratos, camundongos e coelhos (Nerukar *et al.*, 1993; Nims & Lubet, 1996).

Gráfico 4.5 – Atividade da Cumarina 7-hidroxilase na fração microsomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.



As atividades correspondem a média de 5 *pools*, cada um com 3 animais, e são expressas como pmoles de 7-hidroxycumarina /min /mg de proteína microsomal. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos respectivos controles não infectados são assinalados com um asterisco.

#### 4.2.6.1 – Atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD)

A infecção por *S. mansoni* diminuiu significativamente as atividades de EROD em microsossomos hepáticos nas duas linhagens de camundongos estudadas (Gráfico 4.6). A depressão da atividade de EROD causada pela infecção foi mais acentuada nos camundongos *Swiss Webster*. A atividade de EROD nos microsossomos hepáticos de machos *Swiss Webster* infectados foi 4,2 vezes menor do que a atividade registrada no respectivo controle não infectado. A atividade de EROD nas fêmeas desta linhagem infectadas foi até

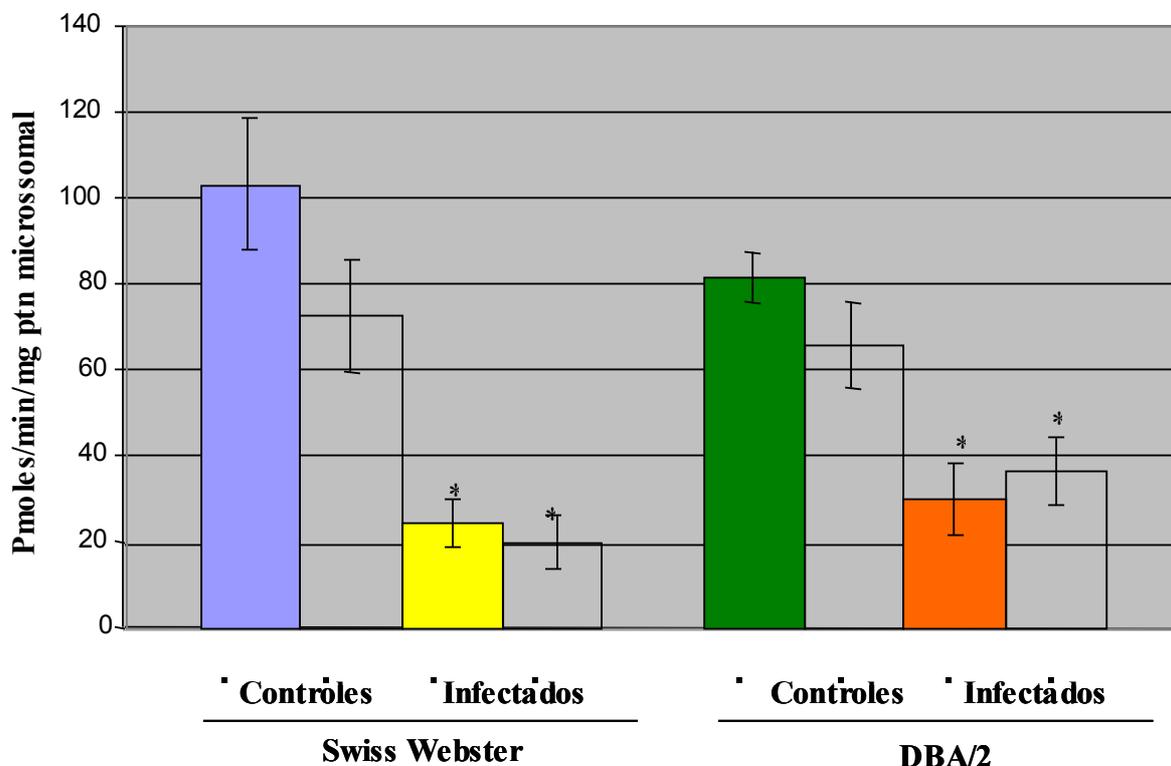
3,6 vezes menor do que a atividade apresentada pelos respectivos controles não infectados. A infecção também reduziu a atividade de EROD na linhagem DBA/2, mas neste caso a diminuição foi mais discreta do que a constatada nos camundongos *Swiss Webster*. As fêmeas e os machos DBA/2 infectados apresentaram atividades 2,7 e 1,8 vezes menores que os respectivos controles não infectados.

A diminuição de EROD observada nos camundongos infectados de ambas as linhagens foi coerente com a redução dos níveis de isoenzimas da subfamília CYP1A determinados por *Western blotting*, utilizando anticorpos anti-1A de ratos (Tabela 4.15).

A atividade de EROD em microsossomos hepáticos de camundongos machos *Swiss Webster* não infectados foi 103,41 pmoles de resorufina / min /mg de proteína microsossomal, enquanto nas fêmeas desta linhagem a atividade foi 72,64 pmoles / min / mg de proteína microsossomal. A diferença entre sexos observada na atividade de EROD é compatível com o que tem sido descrito na literatura em termos de variações relacionadas ao sexo nos níveis de CYP (Morgan *et al.*, 1998).

Não notamos diferenças expressivas entre camundongos DBA2/2 e *Swiss Webster* quanto a atividade de EROD na fração microsossomal hepática o que sugere que as duas linhagens estudadas expressam de forma semelhante as isoenzimas da subfamília 1A

Gráfico 4.6 – Atividade da etoxiresorufina *O*-desetilase (EROD) em fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.



As atividades correspondem a média de 5 *pools*, contendo cada um 3 animais, e são expressas como pmoles de resorufina/min/mg de proteína microsossomal. Os dados foram analisados pela ANOVA seguida do teste *t* de Student. Os valores de camundongos infectados que diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos respectivos controles não infectados são assinalados com um asterisco.

#### 4.2.6.2 – Atividade da pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD) e da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD).

Tem sido descrito que a pentoxiresorufina e a benziloxiresorufina são substratos relativamente específicos para isoenzimas da subfamília 2B em várias espécies de animais de laboratório (Lubet *et al.*, 1990). Estes dois éteres da fenoxazona, no entanto, também são desalquilados por enzimas de outras subfamílias de CYP. Não é claro qual substrato seria mais específico para CYP2B em camundongos. Alguns pesquisadores acreditam ser a benziloxiresorufina o substrato marcador mais apropriado para a atividade da subfamília CYP2B em camundongos (Nerukar *et al.*, 1993). Neste trabalho avaliamos as atividades

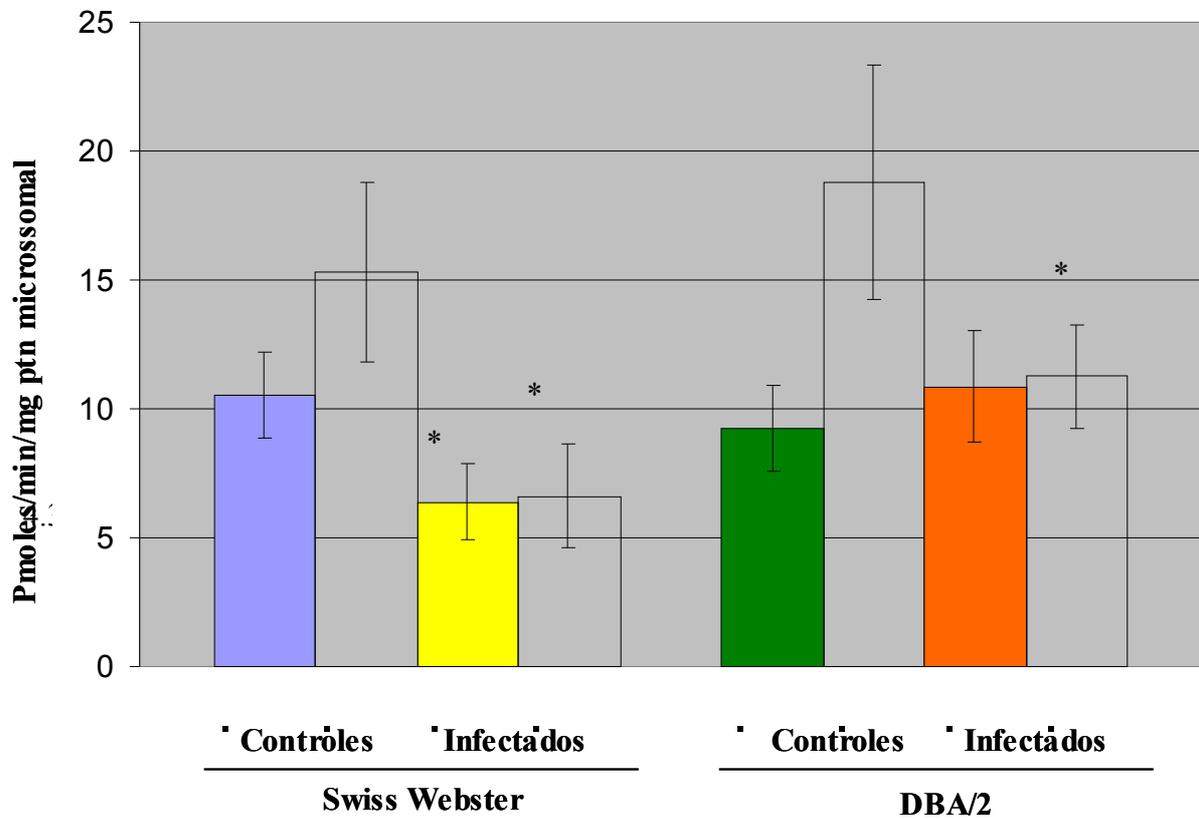
tanto da pentoxiresorufina quanto da benziloxiresorufina em camundongos infectados por *S. mansoni* e respectivos controles não infectados.

