

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

**Alteração do efeito genotóxico da ciclofosfamida e 7,12-dimetil-  
benzantraceno em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*.**

**PEDRO PAULO MAGALHÃES CHRISPIM**

**RIO DE JANEIRO**  
**2005**

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

**Alteração do efeito genotóxico da ciclofosfamida e 7,12-dimetil-benzantraceno em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*.**

**PEDRO PAULO MAGALHÃES CHRISPIM**

**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  
2005**

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

**Alteração do efeito genotóxico da ciclofosfamida e 7,12-dimetil-benzantraceno em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*.**

**Pedro Paulo Magalhães Chrispim**

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado

Co-Orientador: Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em 22 de Julho de 2005 pela banca examinadora:

Prof. Dr.

---

Israel Felzenszwalb  
(membro externo)

Prof. Dr.

---

Arnaldo Maldonado Júnior  
(membro interno)

Profa. Dr.<sup>a</sup>

---

Isabella Fernandes Delgado  
(orientadora)

Profa. Dr.<sup>a</sup>

---

Maria Helena S. Villas Bôas  
(suplente externo)

Profa. Dr.<sup>a</sup>

---

Manuela da Silva  
(suplente interno)

**RIO DE JANEIRO  
2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Chrispim, Pedro Paulo Magalhães

Alteração do efeito genotóxico da ciclofosfamida e 7,12 – dimetil-benzantraceno em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* / Pedro Paulo Magalhães Chrispim - 2005

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado

Co-Orientador: Francisco José Roma Paumgarten

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

1. Micronúcleo. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Ciclofosfamida. 4. DMBA. II. Isabella Fernandes Delgado. III. Título

***DEDICO ESSE TRABALHO À  
MINHA FAMÍLIA, EM ESPECIAL À  
MINHA MÃE.***

## AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora **Isabella Fernandes Delgado**, por me receber de braços abertos, por acreditar que o trabalho era possível, mesmo quando minhas viagens a trabalho apontavam o contrário e pela revisão da dissertação.

Ao professor e orientador **Francisco José Roma Paumgarten**, por me receber de braços abertos, permitindo que o trabalho fosse desenvolvido em seu laboratório e pelas valiosas observações metodológicas no aprendizado da experimentação *in vivo*.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental, em especial à **Rosângela**, amiga pra toda hora que me ensinou amar meus animais e a manejá-los adequadamente, à **Barbara** pelo material bibliográfico, ao **Renan** (sem sua ajuda no biotério ia ser quase impossível!) e além de colega no Laboratório à minha, por vezes, companheira de bancada **Kátia Poça**, pelo trabalho em conjunto ao aprender a técnica do micronúcleo.

À minha chefe na Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro, **Maria de Fátima**, por permitir continuar com o mestrado até sua conclusão.

Aos meus amigos de Faculdade **Hugo Verli** e **Alexandre Calazans**, cujos exemplos e conversas me inspiraram.

Aos professores e amigos **Luiz Eduardo Carvalho** e **José Roberto Meyer Fernandes** da UFRJ pelas orientações que recebi durante a Faculdade.

À professora **Whei Oh Lin**, minha primeira orientadora acadêmica e sempre amiga, que aguçou e, pela primeira vez, sistematizou minha curiosidade.

À **equipe de segurança** da Expansão do Campus, sempre compreensiva nas vezes em que esqueci de pedir autorização para frequentar o prédio aos fins de semana, aos feriados e às madrugadas, possibilitando a realização dos experimentos nesses horários alternativos.

À **CAPES**, pela bolsa de estudos durante o primeiro ano do mestrado e à **SECA/ENSP**.