Os gráficos 4.7 e 4.8, sugerem que a *O*-desalquilação da benziloxiresorufina (BROD), variando de 17 a 79 pmoles de resorufina/min/mg de proteína microssomal, é de um modo geral mais rápida do que a da pentoxiresorufina (PROD), que varia de 6 a 18 pmoles de resorufina /min /mg de proteína microssomal. As atividades de BROD e PROD, entretanto, não pareceram diferir entre as duas linhagens estudadas e, em termos de dimorfismo sexual, as duas enzimas pareceram comportar-se de forma semelhante.

Nas fêmeas da linhagem *Swiss Webster* infectadas as atividades de PROD e BROD foram 2,3 e 4,6 vezes menor, do que os seus controles não infectados, respectivamente. As fêmeas DBA/2 infectadas também apresentaram atividades de PROD e BROD reduzidas em relação aos seus respectivos controles não infectados. Neste último caso, a infecção reduziu as atividades de PROD 1,6 vezes e de BROD 1,9 vezes em relação aos respectivos controles.

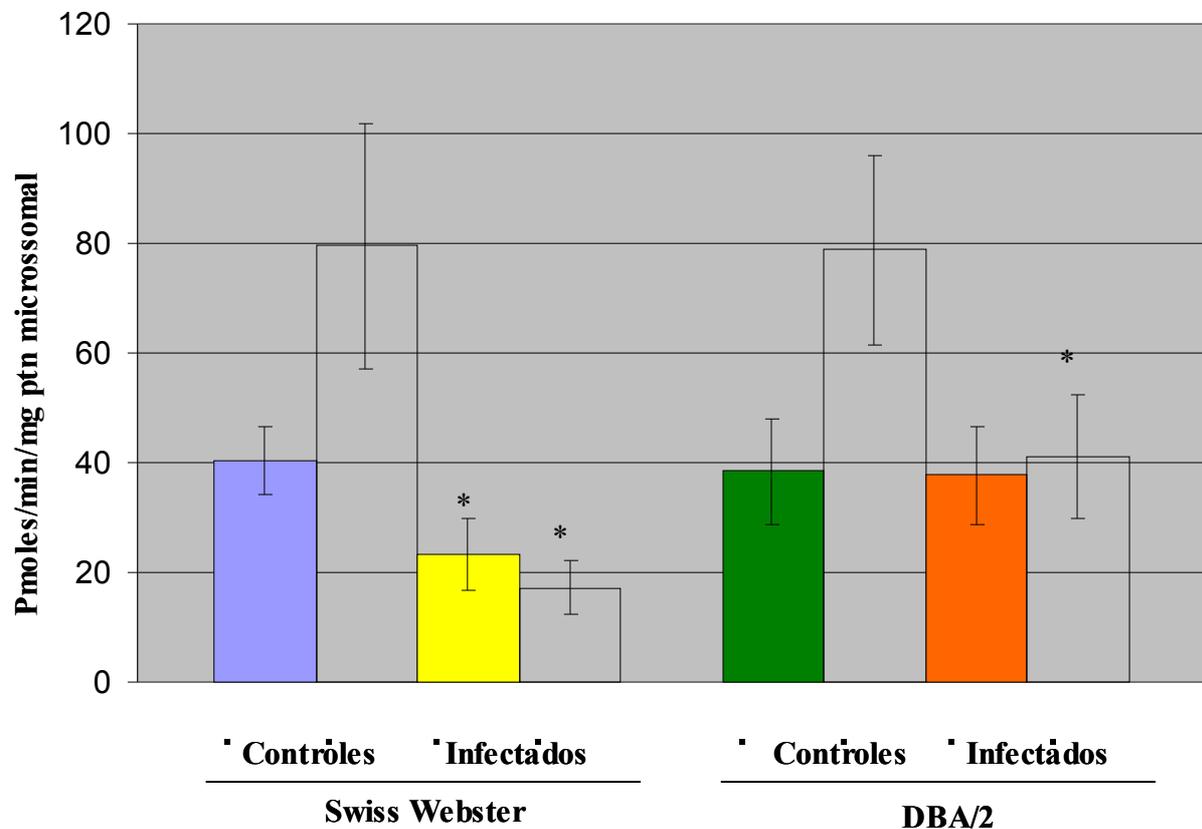
Nos machos as alterações foram mais discretas, tendo a redução sido notada apenas entre os camundongos *Swiss Webster*. A atividade de PROD nos machos desta linhagem infectados foi aproximadamente 1,5 vezes menor do que a atividade notada nos controles não infectados, e a de BROD foi 1,7 vezes menor do que a dos controles. Entre os camundongos DBA/2 machos, a infecção por *S.mansoni* aparentemente não alterou as atividades de BROD e PROD.

Gráfico 4.7 – Atividade da pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD) na fração microsomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.



As atividades foram obtidas a partir da média de 5 *pools* de 3 animais e expressas como pmoles de resorufina/min/mg de proteína microsomal. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de Student, e considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os valores que diferiram estatisticamente dos respectivos controles estão assinalados com um asterisco.

Gráfico 4.8 – Atividade da benziloxiresorufina *O*-desbenzilase (BROD) na fração microsomal hepática de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção por *S. mansoni*



As atividades foram obtidas a partir da média de 5 *pools* de 3 animais e expressas como pmoles de resorufina/min/mg de proteína microsomal.

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste *t* de Student, e considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os valores que diferiram estatisticamente dos respectivos controles estão assinalados com um asterisco.

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 Análise de variáveis associadas ao modelo experimental de esquistossomose mansônica. Efeitos da linhagem dos camundongos, do sexo, da idade em que foram infectados, e do tempo de evolução da doença após a infecção.

#### *Idade em que os camundongos foram infectados com cercárias de S. mansoni.*

Ao idealizarmos o presente trabalho, nos deparamos - de início - com uma dúvida: Qual dos dois métodos usualmente empregados para infectar camundongos com *S. mansoni* seria o mais conveniente: a infecção do “baby” (lactente) ou a do animal adulto? Em princípio infectar o “baby” parecia a opção mais interessante já que poderíamos acompanhar as alterações que ocorrem na fase avançada da doença sem o inconveniente de trabalhar com animais mais velhos, nos quais teríamos que separar os eventuais efeitos da doença, daqueles do envelhecimento. A infecção do animal adulto – em geral pela cauda- é de longe o procedimento mais comum e já havia sido utilizado antes em nosso laboratório (De-Carvalho et al, 1994). Todavia, precisávamos saber, entre outras coisas, se o “baby” suportaria a mesma carga parasitária que o animal adulto tolera e como a doença evoluiria em camundongos tão jovens. Realizando levantamentos em bases de dados (e.g. MEDLINE e TOXLINE) verificamos que os estudos com infecção de lactentes são muito mais raros e, apesar dos nossos esforços, não conseguimos localizar nenhum que comparasse os dois métodos ou que respondesse as nossa indagações.

Neste trabalho constatamos que o índice de penetração percutânea das cercárias de *S. mansoni* (cepa BH, originária do Departamento de Malacologia do IOC-FIOCRUZ) foi elevado (aprox. 98%) e não diferiu entre os dois procedimentos, *i.e.* a infecção de adultos (45 dias) pela cauda e a infecção de lactentes (10 dias) cuja corpo (principalmente patas e ventre) entrou em contato com água contendo cercárias. Estes resultados indicaram que a penetração das cercárias através da pele foi altamente eficiente, aproximando-se de 100%, independente da idade (10 *versus* 45 dias), da região do corpo exposta (cauda *versus* patas e ventre), do sexo ou da linhagem do camundongo (*Swiss Webster versus* DBA/2).

A inexistência de diferenças quanto a taxa de penetração das cercárias através da pele nos dois procedimentos não significa porém, que os dois métodos sejam comparáveis

em termos da evolução posterior da doença no hospedeiro definitivo. Em tese, a idade em que ocorreu a infecção poderia ter outras conseqüências como por exemplo, afetar o desenvolvimento subsequente dos vermes no organismo.

É conhecido que, na infecção experimental de camundongos, apenas uma parte das cercárias que penetram através da pele são posteriormente recuperadas como vermes adultos. Como pode ser visto no Gráfico 4.1, os resultados que obtivemos mostraram claramente que a proporção de vermes recuperados é maior nos camundongos infectados aos 10 dias de vida (lactentes) do que naqueles infectados aos 45 dias (adultos), independente do sexo ou da linhagem, em diferentes tempos (35, 55 e 90 dias) pós-infecção. O número de ovos encontrados no fígado e nos intestinos (Gráficos 4.2 e 4.3) também foi maior nos camundongos infectados enquanto lactentes, independente do sexo e linhagem, o que é coerente com o que observamos em termos de recuperação de vermes adultos. Estes dados sugerem que, no hospedeiro definitivo mais jovem, infectados aos 10 dias de vida, o amadurecimento dos vermes é mais rápido e mais eficiente. Digno de nota também é o fato da mortalidade, evidenciada até os 90 dias pós-infecção, ter sido claramente maior entre os que foram infectados aos 10 dias de vida. Em conjunto estas observações indicam que, apesar da alta taxa de penetração das cercárias não diferir entre as duas idades - e métodos - de infecção, a evolução subsequente da esquistossomose no hospedeiro definitivo parece ser diferente, sendo a morbi-mortalidade mais acentuada quando a infecção é realizada aos 10 dias de vida (lactentes).

O maior número de vermes adultos e de ovos pode, em princípio, explicar a maior mortalidade notada entre os camundongos que foram infectados enquanto lactentes. Neste trabalho não investigamos porém, se há também diferenças entre os dois procedimentos de infecção quanto a evolução e severidade da lesão granulomatosa hepática que se forma em torno dos ovos.

### ***Linhagem dos camundongos infectados com S. mansoni***

Em que pese não ter havido diferenças entre linhagens de camundongos quanto a proporção de cercárias que penetraram através da pele, a evolução da esquistossomose nos *Swiss Webster* foi –em vários aspectos- diferente da que ocorreu nos DBA/2.

A recuperação de vermes adultos na linhagem isogênica DBA/2 foi menor do que a obtida nos camundongos *Swiss Webster (outbred)* aos 35, 45 e 90 dias após a infecção. Os camundongos DBA/2, independente do sexo ou da idade em que foram infectados, apresentaram menor número de ovos no fígado e nos intestinos, nos diferentes tempos pós-infecção, o que é coerente com o achado anterior em termos de recuperação de vermes adultos. Por outro lado, contrastando com o menor número de vermes adultos recuperados nos camundongos DBA/2, constatamos que esta linhagem isogênica apresentou mortalidade maior – principalmente aos 90 dias pós-infecção- do que a *outbred Swiss Webster*.

É interessante notar porém que os DBA/2 adultos são bem menores (quase a metade do peso corporal) do que os *Swiss Webster* de mesma idade, quer se trate de animais infectados ou de controles não infectados. Assim sendo, em virtude das diferenças de tamanho, poder-se-ia esperar que a mesma carga parasitária tivesse efeitos mais drásticos no DBA/2 do que no *Swiss Webster*. Como o fígado do DBA/2 adulto é menor, o mesmo número de ovos significaria um número proporcionalmente maior de lesões granulomatosas por volume (ou massa) de tecido hepático.

Pode-se dizer que, sendo o DBA/2 adulto menor do que o *Swiss Webster*, e não tendo sido a carga parasitária corrigida para o peso do animal (foram usadas 100 cercárias por camundongo nos dois casos), esperaríamos –em princípio- uma morbi-mortalidade mais acentuada nesta linhagem isogênica. Isto foi aparentemente atenuado pelo fato da proporção de esquistossômulos que evoluíram a vermes adultos ter sido também menor entre os DBA/2. Não é clara entretanto a razão pela qual a taxa de recuperação de vermes adultos foi menor entre os DBA/2. É conhecido que o desenvolvimento dos vermes no organismo depende de uma série de fatores entre os quais, por exemplo, o estado funcional do sistema imunológico. Neste sentido vale lembrar que a imunodepressão induzida por fármacos reduz a taxa de recuperação de vermes adultos. É provável que algumas

características imunológicas da linhagem DBA/2, diferentes das do *Swiss Webster*, tenham a ver com esta maior “resistência” ao amadurecimento do *S. mansoni*.

#### ***Sexo dos camundongos infectados com S. mansoni***

A taxa de penetração das cercárias, assim como a proporção de vermes adultos recuperados e o número de ovos encontrados no fígado e nos intestinos, aparentemente, não diferiram entre machos e fêmeas. O ganho de peso corporal e a mortalidade em decorrência da esquistossomose também pareceu não diferir consistentemente entre sexos.

#### ***Tempo de evolução doença após a infecção com S. mansoni***

Tanto em camundongos *Swiss Webster*, quanto nos DBA/2, e independentemente do sexo, o número de vermes adultos recuperados foi maior nos animais sacrificados 55 dias após a infecção do que naqueles sacrificados com 35 dias de evolução da esquistossomose.

Nos camundongos infectados aos 10 dias de vida (lactentes), a recuperação de vermes aos 55 dias também foi claramente maior do que aquela observada aos 90 dias. Nos animais DBA/2 que foram infectados na vida adulta (45 dias), o decréscimo da recuperação de vermes adultos entre 55 e 90 dias após a infecção não é tão evidente quanto nos demais casos. Estes resultados, em conjunto, sugerem que a recuperação de vermes adultos tende a apresentar um máximo aos 55 dias de evolução da esquistossomose murina.

O número de ovos encontrados no fígado foi muito reduzido nos camundongos sacrificados aos 35 dias de vida, nas duas linhagens, em ambos os sexos e independentemente da idade em que ocorreu a infecção. Em todos os casos porém, foi evidente que o número de ovos por fígado aumentou com a duração da evolução da doença, sendo o maior número de ovos por órgão observado aos 90 dias pós-infecção. Estes resultados sugerem que a ovoposição começa a partir – ou por volta - do dia 35 pós-infecção. O aumento progressivo do número de ovos por fígado até o dia 90 pós-infecção, apesar da diminuição da recuperação de vermes adultos, provavelmente é explicada pelo fato de que há um acúmulo de ovos retidos no tecido hepático com o tempo, mesmo que a ovoposição venha a diminuir nas fases mais tardias da evolução da doença (*i.e.* o ovo

retido no fígado não é eliminado, portanto o dado reflete o acúmulo de ovos ao longo do tempo).

O número de ovos nos intestinos também é, em todos os casos, muito pequeno – quase desprezível- 35 dias após a infecção, aparecendo em grande quantidade apenas nos animais sacrificados com 55 e 90 dias de evolução da doença. Contrastando com o que ocorreu no fígado, o número de ovos nos intestinos não aumentou entre os dias 55 e 90 pós-infecção. Vale lembrar entretanto, que os ovos presentes na parede dos intestinos aí permanecem temporariamente sendo, em grande parte, arrastados para a luz do órgão e eliminados nas fezes. Esta eliminação de ovos pelas fezes do hospedeiro definitivo é necessária para que se complete o ciclo do parasita.

Embora nem sempre detectada estatisticamente, pode-se dizer que os camundongos infectados – principalmente os que foram sacrificados 90 dias após a infecção - tenderam a apresentar um discreto *déficit* de ganho de peso em relação aos seus respectivos controles não-infectados. A mortalidade devido à doença também apareceu de forma mais acentuada a partir de 55 dias de evolução da doença. Estes dados sugerem que há um agravamento do estado de saúde dos animais infectados que possivelmente se deve ao progressivo comprometimento do tecido hepático (maior número de ovos no fígado, evolução do granuloma para extensa fibrose do órgão).

## **5.2 Estudo das alterações de isoenzimas CYP observadas no fígado de camundongos DBA/2 e *Swiss Webster* 55 dias após a infecção com *S.mansoni*.**

### ***Isoenzimas CYP e atividades enzimáticas em camundongos.***

As isoenzimas CYP caracterizam-se por exibir grande versatilidade em termos de especificidade por substrato: *i.e.* tanto cada isoforma tem afinidade por ampla gama de substratos, como cada molécula de xenobiótico pode ser substrato para diferentes isoenzimas. Neste contexto, obviamente, a especificidade de determinado substrato é sempre relativa.

Segundo Burke *et al.*, (1994) a especificidade dos substratos de reações de desalquilação não é absoluta e, que depende da concentração relativa das isoformas

presentes na fração microsomal estudada. De acordo com estes autores, em ratos, as reações de PROD e BROD são catalisadas preferencialmente por CYP2B principalmente em microsomas induzidos por fenobarbital.

Em camundongos, entretanto, não é claro quais seriam as isoenzimas que metabolizariam preferencialmente a pentoxiresorufina (PROD) e a benziloxiresorufina (BROD). Segundo Nerukar et al., (1993) BROD seria um marcador melhor do que PROD para a atividade de CYP2B em camundongos.

A hidroxilação da cumarina na posição 7 (7-hidroxilação) é catalisada predominantemente por CYP2A5 nos camundongos (Pelkonen et al, 1993), com isso, utilizamos CoH como atividade marcadora de CYP2A5.

É bem documentado que, entre camundongos, a linhagem isogênica DBA/2 é a que melhor expressa CYP2A5, *i.e.* possui alta atividade de CoH (Iersel et al., 1997). Não conseguimos entretanto, obter na literatura dados sobre a atividade de CoH na linhagem *Swiss Webster*. Após a realização dos ensaios de CoH dos animais não infectados, confirmamos que a linhagem DBA/2 originária do CECAL-FIOCRUZ apresenta alta atividade de CoH e notamos, por outro lado, que as atividades de CoH eram muito baixas nos animais *Swiss Webster*.

A diferença de atividade observada entre linhagens foi da ordem de aproximadamente 150 pmoles / min / mg de proteína microsomal para os DBA/2 e de aproximadamente 20 pmoles / min / mg de proteína microsomal para os camundongos *Swiss Webster*, *i.e.* atividade quase 8 vezes maior nos camundongos DBA/2 comparados aos *Swiss Webster*.

Além da marcante diferença entre linhagens, o dimorfismo sexual, já bem documentado, para as atividades de CoH foi também evidenciado no nosso estudo. Dentro de cada linhagem, as atividades de CoH diferiram entre sexos sendo nas fêmeas aproximadamente 2 vezes mais altas do que nos machos.

As alterações de atividade de CoH em decorrência da infecção não ocorreram da mesma forma nos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. Nos *Swiss Webster*, as fêmeas infectadas apresentaram atividades significativamente menores em relação aos respectivos controles, *i.e.* a infecção provavelmente diminuiu as atividades de CoH. Nos machos, uma tendência não significativa no sentido da diminuição também pode ser notada.