## RESUMO

Tem sido observado que, em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, a atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos está alterada. Aos 55 dias após a infecção de camundongos com 100 cercárias, o fígado se apresenta repleto de granulomas que se formam em torno dos ovos do verme retidos no órgão. Neste momento há redução acentuada dos níveis de citocromos P450 totais e da atividade de várias isoformas hepáticas. A ciclofosfamida (CLF) e o dimetilbenzantraceno (DMBA) são pró-mutágenos que aumentam a frequência de células micronucleadas no sangue periférico e na medula óssea. A CLF é bioativada pelas isoformas das subfamílias CYP2B e 3A, enquanto a ação genotóxica do DMBA depende da sua metabolização por isoformas da subfamília 1A e possivelmente 1B. O objetivo deste trabalho foi investigar se a infecção com *S. mansoni* interfere com a ação clastogênica da CLF e do DMBA. Para isso camundongos suíços com dez dias de vida foram aleatoriamente divididos em dois grupos (infectados e não infectados). Cinquenta e cinco dias após a infecção, cada grupo foi subdividido, ao acaso, em dois outros grupos que receberam CLF ou DMBA por via intraperitoneal. Camundongos tratados apenas com os veículos (salina e óleo de milho) foram usados como controles. Os animais foram mortos 24h após o tratamento, sendo as medulas ósseas do fêmur retiradas para preparo dos esfregaços e determinação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN). Os resultados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Os resultados foram: 1) A frequência de EPCMN não diferiu entre animais (controles veículo e não tratados) não infectados e infectados com *S. mansoni*. 2) A infecção atenuou consideravelmente o efeito clastogênico (frequência de EPCMN) da CLF e DMBA. Nossos resultados indicam que a infecção com *S. mansoni* atenuou o efeito genotóxico de pró-mutágenos que são ativados por isoformas citocromo P450 das subfamílias 1A, 2B em camundongos. Esses achados são consistentes com os resultados de estudos anteriores do nosso laboratório mostrando que a infecção com *S. mansoni* diminuiu a atividade de citocromos P450 1A1 e da subfamília 2B no fígado de camundongos.

Palavras-chave: micronúcleo, *Schistosoma mansoni*, ciclofosfamida, DMBA.

## ABSTRACT

It has been shown that the activity of xenobiotic biotransformation enzymes is altered in *S. mansoni* infected mice. Mice infected with 100 cercariae, on the 55<sup>th</sup> postinfection day, have its liver filled with granulomas made by liver trapped eggs. At this moment there is a high reduction of the Cytochrome P450 total levels and also of its isoforms activities. Cyclophosphamide (CLF) and dimethylbenzanthracene (DMBA) are promutagens that increase micronucleated cells frequency in bone marrow and in peripheral blood. The CLF is bioactivated by CYP2B and 3A isoforms, while DMBA genotoxicity is mediated by 1A subfamily and possibly 1B isoforms. The main objective of this work was to investigate if the *S. mansoni* infection interferes with CLF and DMBA clastogenic effects. Ten-days alive Swiss-Webster mice were randomly divided into two groups (infected and non-infected). On the 55th postinfection day each group was again randomly divided into two another groups treated intraperitoneally with CLF or DMBA. Corn oil or saline treated mice were used as controls. Animals were sacrificed 24h after treatment, being their bone marrow withdrawn for future smear and micronucleated polychromated erythrocytes (MNPCE) frequency determination. Results were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test. The results were 1) Controls (untreated and vehicle group) MNPCE frequencies didn't differ from *S. mansoni* infected and non-infected animals. 2) Infection has considerably attenuated CLF and DMBA clastogenic effect (MNPCE frequencies). These results indicate that the *S. mansoni* infection has attenuated mice genotoxic effects of CYP1A and CYP2B subfamilies activated promutagens.

Keywords: micronucleus, *Schistosoma mansoni*, cyclophosphamide, DMBA.



## SUMÁRIO DE QUADROS

<b>QUADRO 1.</b> EXEMPLOS DE REAÇÕES CATALISADAS POR ENZIMAS DO SISTEMA DO CITOCROMO P450. ....	5
<b>QUADRO 2.</b> DIAGRAMA DO TRATAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS. VIDE TEXTO PARA DESCRIÇÃO DETALHADA DOS TRATAMENTOS. ....	33

## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> ÍNDICE DE PENETRAÇÃO (IP%) DAS CERCÁRIAS DE <i>S. MANSONI</i> NOS CAMUNDONGOS. ....	39
<b>TABELA 2.</b> PESO CORPORAL (G) DOS CAMUNDONGOS NO DIA DA INFECÇÃO COM CERCÁRIAS DE <i>S. MANSONI</i> . .....	39
<b>TABELA 3.</b> PESO CORPORAL (G) DOS CAMUNDONGOS NO DIA EM QUE FORAM MORTOS.....	40
<b>TABELA 4.</b> GANHO MÉDIO DE PESO CORPORAL (G) DOS CAMUNDONGOS SUÍÇOS, MACHOS E FÊMEAS, DURANTE O PERÍODO DE 55 DIAS DE INFECÇÃO COM <i>S. MANSONI</i> . ....	41
<b>TABELA 5.</b> FREQUÊNCIA (%; MÉDIA ± DP) DE EPCMN NOS CAMUNDONGOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS COM <i>S. MANSONI</i> QUE NÃO FORAM EXPOSTOS A AGENTES GENOTÓXICOS.....	43
<b>TABELA 6.</b> FREQUÊNCIA DE EPCMN (%) EM RELAÇÃO AO TOTAL DE EPC E PERCENTAGEM DE EPC EM RELAÇÃO AO TOTAL DE ERITRÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.....	44
<b>TABELA 7.</b> FREQUÊNCIA DE EPCMN (%) EM RELAÇÃO AO TOTAL DE EPC E PERCENTAGEM DE EPC EM RELAÇÃO AO TOTAL DE ERITRÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA PARA OS GRUPOS CONTROLE. ....	46

## SUMÁRIO DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1.</b> ALTERAÇÃO DE PESO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS APÓS A INFECÇÃO COM 100 CERCÁRIAS DE <i>S. MANSONI</i> AOS 10 DIAS DE VIDA.....	42
<b>GRÁFICO 2.</b> FREQUÊNCIA DE EPCMN EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS.....	46

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> EXEMPLOS DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS EM MEDULA ÓSSEA.....	13
<b>FIGURA 2.</b> CICLO EVOLUTIVO DO <i>SCHISTOSOMA SPP.</i> .....	14
<b>FIGURA 3.</b> DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ÁREAS ENDÊMICAS PARA ESQUISTOSSOMOSE NA ÁFRICA E ÁSIA .....	15
<b>FIGURA 4.</b> DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ÁREAS ENDÊMICAS PARA ESQUISTOSSOMOSE NAS AMÉRICAS E ÁFRICA.....	16
<b>FIGURA 5.</b> ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAL (R) E PLANA DO PRAZIQUANTEL.....	22
<b>FIGURA 6.</b> FÍGADOS DE CAMUNDONGOS .....	38
<b>FIGURA 7.</b> MICRONÚCLEO EM ERITRÓCITO POLICROMADO EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA.....	44

## SUMÁRIO

SUMÁRIO DE QUADROS .....	ix
SUMÁRIO DE TABELAS .....	x
SUMÁRIO DE GRÁFICOS .....	xi
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	xii
SUMÁRIO .....	xiii
ABREVIATURAS USADAS.....	xv
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1. Bioativação/biotransformação .....	1
1.1. Citocromo P450 .....	2
1.1.1. Nomenclatura dos Citocromos P450 .....	4
1.2. Subfamília CYP1A: metabolismo do 7, 12 - dimetilbenzantraceno .....	6
1.3. Subfamília CYP2B e isoforma CYP3A4: metabolismo da ciclofosfamida .....	8
2. Avaliação da Toxicidade Genética: teste do micronúcleo.....	11
3. Modelo experimental Animal: A esquistossomose .....	13
3.1. Biologia .....	13
3.2. Epidemiologia.....	17
3.3. Fisiopatologia e manifestações clínicas.....	19
3.4. Tratamento.....	21
4. Esquistossomose crônica .....	24
4.1. Modulação do metabolismo de xenobióticos pela infecção .....	27
4.2. Modulação do metabolismo de xenobióticos pela inflamação.....	28
4.3. Mecanismo molecular .....	29
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
5. Animais.....	31
6. Grupos experimentais .....	32
7. Trematódeos e Infecção.....	33
8. Índice de penetração .....	34
9. Exposição ao agente clastogênico .....	34
10. Eutanásia, coleta da medula óssea e preparo das lâminas .....	35
11. Análise Estatística dos dados.....	36
12. Reagentes e demais equipamentos .....	36
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
13. Sinais de toxicidade e manifestação clínica da infecção com <i>S. mansoni</i> .....	38
14. Eficiência da infecção dos camundongos com cercárias de <i>S. mansoni</i> .....	38
15. Alteração do peso corpóreo dos animais .....	39
16. Efeito da Infecção com <i>S. mansoni</i> sobre a Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN).....	42
17. Efeito da ciclofosfamida (CLF) e do 7, 12 - dimetilbenzantraceno (DMBA) sobre a frequência de EPCMN .....	43