Os comportamentos diferentes apresentados quanto às atividades de cumarina 7-hidroxilase entre duas linhagens sugere que no caso do *Swiss Webster*, que não expressa bem CYP2A5, a reação de CoH é provavelmente catalisada por outras isoformas. A observação de Wood & Taylor (1979) apud Chang & Waxman, (1996) vem de apoio a esta interpretação. Estes autores relataram que a anilina inibe preferencialmente a atividade de cumarina 7-hidroxilase em microsomos hepáticos de linhagens com fenótipo de metabolizadores intensos, enquanto que a “*metirapone*” inibe preferencialmente a atividade nas linhagens com fenótipo de baixos metabolizadores. Isto sugere que a 7-hidroxilação da cumarina seja catalizada por diferentes enzimas nos dois grupos de camundongos, o que é consistente com a diferença de aproximadamente 10 vezes no  $K_m$  da 7-hidroxilação da cumarina entre microsomos hepáticos de camundongos C57BL/6J e DBA/2 (Chang&Waxman, 1996). Recentemente, Lindberg et al., (1992) isolou e caracterizou dois cDNAs de CYP: P450<sub>coh</sub>H e P450<sub>coh</sub>L. O primeiro encontrado em linhagens com alta atividade de cumarina 7-hidroxilase, e o último em linhagens com baixa atividade de cumarina 7-hidroxilase. As seqüências de nucleotídeos destes dois cDNAs diferem apenas por uma base, que resulta na substituição do aminoácido na posição 117, com valina para os metabolizadores intensos e alanina para os baixos metabolizadores.

Não sabemos se a substituição de um aminoácido na posição 117 da seqüência peptídica observada por Lindberg et al. (1992) ocorre também nos *Swiss Webster* (baixos metabolizadores) ou se a alteração do gene e da proteína nesta última linhagem é de outro tipo. De qualquer modo, é possível que a 7-hidroxilação da cumarina nos animais que não expressam bem CYP2A5 seja catalisada por outras isoenzimas que respondem à inflamação em torno dos ovos de *S. mansoni* como as demais enzimas que avaliamos, *i.e.* com redução da atividade.

### ***Comprometimento hepático nos animais infectados com S. mansoni.***

Neste trabalho investigamos as alterações de CYP que ocorrem no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* em decorrência das reações inflamatórias produzidas em torno dos ovos do parasito retidos no tecido hepático. Escolhemos portanto um momento intermediário de evolução da esquistossomose murina (55 dias pós-infecção) em que estas lesões estavam ativas e presentes em grande número, mas ainda não havia a extensa fibrose hepática que é notada em fases mais tardias da doença (e.g. 90 dias pós-infecção). Em estudos subseqüentes pretendemos avaliar as alterações de CYP hepáticos que ocorrem antes da presença dos ovos e formação das lesões granulomatosas (30/35 dias pós-infecção) e, também, aquelas que aparecem posteriormente nas fases mais avançadas da doença (e.g. 90 dias pós-infecção) em que o órgão já exhibe extensa fibrose.

O aumento dos pesos absoluto e relativo, tanto do fígado quanto do baço, observado no segundo experimento, indicou que a carga parasitária (100 cercárias / camundongo) utilizada foi suficiente para produzir um comprometimento hepatoesplênico claramente evidenciado no momento do sacrifício (55 dias pós-infecção) dos animais. Esta observação foi confirmada pelo exame macroscópico realizado no momento em que os fígados foram retirados para preparação da fração microsomal. Os fígados dos animais infectados – nas duas linhagens e em ambos os sexos – apresentavam volume claramente aumentado, coloração escurecida e superfície rugosa sugerindo a presença de muitas lesões granulomatosas. Estes achados com as duas linhagens são semelhantes aos que foram encontrados por Magzoub & Adam (1974) em estudo sobre as alterações hepáticas que ocorrem durante a infecção experimental de camundongos *Swiss Webster* por *S. mansoni*.

Todos os animais infectados utilizados para preparação das frações microsomais hepáticas, empregadas nas determinações de atividade e níveis de citocromos P450, apresentavam as características acima descritas.

### ***Alterações de CYPs nos camundongos infectados com S. mansoni***

Neste trabalho notamos que os níveis totais de CYP hepáticos foram substancialmente reduzidos nos camundongos infectados (55 dias pós-infecção) nas duas

linhagens estudadas (DBA/2 e *Swiss Webster*), tanto em machos como em fêmeas. Além disso, observamos também – entre os não-infectados- um claro dimorfismo sexual quanto aos níveis totais de CYP, exibindo os machos das duas linhagens concentrações mais elevadas do que as respectivas fêmeas. Este resultado para CYP total contrasta com o dimorfismo sexual, também observado nos camundongos controles, para determinadas isoenzimas com as fêmeas nas atividades de PROD e BROD. Nossos resultados, quanto a este último aspecto, estão de acordo com a literatura, que registra via de regra maior atividade da subfamília CYP2B nas fêmeas do que nos camundongos machos (Sharma *et al.*, 1998).

Coerente com a redução dos níveis totais de CYP, observamos que as atividades das alcoxioresufina desalquilases (EROD, BROD e PROD) também estavam, de um modo geral, diminuídas nos camundongos infectados, machos e fêmeas, das duas linhagens. A única exceção neste aspecto foi a ausência de diferenças entre infectados e não infectados (controle) quanto a atividade de BROD em camundongos DBA/2 machos. Estes resultados sugerem que as atividades das isoenzimas das subfamílias CYP1A (EROD) e CYP2B (BROD e PROD) na fração microssomal hepática são deprimidas pela infecção com *S. mansoni*. A redução das isoformas da subfamília CYP1A em decorrência da infecção foi confirmada nas duas linhagens pela quantificação da respectiva apoproteína por SDS/PAGE e immunoblotting com anticorpos policlonais contra CYP1A de ratos. Digno de nota nos animais não-infectados (controles) é a diferença entre sexos quanto a atividade de CYP2B (BROD e PROD), claramente maior em fêmeas.

Contrastando com este quadro geral de redução dos níveis totais de CYP, e da atividade das isoenzimas das subfamílias CYP1A e CYP2B, em consequência da infecção, a atividade da cumarina 7-hidroxilase (CoH, atividade enzimática marcadora de CYP2A5) mostrou-se claramente aumentada nos camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*. A atividade da CoH nos camundongos *Swiss Webster* não infectados (controles) foi muito menor do que a constatada nos DBA/2 não infectados o que parece confirmar que, ao contrário desta última linhagem, a linhagem *Swiss Webster* não expressa bem CYP2A5. Nos camundongos *Swiss Webster* infectados observamos, entre as fêmeas, uma pequena diminuição da atividade de CoH em relação aos respectivos controles não infectados. Entre os *Swiss Webster* machos não detectamos diferenças de atividade de CoH

entre infectados e não infectados. Vale lembrar entretanto, que como o *Swiss Webster* não expressa bem CYP2A5, é possível que nesta linhagem os níveis relativamente baixos de hidroxilação da cumarina na posição 7 sejam devidos a outras isoformas que, diferentemente de CYP2A5 (em DBA/2), estariam deprimidas nos animais infectados. A quantificação da apoproteína CYP2A5, por SDS/PAGE e immunoblotting com anticorpo contra CYP2A5 murino, não detectou diferenças estatisticamente significativas entre infectados e não infectados da linhagem DBA/2. Este resultado obtido com SDS/PAGE e immunoblotting (ausência de diminuição de CYP2A5) contrasta com a já mencionada redução das apoproteínas da subfamília CYP1A em decorrência da infecção. As diferenças entre as linhagens quanto a expressão de CYP2A5 foram confirmadas também por immunoblotting visto que a densidade das bandas obtidas com os DBA/2 foram quase 2 vezes mais intensas do que aquelas correspondentes aos *Swiss Webster*.

Em síntese, os nossos resultados mostraram que no tecido hepático de camundongos, concomitante com o aparecimento de lesões granulomatosas (55 dias pós-infecção) há uma indução de CYP2A5 que contrasta com a depressão de atividade de outras isoformas (subfamílias CYP1A e CYP2B) e com a acentuada redução dos níveis totais de CYP. Ressaltamos que neste trabalho quantificamos as alterações produzidas pela infecção nas atividades e níveis de CYP do tecido hepático como um todo (*i.e.*, a integração do que ocorre em áreas afetadas e em áreas não afetadas do fígado). O comprometimento do tecido hepático, entretanto, não é homogêneo na esquistossomose. Como a lesão inflamatória (granuloma) se forma em torno dos ovos do trematódeo, é possível que as alterações de atividade e expressão de isoformas CYP apresentem nuances de intensidade de acordo com a proximidade do ovo, e que estas atividades variem também em função do estágio de evolução do granuloma (em determinado momento da evolução da doença há no fígado granulomas de diferentes “idades”). Estas alterações localizadas em torno dos ovos poderão ser investigadas futuramente com métodos imunohistoquímicos.

***Confronto dos dados obtidos neste estudo com a literatura sobre alterações de CYPs em processos inflamatórios e infecções parasitárias***

Tem sido descrito que, tanto em seres humanos como em animais de laboratório, infecções virais, bacterianas e parasitárias, e processos inflamatórios de vários tipos, alteram o metabolismo de fármacos e as atividades e níveis de expressão de várias isoformas de CYP no fígado, no rim e no cérebro (Morgan, 1997, Renton, 2000). De um modo geral tem sido observado que esses processos infecciosos e inflamatórios deprimem o metabolismo aumentando a meia vida biológica ( $T_{1/2}$ ) e, eventualmente, a toxicidade de drogas (Renton, 2000). Os mecanismos subjacentes a esta depressão, entretanto, ainda não são bem conhecidos. A literatura sobre o assunto é vasta, mas esparsa, dispersando-se por inúmeros agentes infecciosos ou inflamatórios e diferentes momentos de evolução da doença / inflamação.

No presente estudo mostramos que na esquistossomose murina – 55 após a infecção - ocorre uma dramática diminuição da concentração total de CYP e da atividade de isoenzimas hepáticas das subfamílias CYP1A e CYP2B. Estes resultados são, portanto, coerentes com o que tem sido descrito para diferentes modelos de infecção / inflamação. Os nossos dados evidenciaram porém, que a CYP2A5 (expressa na linhagem DBA/2), em contraste com a depressão das outras isoenzimas aos 55 dias pós-infecção, exibe um claro aumento de atividade e expressão.

Foi descrito que a *N*-desmetilação da monometilaminopirona, a oxidação do hexobarbital, a hidroxilação da anilina e a hidrólise do paroxon estão inibidas em camundongos infectados com *S. mansoni* (Ghazal *et al.*, 1974). Uma acentuada redução da atividade de monooxigenases hepáticas em camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* foi relatada por Cha *et al.*, (1976,1978). Neste mesmo sentido, Coelho *et al.* (1977) demonstraram que camundongos da linhagem *Swiss Webster* infectados com *S. mansoni*, em que foram recuperados quatro vermes fêmeas ou mais, exibiam um notável aumento do tempo de sono após a administração de pentobarbital.

Cha *et al.* (1980) verificaram que a atividade de enzimas microssomais não estava diminuída quando a infecção era unissexual (animais infectados apenas com parasitos machos ou fêmeas) e não havia portanto ovoposição dos vermes. Cha *et al.*, (1980) constatou também que, em camundongos atímicos ("*athymic nude mice*"), não ocorria depressão das enzimas microssomais o que sugere que a mesma é consequência do processo inflamatório (granuloma) em torno dos ovos.

Sheweita *et al.*, (1998) relataram que, em camundongos da linhagem Balb/c, o conteúdo total de CYP e a atividade da AHH “*Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*” estavam aumentados na fração microsomal hepática 33 dias após a infecção com *S. mansoni*. Como verificamos no presente trabalho e tem sido notado por outros autores (Lenzi *et al.*, 1998), nesta fase da esquistossomose mansônica murina (33 dias) os vermes ainda não alcançaram a maturidade sexual - *i.e.* a ovoposição está apenas iniciando - e são raros os processos inflamatórios granulomatosos hepáticos. Assim sendo, considerando conjuntamente os nossos resultados (redução de CYP) e os de Sheweita *et al* (1998) (aumento de CYP) poderíamos supor que, após a infecção, há inicialmente um aumento (33 dias, fase anterior aos granulomas) seguido de diminuição de CYP (55 dias, fase em que há numerosos granulomas) de CYP totais no fígado. O aumento generalizado de CYP na fase inicial da esquistossomose murina mansônica (33 dias) descrito por Sheweita *et al.*, (1998) parece destoar do que tem sido observado em vários outros modelos experimentais de parasitoses e infecções.

A influência do tempo de evolução da doença na intensidade do efeito, no entanto, já havia sido relatado anteriormente por Galtier *et al.* (1983) em ratos infectados com *Fasciola hepatica*. Galtier *et al.* (1983) verificaram que o conteúdo de total de CYP bem como as atividades de anilina hidroxilase e aminopirona desmetilase estavam profundamente deprimidas em ratos 4 semanas após a infecção. Esta depressão começava a regredir entre 6 e 8 semanas e, 12-14 semanas após a infecção, os níveis de CYP total e as atividades enzimáticas tornavam-se comparáveis aquelas observadas em ratos não infectados.

É preciso confirmar os resultados de Sheweita *et al* (1998) mostrando aumento generalizado de atividade aos 33 dias de infecção com *S. mansoni* que, como já mencionamos, contrastam com o que tem sido notado para CYP total e para a maioria das isoenzimas em diversos modelos de infecção / inflamação.

Neste trabalho constatamos que a atividade de CYP2A5 –contrastando com aquela das demais isoenzimas- está aumentada em DBA/2 aos 55 dias pós-infecção. Este aumento único, entre as atividades até agora avaliadas, neste momento de evolução da esquistossomose mansônica murina (55 dias), sugere que o mesmo estímulo inflamatório afeta de forma diferenciada as várias isoenzimas CYP hepáticas. Em outras palavras, a

esquistossomose mansônica não parece deprimir de forma indiscriminada todas as isoformas CYP. Não encontramos qualquer outro trabalho na literatura relatando alterações de CYP2A5 na esquistossomose. Kirby *et al.* (1994), entretanto, mostraram que hamsters infectados com o trematódeo *Opisthorchis viverrini* – que causa um outro tipo de lesão inflamatória hepática que não resulta da deposição de ovos- apresentavam uma indução inflamação-relacionada da expressão de isoenzimas hepáticas microsossomais imunorelacionadas ao CYP2A5 de camundongos. Kirby *et al.* (1994) compararam os níveis de atividade expressão de isoenzimas imunorelacionadas à CYP2A5 utilizando técnicas de imunohistoquímica e atividades de CoH. Um claro aumento das isoenzimas imunorelacionadas à CYP2A5 foi demonstrado nas regiões hepáticas próximas às áreas de inflamação (utilizando técnicas imunohistoquímicas), e de forma mais discreta quando as atividades de CoH foram determinadas em microsossomos hepáticos produzidos utilizando o órgão como um todo. Isto nos sugere que as alterações são focais nas áreas de inflamação (no caso do *O. viverrini* a inflamação ocorre no trajeto do verme, diferentemente do *S.mansoni* em que se formam granulomas em torno de ovos) e não no tecido como um todo. Medidas de atividade ou expressão de apoproteínas envolvendo fração microsossomal preparada com todo o órgão integra áreas inflamadas e não-inflamadas, o que certamente atenua o que ocorre de forma localizada no tecido hepático.

Tanto quanto sabemos, além do de Kirby *et al* (1994) não há nenhum outro relato publicado sobre alterações de CYP2A5 relacionadas a processos infecciosos ou inflamatórios. Assim sendo os nossos dados corroboram, com outra espécie de hospedeiro e outro trematódeo, a observação de que CYP2A5 pode estar induzida em processos inflamatórios.

É interessante notar que o achado de Kirby *et al* (1994) pode ter relação com a associação de câncer de fígado e infecção humana por *O. viverrini* encontrada na Tailândia e outros países do sudeste da Ásia. Sheweita *et al.* (2001) também encontraram aumento das atividades de etoxicumarina *O*-desetilase, etoxiresorufina *O*-desetilase e pentoxiresorufina *O*-despentilase, além de níveis de expressão aumentados de CYP2E1, em fragmentos de bexiga urinária de pacientes infectados pelo *Schistosoma hematobium*. Na esquistossomose causada pelo *S. hematobium*, que é endêmica no Egito e em outros países da África, os ovos depositam-se na bexiga formando-se em torno dos mesmos uma

reação inflamatória. Como a associação de esquistossomose urinária e câncer de bexiga em seres humanos parece ser bem estabelecida, os dados de Sheweita *et al.* (2001) sugerem que o aumento de atividade de isoenzimas (*e.g.* CYP1A1, 2E1) envolvidas na ativação de carcinógenos químicos poderia ter um importante papel neste sentido.

## 6 – CONCLUSÕES

→ A esquistossomose mansônica murina, na fase intermediária de evolução da doença (55 dias pós-infecção) onde estão presentes grande número de granulomas no fígado, alterou de forma distinta as atividades e níveis de expressão de diversos CYP na fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 machos e fêmeas.

→ A infecção por *S. mansoni* reduziu substancialmente os níveis de CYP total da fração microsomal de fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 machos e fêmeas sacrificados 55 dias após a infecção.

→ A infecção por *S. mansoni* aumentou a atividade de cumarina 7-hidroxilase na fração microsomal hepática de camundongos DBA/2 machos sacrificados após 55 dias de infecção.

→ A fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 machos e fêmeas após 55 dias da infecção com *S. mansoni* apresentaram clara depressão da atividade de etoxiresorufina *O*-desetilase.

→ Camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas, e DBA/2 fêmeas mostraram clara redução das atividades de Pentoxiresorufina *O*-despentilase (PROD) e de Benziloxiresorufina *O*-desbenzilase (BROD) na fração microsomal hepática 55 dias após a infecção com *S.mansoni*.

→ Em conjunto os resultados obtidos neste trabalho sugerem que na fase intermediária de evolução da esquistossomose mansônica murina, em que há formação de granulomas hepáticos, ocorre acentuada diminuição dos níveis totais de CYP e da atividade de isoenzimas das subfamílias 1A e 2B. Os resultados também mostram que - destacando-se contra este pano de fundo de depressão generalizada de atividade de enzimas microsomais - há um claro aumento de atividade e expressão de CYP2A5. Como as lesões

granulomas são focais, e medimos as alterações no tecido como um todo (fração microsomal hepática) é provável que a magnitude da indução de CYP2A5 seja ainda maior nas proximidades dos ovos de *S. mansoni* presentes no tecido hepático. Pretendemos investigar esta hipótese utilizando métodos imunohistoquímicos.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azri S. & Renton K.W. Factors involved in the depression of hepatic mixed function oxidase during infections with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology*, **13**: 197-204, 1991.
- Batra J.K., Venkitasubramanian, T.A. & Raj, H.G. Drug metabolism in experimental tuberculosis: I. Changes in hepatic and pulmonary monooxygenase activities due to infection. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **12**: 109-114, 1987.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254, 1976.
- Brattsten L.B. Sublethal virus infection depresses cytochrome P450 in an insect. *Experientia* **43**:451-454, 1987.
- Brunet, L.R.; Dunne, D.W. and Pearce, E.J. Cytokine Interaction and Immune Responses during *Schistosoma mansoni* Infection. *Parasitology Today*, **14**(10):422-427, 1998.
- Burke, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T. & Mayer, R.T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochemical Pharmacology*, **34**(18): 3337-3345, 1985.
- Burke, M.D., Thompson, S.; Weaver, R.J.; Wolf, C.R & Mayer, R.T. Cytochrome P450 Specificities of Alkoxyresorufin-O-dealkylation in Human and Rat Liver. *Biochemical Pharmacology*, **48**(5): 923-936, 1994.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M.; Joseph, M. and Torpier, G. Effector Mechanisms of Immunity to Schistosomes and Their Regulation. *Immunological Reviews*, **61**: 41-61, 1982.