18. Efeitos da infecção com <i>S. mansoni</i> e do tratamento com CLF e DMBA sobre o percentual de Eritrócitos Policromados no total de eritrócitos da medula óssea (mielotoxicidade).....	45
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
19. Sobre o método de infecção com <i>Schistosoma mansoni</i> .....	47
20. Sobre a atenuação do efeito genotóxico da CLF e do DMBA em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .....	48
21. Sobre a mielotoxicidade .....	50
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>52</b>

## ABREVIATURAS USADAS

<b>AhR</b>	Aryl Hydrocarbon Receptor (do inglês Receptor de Hidrocarboneto Arílico)
<b>CAS</b>	Chemical Abstract Service
<b>CLF</b>	Ciclofosfamida
<b>C<sub>max</sub></b>	Concentração plasmática máxima de um fármaco (ou xenobiótico) após administração única.
<b>CYP</b>	Cytochrome P450 (Citocromo P450)
<b>DMBA</b>	7,12-Dimetil Benzantraceno
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EPC</b>	Eritrócitos Policromados
<b>EPCMN</b>	Eritrócitos Policromados Micronucleados
<b>HHA</b>	Hidroxilase de Hidrocarbonetos Arílicos
<b>HPA</b>	Hidrocarboneto Poliaromático
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IARC</b>	International Association for Research on Cancer (Associação Internacional para Pesquisa em Câncer)
<b>ICPEMC</b>	International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (Comissão Internacional de Proteção contra Mutágenos e Carcinógenos Ambientais)
<b>LPS</b>	Lipo Poli Saccaride (Lipo Poli Sacarídeo)
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NADPH</b>	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma oxidada.
<b>NFI</b>	Nuclear Transcription Factor I (Fator de Transcrição Nuclear I)
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric acid-reactive substances (Substâncias Tiobarbitúricas ácido-reativas)
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)
<b>WHO</b>	World Health Organisation (Organização Mundial da Saúde)

## INTRODUÇÃO

### 1. Bioativação/biotransformação

O processo pelo qual compostos endógenos (endobióticos) e substâncias não-nutrientes estranhas ao organismo (xenobióticos) são alterados por reações enzimáticas que ocorrem em seres vivos é conhecido como biotransformação. A biotransformação é um processo complexo do qual participam uma grande diversidade de enzimas encontradas em diferentes tecidos e locais dentro das células, e que possuem diferentes mecanismos de regulação e afinidades por substratos (Parkinson, 2001). As enzimas de biotransformação distribuem-se por todos os tecidos do organismo mas, como poderia ser esperado, concentram-se particularmente naqueles órgãos e tecidos que se localizam nas portas de entrada dos xenobióticos como os pulmões, o epitélio nasal e os intestinos (Parkinson, 2001).

A atividade das enzimas de biotransformação podem ser moduladas por vários fatores tais como o estado fisiológico do organismo, doenças e a exposição prévia a xenobióticos (Williams, 1995).

O processo de biotransformação de xenobióticos é subdividido em reações de Fase I e de Fase II. As reações de Fase I incluem a oxidação, a hidrólise e a redução e caracterizam-se por modificar estruturalmente a molécula com a adição ou exposição de grupos funcionais como -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, sendo por vezes chamadas de “funcionalização” (Parkinson, 2001; Benet et al., 1996). As reações de Fase II, por outro lado, incluem a glicuronidação, a sulfonação, a acetilação, a metilação e a conjugação com glutatona e aminoácidos (glicina, taurina, ácido glutâmico). Por vezes, a Fase II da biotransformação é chamada de fase de “conjugação” a substratos endógenos (Parkinson, 2001; Benet et al., 1996; Williams, 1995). As reações de Fase I e Fase II não são obrigatoriamente sequenciadas, podendo ocorrer isoladamente e em ordem inversa. De um modo geral, pode-se dizer que as reações de Fase I e II aumentam a solubilidade aquosa e diminuem a solubilidade lipídica da molécula, facilitando dessa forma a sua eliminação do organismo (Parkinson, 2001; Benet et al., 1996; Williams, 1995).



## 1.1. Citocromo P450

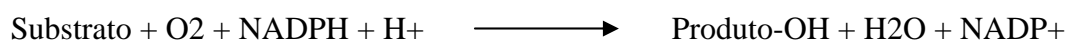
Entre as enzimas que catalisam as reações de Fase I da biotransformação, destacam-se as monooxigenases citocromo P450. As enzimas citocromo P450 são extremamente versáteis aceitando ampla gama de substratos e catalisam importantes reações de Fase I. Enquanto as enzimas responsáveis pelas reações de Fase II da biotransformação se localizam principalmente no citoplasma celular (citosol), as enzimas de Fase I se encontram ligadas às membranas do retículo endoplasmático. Quando há o fracionamento celular no laboratório, as membranas do retículo endoplasmático formam vesículas (microsomas) onde se concentra a atividade das enzimas citocromo P450 (Omura & Sato, 1962; Benet et al., 1996; Omura, 1999).

As enzimas citocromo P450 contêm um grupo heme onde o ferro se encontra em estado de oxidação +3 (férico) que, quando reduzido para +2 (ferroso) e ligado ao monóxido de carbono (CO), apresenta absorção máxima em torno de 450nm (de 447nm a 452nm) com dissociação da ligação Fe-CO (Klingenberg, 1958; Omura & Sato, 1964; Plant, 2003). As outras hemoproteínas conhecidas antes da identificação do pigmento nos microsomas de fígado de rato apresentavam absorção em 420nm (Klingenberg, 1958; Omura 1962; Parkinson, 2001). Quando desnaturada pela ação de ácidos ou detergentes, a proteína do citocromo P450 continua sendo capaz de se ligar ao Ferro, mas a absorção no espectro passa a se dar próximo a 420nm. (Omura & Sato, 1964). Por essa característica, que as diferenciava das outras hemoproteínas conhecidas até então, ela recebeu o nome de citocromo P450 (Omura & Sato, 1962). A absorção em 450nm se deve a um quinto ligante ao grupo heme, um ânion tiolato em resíduo de cisteína, característico dos citocromos P450 (Omura, 1999; Parkinson 2001).

Em eucariotos, como já mencionamos, as enzimas do sistema do citocromo P450 estão ligadas às membranas do retículo endoplasmático. No caso de bactérias, entretanto, as enzimas citocromo P450 são solúveis (Omura, 1999). O grupo heme está ladeado por duas  $\alpha$ -hélices e repousa cercado de resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, o que facilita a acomodação de substratos hidrofóbicos (Omura, 1999). Nos citocromos P450 microsomais existe uma seqüência altamente hidrofóbica na porção N-terminal de cerca de 20 a 25 aminoácidos que ancora a proteína na membrana do retículo endoplasmático. Nas enzimas localizadas na mitocôndria, uma porção de 20 a 40 aminoácidos hidrossolúveis é proteoliticamente clivada após a importação para o interior da organela (Omura, 1999).

As enzimas citocromo P450 foram inicialmente identificadas em microsossomos de fígado, mas sua localização tissular é bem mais abrangente e, como dissemos anteriormente, elas estão presentes em todo o organismo. Entre os órgãos mais importantes de biotransformação catalisada por citocromo P450 destacam-se o fígado, o intestino, os pulmões, os rins, a pele, a placenta, a traquéia, o esôfago e o estômago (Parkinson, 2001; Ding & Kaminsky, 2003).

A reação básica catalisada pelo sistema do citocromo P450 é a monooxigenação, onde o oxigênio molecular é decomposto e um de seus átomos é adicionado a um substrato (um xenobiótico ou uma substância endógena) e o outro reduzido na formação de água, à custa da oxidação do NADPH (Benet et al., 1996; Parkinson 2001). A reação básica é:



Nesse ciclo, as reações catalisadas pelo citocromo P450 envolvem a hemoproteína do citocromo P450, a NADPH citocromo P450 Redutase, o NADPH e o oxigênio molecular, mas devido a rearranjos ocorridos durante as reações, os produtos do sistema do citocromo P450 não se resumem aos álcoois e fenóis e envolvem reações de hidroxilação, N-, O- e S- desalquilações, N-oxidação, sulfoxidação, N-hidroxilação, desaminação, desalogenação e dessulfuração (Benet et al., 1996; Parkinson, 2001).