- Coelho, P.M.Z, Freire, A.C.T., Araujo, F.G., Pellegrino, J. & Pereira, L.H. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on pentobarbital-induced sleeping-time in mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(1): 186-187, 1977.
- Colley, D.G. and Freeman, G.L. Differences in adult *Schistosoma mansoni* worm burden requirements for the establishment of resistance to reinfection in inbred mice II. C57BL/KsJ, SWR/J, SJL/J, BALB/cAnN, DBA/2N, A/J, B10.A(5R) mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32(3):543-549, 1983.
- Coon M.J.; Ding, X.; Pernecky, S and Vaz A.D.N. Cytochrome P450: Progress and Predictions. *FASEB Journal* 6:669-673, 1992.
- Cha, Y.N.; Byram, J.E.; Heine, H.S. & Bueding, E. Inducibility of the hepatic drug-metabolizing capacity of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27:1181-1189, 1978.
- Cha, Y-N, Byram, J.E., Heine, H.S. & Bueding, E. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29(2): 234-238, 1980.
- Cha, Y-N. & Edwards, R. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on the hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 199(2): 440, 1976.
- Chang, T.K.H. & Waxman D.J. CYP2A Subfamily. *In: Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, Ioannides, C., 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 99-134, 1996.
- Cheever, A.W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in Tissues. *Bulletin of the World Health Organization*, 39: 328-331, 1968.
- Cheever, A.W. Differential regulation of Granuloma Size and Hepatic Fibrosis in

Schistosome Infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**: 689-692, 1997.

- Cheever, A.W., Duvall, R.H., Hallack, T.A., J.R.; Minker, R.G., Malley, J.D. and Malley, K.G. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *S. mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **37**: 85-87, 1987.

- De-Carvalho, R.R.; Maldonado Jr., A.; Oliveira-Filho, E.C.; Ribeiro, A.C.; Paumgarten, F.J.R. e Rey, L. Effects of *Euphorbia milli* Látex on *Schistosoma mansoni* Eggs, Miracidia and Cercariae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 (supl. I):235-237, 1998.

- Fanning, M.M.; Peters, P.A.; Davis, R.S.; Kazura, J.W. and Mahmoud, A.A.F. Immunopathology of Murine Infection with *Schistosoma mansoni*: Relationship of Genetic Background to hepatosplenic disease and modulation. *Journal of Infectious Disease*, **144**:148-153, 1981.

- Friedberg, T., Grassow, M.A., Bartlomowics-Oesch, B., Siegert, P., Arand, M., Adesnik, M. & Oesch, F. Sequence of a novel CYP2B cDNA coding for a protein which is expressed in a sebaceous gland but not in the liver. *Biochemical Journal*, **287**: 775-781, 1992.

- Galtier, P.; Battaglia, A.; More, J. and Franc, M. Impairment of drug metabolism by the liver in experimental fascioliasis in the rat. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology* **35**: 729-733, 1983.

- Ghandour A. M. and Webbe, G. A Comparative Study of the Death of Schistosomula of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in the Skin of Mice and Hamsters. *Journal of Helminthology*, **50**:39-43, 1976.

- Ghazal, A.; Mahfouz, M.; Makar, A.B. and Ghoneim, M. T.H.. Effect of Schistosomal Infection and of Schistosomicidal Drugs on the Drug Metabolizing Enzymes of Mouse Liver. *Archives of Pharmacology*, **282**:181-186, 1974.

- Gonçalves, L; Pinto, M.R.; Vicente, J.; Noronha, D. e Gomes, D.C. Helminth Parasites of Conventionally Maintained Laboratory Mice – II. Inbred Strains with an Adaptation of the

Anal Swab Technique. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93(1):121-126, 1998.

- Greenlee, W.F. & Poland, A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA-2 mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **205**(3): 596-605, 1978.

- Guengerich, F.P. and MacDonald, T.L. Mechanism of cytochrome P450 catalysis. *The FASEB Journal*, **4**: 2453-2459, 1990.

- Harrison, R.A. and Doenhoff, M.J. Retarded Development of *Schistosoma mansoni* in Immunosuppressed Mice. *Parasitology*, **86**,: 429-438, 1983.

- Honkakoski, P.; Auriola, S. and Lang, M.A. Distinct induction profiles of three phenobarbital-responsive mouse liver cytochrome P450 isozymes. *Biochemical Pharmacology*, **43**:2121-2132, 1992.

- Iersel, M.V., Walters, D.G., Price, R.J., Lovell, D.P. & Lake, B.G. Sex strain differences in mouse hepatic microsomal coumarin 7-hydroxylase activity. *Food and Chemical Toxicology*, **32**(4): 378-390, 1994.

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

- Jankovic et al.. CD4<sup>+</sup> T cell mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B-dependent mechanism requiring Fc receptor signalling. *Journal of Experimental Medicine*, **187**: 619-629, 2000.

- Joseph, A.L. and Boros, D.L. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *Journal of Immunology*, **151**: 5461-5471, 1993.

- Juvonen, R.O., Shkumatov, V.M., & Lang, M.A. Purification and characterization of a liver microsomal cytochrome P450 isoenzyme with a high affinity and metabolic capacity

for coumarin from pyrazole-treated D2 mice. *European Journal of Biochemistry*, **171**: 205-211, 1985.

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

- Kirby, G.M., Pelkonen, P., Vatanasapt, V., Camus, A-M., Wild, C.P. & Lang, M. Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Molecular Carcinogenesis*, **11**: 81-89, 1994.

- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.

- Lang, M.A., Juvonen, R., Jarvinen, P., Honkakoski, P., & Raunio, H. Mouse liver P450Coh: Genetic regulation of the pyrazole-inducible enzyme and comparison with other P450 isoenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **271**(1): 139- 148, 1989.

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

- Lenzi, H.L., Lenzi, J.A., Kerr, I.B., Antunes, S.L.G, Mota, E.M. &Oliveira, D.N. Extracelular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **86** (supl III): 77-90, 1991.

- Lenzi, H.L.; Kimmel, E.; Schechtman, H.; Pelajo-Machado, M.; Romanha, W.S.; Pacheco, R.G.; Mariano, M. e Lenzi, J.A. Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93** (supl I): 141-151, 1998.

- Lewis, D.F.V. Cytochromes P450 structure, function and mechanism. 1<sup>st</sup> ed Taylor & Francis. T.J. Press, London, Bristol, 1996.

- Lewis, D.F.V.; Watson, E. and Lake, B.G. Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutation Research*, **410**:245-270, 1998.
- Lindberg, R.L.; Juvonen, R. And Negishi, M. Molecular characterization of the murine Coh locus: an amino acid difference at position 117 confers high and low coumarin 7-hydroxylase activity in P450coh. *Pharmacogenetics*, **2**:32-46, 1992.
- Lubet, R.A., Syi, J.-L.; Nelson, J.O. and Nims, R.W. Induction of hepatic cytochrome P450 mediated alkoxyresorufin O-dealkylase activities in different species by prototype P450 inducers. *Chemical Biological Interactions*, **75**:325-339, 1990.
- Magzoub, M and Adam, S.E.I. Experimental infection and hepatic changes in mice infested with schistosoma mansoni (sudan strain). *Journal of Pathology*, **113**:47-52, 1974.
- Mansuy, D. The great diversity of reactions catalyzed by cytochrome P450. *Comparative Biochemical and Physiology, Part C*, **121**: 5-14, 1998.
- Morgan, E.T. Regulation of cytochromes P450 during Inflammation and infection. *Drug Metabolism Reviews*, **29**(4): 1129-1188, 1997.
- Morgan, E.T.; Sewer, M.B.; Iber, H.; Gonzalez, F.J.; Lee, Y.; Tukey, R.H.; Okino, S.; Vu, T.; Chen, Y.; Sidhu, J.S. and Omiecinski, C.J. Physiological and pathological regulation of cytochrome P450. *Drug Metabolism and Disposition*, **26**(12):1232-1240, 1998.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. & Waxman, D.J. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology*, **10**: 1-14, 1991.
- Negishi, M., Iwasaki, M., Juvonen, R.O., Sueyoshi, T., Darden, T.A. & Pedersen, L.G.

Structural flexibility and functional versatility of cytochrome P450 and rapid evolution. *Mutation Research*, **350**: 43-50, 1996.

- Nelson, D.R. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **369**(1): 1-10, 1999.

- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., & Nebert, D.W. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, **12**: 1-51, 1993.

- Nerukar, P.V., Park, S.S., Thomas, P.E., Nims, R.W. & Lubet, R.A. Methoxiresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochemical Pharmacology*, **46**: 933-943, 1993.

- Nims, R.W. & Lubet, R.A. CYP2B Subfamily. *In*: Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects, Ioannides, C., 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 136-151, 1996.

- Omura, T. and Sato, R. A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, **237**, PC1375, 1962.

- Omura, T. and Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **239**(7):2370-2384, 1964.

- Omura, T. Forty Years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **266**:690–698, 1999.

- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine*, **173**: 159-165, 1991.

- Pearce, E.J. and Pedras-Vanconcelos, J.P. Schistosome mansoni infection induces type 1 CD8<sup>+</sup> cell response. *Behring Institut Mitt.*, **99**: 79-84, 1997.
- Pearce, R., Greenway, D., & Parkinson, A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450A enzymes effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **298**: 211-225, 1992.
- Pelkonen, P.; Honkakoski, P.; Geneste, O.; Bartsch, H. and Lang, M.A. Comparison of hamster and mouse reveals interspecies differences in the regulation of hepatic CYP2A isozymes. *Biochemical Pharmacology* **46**: 1681-1687, 1993.
- Philips, I.R.; Shepard, E.A.; Mitani, F. and Rabin, B.R. Induction by phenobarbital of the mRNA for a specific variant of rat liver microsomal cytochrome P450. *Biochemical Journal*, **196**:839-851, 1981.
- Posti, K., Leinonen, S., Tetri, S., Kottari, S., Viitala, P., Pelkonen, O. & Raunio, H. Modulation of murine phenobarbital-inducible CYP2A5, CYP2A10 e CYP1A enzymes by inhibitors of protein kinases and phosphatases. *European Journal of Biochemistry*, **264**: 19-26, 1999.
- Renton, K.W. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicology*, **142**: 173-178, 2000.
- Rey, L. .Parasitologia 32:351-362, 2º ed, Guanabara Koogan – Rio de Janeiro, 1991.
- Rezende, S. Mice lacking the gamma interferon receptor have a impaired granulomatous reaction to *Schistosoma mansoni* infection. *Infection Immunology*, **65**: 3457-3461, 1997.
- Ritter, D. and McKerrow, J. Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation, *Infection Immunology*, **64**: 4706-4713, 1996.
- Sharma, M.C.; Agrawal, A.K.; Sharma, M.R. and Shapiro, B.H. Interactions of Gender,

Growth Hormone, and Phenobarbital Induction on Murine Cyp2B Expression. *Biochemical Pharmacology*, **56**:1251-1258, 1998.

- Sheweita, S.A.; Abu El-Maati A.B.; El-Shahat, F.G. and Bazeed, M.A. Changes in the expression of cytochrome P450 2E1 and the activity of carcinogen-metabolizing enzymes in *Schistosoma haematobium*-infected human bladder tissues. *Toxicology*, **162**:43–52, 2001

- Sheweita, S.A., Mangoura, S.A. & El-Shemi, A.G., Different levels of *Schistosoma mansoni* infection induce changes in drug-metabolizing enzymes. *Journal of Helminthology*, **72**: 71-77, 1998.

- Smithers, S.R. and Terry, R.T. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and recovery of adults worms. *Parasitology*, **55**:695-700, 1965.

- Tekwani B.L., Tripathi, L.M., Mukerjee, S., Gupta, S., Pandey, V.C., Katiyar, J.C., Ghatak, S. & Shukla, O.P. Hepatic microsomal cytochrome P450 system during experimental hookworm infection. *Experimental Molecular Pathology*, **52**: 330-339, 1990.

- Vermeulem, N.P.E. Role of metabolism in chemical toxicity. *In*: Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects, Ioannides, C., 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 136-151, 1996.

- Warren, K.S. and Peters, P.A. Comparison of Penetration and Maturation of *Schistosoma mansoni* in the Hamster, Mouse, Guinea Pig, Rabbit and Rat. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **16**(6):718-722, 1967.

- Weaver, R.J.; Dunbar, B.; Dickins, M.; Melvin, W.T.; Fothergill, J. and Burke, M.D. Evidence for a new cytochrome P450 form induced by 3-methylcholanthrene in rats. *Biochemical Pharmacology*, **47**:1457-1460, 1994.

- Werck-Reichhart, D. & Feyereisen, R. Cytochromes P450: A Success History. *Genome Biology*, **1**(6): 1-9, 2000.

- World Health Organization. The control of schistosomosis. Report of a WHO Expert Committee, WHO, Geneva, *Technical Report Series* No. 728., 1985.
  
- Wood & Taylor 1979 appud Chang&Waxman. CYP2A Subfamily *In: Cytochromes P450: .Metabolic and Toxicological Aspects*, Ioannides, C., 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 99-134, 1996.
  
- Wood, A.W. and Conney, A.H. Genetic variation in coumarin hydroxylase activity in the mouse (*Mus musculus*). *Science* **185**(16):612-614, 1974.
  
- Wynn, T.A. et al. An Il-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*, **376**: 594-596, 1995.
  
- Wynn, T.A.; et al. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation indeced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, **151**: 1430-1440, 1993.
  
- Yoshioka, H., Lindberg, R., Wong, G., Ichikawa, T., Itakura, T., Burkhart, B. & Negishi, M. Characterization and regulation of sex-specific mouse steroid hydroxylases genes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **68**: 754-761, 1990.

## 8 – ANEXO

### 8.1 – Experimento preliminar: Peso do fígado, dos intestinos e do baço

No dia do sacrifício e após a perfusão, foram registrados os pesos do fígado, do baço e dos intestinos (sem as fezes) de cada animal. Após a pesagem, os baços foram descartados mas os fígados e intestinos foram digeridos com hidróxido de potássio a 4%, para contagem dos ovos.

A infecção, como esperado, aumentou o peso absoluto do fígado. Este aumento foi evidente nos camundongos sacrificados 55 e 90 dias após a infecção (Tabela 8.1), sendo mais acentuado naqueles animais em que a doença evoluiu por mais tempo (*i.e.* 90 dias pós-infecção). Não há porém, diferenças claras entre linhagens e idades de infecção quanto ao aumento do peso absoluto do fígado. A hepatomegalia nos animais infectados foi ainda mais evidente quando o peso relativo do órgão foi calculado (tabela 8.2).

Os pesos dos intestinos também aumentaram em decorrência da infecção por *S. mansoni*. A análise dos pesos absolutos revelou que este aumento de peso foi mais evidente entre os camundongos *Swiss Webster* infectados quando adultos (45 dias) e sacrificados 55 e 90 dias após a infecção. O aumento do peso dos intestinos também foi observado entre os camundongos da linhagem DBA/2, principalmente entre aqueles infectados com 10 dias de vida e sacrificados 55 e 90 dias após infecção (Tabela 8.3). Este aumento do peso dos intestinos causado pela infecção foi ainda mais evidente quando os pesos relativos do órgão foram comparados entre infectados e controles (Tabela 8.4). Nos animais infectados com 10 dias de vida o peso relativo dos intestinos – nas duas linhagens – cresce a medida que a duração da doença aumenta. Contrastando com o que ocorre entre os camundongos infectados, o peso relativo dos intestinos dos animais controles (não infectados) parece manter-se razoavelmente constante entre os 45 dias (35 pós-infecção) e 100 (90 pós-infecção) dias de vida. Este efeito não é claro nos grupos que foram infectados na idade adulta (45 dias de vida). Exceção à tendência anteriormente delineada, e fato isolado entre os achados deste estudo, foi a diminuição do peso relativo dos intestinos constatada entre os camundongos DBA/2 infectados com 45 dias de vida e sacrificados 35 dias após a infecção (Tabela 8.4).

A infecção por *S. mansoni* aumentou de forma acentuada o peso dos baços. O aumento de peso do baço foi mais evidente do que aquele observado com o fígado e intestinos em todos os grupos estudados. Os pesos absoluto e relativo do baço foram maiores nos camundongos infectados do que nos seus respectivos controles, em quase todos os grupos estudados (Tabelas 8.5 a 8.8).

Vale a pena discutir aqui algumas diferenças entre o que foi observado neste experimento preliminar e o que constatamos no estudo subsequente (seção 4.2; ensaios de atividade enzimática). No estudo posterior (seção 4.2), em que o *n* por grupo foi maior (15 animais por grupo), o aumento do peso do fígado pareceu ser bem mais discreto do que o que foi notado no estudo preliminar. Esta diferença poderia sugerir que a infecção, com a mesma carga parasitária (100 cercárias), teria causado mais danos ao fígado (ou teria sido mais severa) no experimento preliminar do que no estudo subsequente em que avaliamos a atividade de enzimas CYP hepáticas. Entretanto, o peso do fígado não pode ser comparado entre os dois experimentos sem levar em conta que os procedimentos que precederam a pesagem do órgão foram diferentes nos dois casos. No experimento preliminar, os animais infectados foram perfundidos com uma solução de salina citratada, enquanto os seus respectivos controles não infectados não foram previamente submetidos à perfusão. Por outro lado, no estudo posterior (ensaios enzimáticos), nem os camundongos controles nem os infectados foram perfundidos. Neste último caso os fígados foram rapidamente removidos, resfriados e pesados. Embora a solução de perfusão fosse considerada isotônica, não é possível excluir a possibilidade de que este procedimento tenha alterado (aumentado) a quantidade de líquidos do tecido hepático e que, pelo menos em parte, as diferenças entre controles (não perfundidos) (Tabelas 8.5, 8.7 e 8.9 a 8.12) e infectados (perfundidos) (Tabelas 8.1 a 8.4, 8.6 e 8.8) se devam a esta manipulação prévia. Assim sendo, o aumento do peso do fígado de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* constatado no experimento subsequente (seção 4.2) provavelmente traduz de forma mais confiável o efeito da infecção sobre a massa hepática.

A mesma ressalva que fizemos em relação ao fígado pode ser estendida também às alterações de peso que ocorreram com o baço e os intestinos, porque a perfusão foi

sistêmica. O aumento de peso de baço foi confirmado no estudo subsequente (seção 4.2) mas os intestinos não foram pesados neste segundo experimento.

Tabela 8.1 – Peso absoluto do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55	90
<i>Swiss Webster</i>	♂	2,08±0,3	2,22±0,58	3,48±0,9	2,05±0,26	3,12±0,56	2,93±0,21
	♀	1,83±0,33	2,36±0,39	3,0±0,64	1,72±0,36	2,47±0,45	2,75±0,58
DBA/2	♂	1,07±0,07	1,35±0,11	1,4±0,13	1,21±0,12	1,31±0,24	1,64±0,24
	♀	0,86±0,18	1,0±0,1	1,15±0,26	1,11±0,06	1,28±0,08	1,27±0,21

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos absolutos em gramas de fígados de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo).

Tabela 8.2 – Peso relativo (%) do fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):						
	35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss Webster</i>	♂	6,32±1,21	7,29±0,79	8,77±1,73	4,60±0,59	6,91±0,66	6,85±0,54
	♀	5,64±0,46	7,76±1,30	8,75±1,29	4,39±0,44	6,21±0,77	6,29±1,12
DBA/2	♂	6,11±0,34	7,62±0,48	6,95±0,86	5,32±0,39	5,70±0,55	7,16±0,15
	♀	6,04±1,38	6,64±1,02	7,76±2,63	5,32±0,49	5,85±0,51	5,84±0,73

Valores representados como média ± DP do peso relativo de fígados de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo). Peso relativo = [(peso do órgão x 100) ÷ peso corporal].

Tabela 8.3 – Peso absoluto do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	35	55	90	35	55	90	
Tempo de evolução após a infecção (dias):							
<i>Swiss Webster</i>	♂	2,64±0,32	2,43±0,69	3,86±0,63	2,73±0,56	3,97±0,64	3,75±0,42
	♀	2,76±0,4	3,20±0,48	4,47±0,87	2,39±0,26	3,38±0,56	3,20±0,53
DBA/2	♂	1,26±0,38	1,79±0,15	1,66±0,06	1,26±0,29	1,66±0,36	1,84±0,47
	♀	1,04±0,07	1,57±0,14	1,76±1,27*	1,21±0,09	1,74±0,41	1,65±0,32

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos absolutos em gramas de intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo).

Tabela 8.4 – Peso relativo (%) dos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):						
	35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss Webster</i>	♂	7,93±0,79	8,01±1,48	9,87±1,49	6,11±1,11	8,78±0,40	8,81±1,37
	♀	8,41±1,42	10,57±1,76	13,12±2,20	6,09±0,38	8,53±1,2	7,39±1,36
DBA/2	♂	7,24±2,23	10,11±0,80	7,75±1,41	5,48±0,98	7,17±1,12	8,07±1,79
	♀	7,26±0,70	10,30±0,79	11,86±3,06	5,78±0,74	7,90±1,72	7,60±1,40

Valores representados como média ± DP do peso relativo dos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, ( $n = 5$  por grupo). Peso relativo = [(peso do órgão x 100) ÷ peso corporal].

Tabela 8.5 – Peso absoluto do baço (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a 'controles' de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):						
	35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss Webster</i>	♂	0,24±0,04	0,2±0,04	0,24±0,06	0,29±0,05	0,21±0,03	0,32±0,04
	♀	0,21±0,08	0,21±0,04	0,17±0,05	0,31±0,08	0,29±0,14	0,22±0,03
DBA/2	♂	0,08±0,01	0,08±0,01	0,14±0,03	0,10±0,02	0,21±0,25	0,10±0,01
	♀	0,07±0,02	0,10±0,01	0,11±0,02	0,08±0,01	0,33±0,44	0,09±0,02

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos absolutos em gramas de baços de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo).

Tabela 8.6 – Peso absoluto do baço (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

		10 dias			45 dias		
		Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55
<i>Swiss Webster</i>	♂	0,35±0,15	0,37±0,34	0,74±0,40	0,32±0,13	0,66±0,1	0,68±0,47
	♀	0,38±0,13	0,41±0,1	0,86±0,42	0,33±0,08	0,53±0,19	0,53±0,17
DBA/2	♂	0,30±0,34	0,18±0,03	0,26±0,08	0,15±0,03	0,18±0,02	0,23±0,04
	♀	0,13±0,03	0,15±0,04	0,26±0,15	0,13±0,01	0,18±0,02	0,17±0,05

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos absolutos em gramas de baços de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo).

Tabela 8.7 — Peso relativo (%) do baço de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a 'controles' de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Idade na Infecção:	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55	90
<i>Swiss Webster</i>	♂	0,77±0,11	0,58±0,15	0,53±0,13	0,67±0,16	0,47±0,07	0,73±0,13
	♀	0,66±0,22	0,60±0,11	0,48±0,16	0,74±0,16	0,70±0,24	0,49±0,04
DBA/2	♂	0,48±0,08	0,39±0,08	0,63±0,15	0,42±0,07	1,01±1,28	0,38±0,05
	♀	0,55±0,19	0,57±0,08	0,56±0,14	0,48±0,11	1,96±2,32	0,46±0,08

Valores representados como média ± DP do peso relativo dos baços de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo). Peso relativo = [(peso do órgão x 100) ÷ peso corporal].

Tabela 8.8 — Peso relativo (%) do baço de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 infectados com *S. mansoni* e que foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os grupos foram definidos segundo a linhagem, o sexo, a idade no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e a duração da evolução da esquistossomose mansônica (tempo de evolução pós-infecção) antes do sacrifício.

Idade na Infecção:	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):						
	35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss Webster</i>	♂	1,06±0,5	1,17±0,88	1,84±0,8	0,71±0,3	1,48±0,16	1,68±1,30
	♀	1,12±0,28	1,35±0,34	2,43±0,95	0,84±0,20	1,33±0,46	1,21±0,37
DBA/2	♂	1,74±1,99	1,02±0,14	1,26±0,66	0,66±0,14	0,78±0,10	1,02±0,07
	♀	0,88±0,21	0,98±0,22	1,66±0,76	0,61±0,07	0,84±0,13	0,80±0,21

Valores representados como média ± DP do peso relativo dos baços de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo). Peso relativo = [(peso do órgão x 100) ÷ peso corporal].

Tabela 8.9 –Peso absoluto do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a “controles” de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55	90
<i>Swiss Webster</i>	♂	2,08±0,41	2,03±0,16	2,7±0,6	2,06±0,25	2,16±0,06	2,35±0,1
	♀	1,6±0,32	2,12±0,47	1,7±0,12	1,78±0,09	2,09±0,62	1,82±0,16
DBA/2	♂	0,91±0,05	1,09±0,08	1,12±0,08	1,29±0,11	1,22±0,14	1,36±0,11
	♀	0,97±0,05	1,14±0,2	0,96±0,09	0,9±0,14	1,06±0,07	0,94±0,05

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos absolutos em gramas de fígados de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo).

Tabela 8.10 –Peso absoluto dos intestinos (g) de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2* não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a ‘controles’ de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55	90
<i>Swiss Webster</i>	♂	2,77±0,4	2,6±0,26	3,04±0,48	2,14±0,17	2,23±0,31	2,79±0,11
	♀	2,12±0,29	2,87±0,22	2,59±0,50	2,45±0,31	2,56±0,31	2,99±0,49
<i>DBA/2</i>	♂	1,11±0,13	1,35±0,09	1,32±0,10	1,60±0,15	1,53±0,13	1,53±0,14
	♀	1,07±0,06	1,49±0,2	1,21±0,16	1,35±0,11	1,51±0,2	1,31±0,2

Os dados estão apresentados como média ± DP dos pesos absolutos em gramas de intestinos de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*. ( $n = 5$  por grupo).

Tabela 8.11 – Peso relativo (%) do fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a ‘controles’ de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Idade na Infecção :	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):	35	55	90	35	55	90
<i>Swiss Webster</i>	♂	6,64±1,22	5,91±0,35	5,93±1,30	4,75±0,41	4,85±0,24	5,21±0,44
	♀	5,08±0,74	6,24±1,31	4,70±0,45	4,22±0,2	5,23±1,21	4,18±0,11
DBA/2	♂	5,84±0,95	5,54±0,21	4,92±0,54	5,33±0,37	5,66±0,38	5,13±0,81
	♀	7,89±0,92	6,40±1,88	4,90±0,09	4,67±1,26	5,84±0,85	4,31±0,37

Valores representados como média ± DP do peso relativo de fígados de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2. ( $n = 5$  por grupo). Peso relativo = [(peso do órgão x 100) ÷ peso corporal].

Tabela 8.12 – Peso relativo (%) dos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 não infectados e que não foram perfundidos antes da remoção do órgão. Os vários grupos controles (não infectados) aqui mostrados correspondem a 'controles' de grupos que tinham diferentes idades no momento da infecção (10 e 45 dias de vida pós-natal) e que foram sacrificados 35, 55 e 90 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Idade na Infecção	10 dias			45 dias			
	Tempo de evolução após a infecção (dias):						
	35	55	90	35	55	90	
<i>Swiss Webster</i>	♂	8,89±1,33	7,65±1,29	6,69±1,11	4,99±0,93	4,99±0,68	6,11±0,40
	♀	6,75±0,58	8,42±1,10	7,13±1,73	5,80±0,65	6,45±0,65	6,86±1,02
DBA/2	♂	7,08±1,23	6,83±0,25	5,78±0,64	6,59±0,42	7,13±0,42	5,82±0,49
	♀	8,65±1,36	8,28±1,24	6,15±0,54	7,79±1,24	8,30±1,17	6,79±1,59

Valores representados como média ± DP do peso relativo dos intestinos de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, ( $n = 5$  por grupo). Peso relativo = [(peso do órgão x 100) ÷ peso corporal].