O mecanismo da reação envolve a formação do complexo substrato-citocromo oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ), que é reduzido ( $\text{Fe}^{+2}$ ) pela citocromo P450 Redutase com o elétron transferido do NADPH. O complexo reduzido reage com o oxigênio molecular e novamente é reduzido pela mesma citocromo P450 Redutase com outro elétron doado por outro NADPH e reage também com um próton, passando de  $\text{Fe}^{+2}\text{O}_2$  para  $\text{Fe}^{+2}\text{OOH}$ . A adição de um segundo próton cliva o complexo, originando uma molécula de água e o complexo  $(\text{FeO})^{+3}$  transfere seu oxigênio para o substrato. O substrato oxidado é liberado, reconstituindo o citocromo P450. A interrupção desse ciclo (desacoplamento) após a adição do primeiro elétron origina um ânion superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ) e, se desacoplado após a adição do segundo elétron, origina peróxido de hidrogênio (Benet et al., 1996; Parkinson, 2001).

As atividades das enzimas do sistema do citocromo P450 podem ser profundamente modificadas pela indução ou inibição das mesmas por xenobióticos (Benet et al. 1996; Parkinson, 2001; Plant, 2003). A indução ou inibição podem alterar a

farmaco- ou toxicocinética e conseqüentemente os efeitos farmacológicos e toxicológicos dos xenobióticos. Os indutores geralmente aumentam a expressão gênica e a atividade enzimática relacionada a uma ou a um conjunto de isoformas citocromo P450. Hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA), por exemplo, induzem as isoformas da subfamília CYP1A (Benet et al., 1996). A indução pode alterar a eliminação da molécula (*e.g.* acelerando-a) e levar ao desenvolvimento de tolerância farmacológica e toxicológica a determinados xenobióticos (Parkinson, 2001). A inibição pode ocorrer por mecanismos competitivos ou não competitivos (Benet, 1996), podendo também ser reversível, quasi-irreversível ou irreversível (Lin & Lu, 2001). Diferenças entre indivíduos quanto à atividade de enzimas citocromo P450 podem ser encontradas naturalmente em conseqüência da existência de polimorfismos genéticos da enzima na população (Parkinson, 2001; Ingelman-Sundberg, 2002).

### 1.1.1. Nomenclatura dos Citocromos P450

Uma enzima tem seu nome normalmente associado com a reação que catalisa e com o substrato sobre o qual atua. Isso não acontece com a superfamília de monooxigenases citocromo P450. Como pode ser visto no quadro 1, não só cada enzima aceita uma ampla gama de substratos diferentes, como cada molécula de xeno- ou endobiótico pode ser substrato para diferentes enzimas (Lewis, 2003; Ingelman-Sundberg, 2004; Kim & Guengerich, 2005; Oguri, 1994). Frequentemente uma mesma enzima apresenta valores próximos de  $K_m^1$  para diferentes substratos, como acontece com a CYP1A2 que atua sobre 4-aminobifenil com  $K_m = 30\mu M$  e sobre aflatoxina B1 com  $K_m = 31\mu M$  (Lewis, 2003). Por outro lado, há enzimas diferentes que catalisam a mesma reação para o mesmo substrato, como acontece com os CYP3A3 e CYP3A4 humanas, os CYP1A1 e CYP2C13 de ratos e os CYP2C3 e CYP3A6 de coelho, todos promovendo a  $6\beta$ -hidroxilação da testosterona (Oguri, 1994).

Em 1989 a União Internacional de Bioquímica propôs o nome de “proteína heme-tiolato” àquelas que compõem o sistema do citocromo P450. Porém, a existência de outras proteínas contendo o grupamento heme ligado ao ânion tiolato sem, no entanto, terem relação com a superfamília do citocromo P450, faz com que o nome não seja sinônimo de citocromo P450 (Omura, 1999; Palmer & Reedijk, 1991). O sistema adotado para nomear as enzimas da superfamília do citocromo P450 se baseia

atualmente no parentesco evolucionário que se depreende dos dendrogramas elaborados a partir das seqüências protéicas dos citocromos P450 (Nelson, 1998).

**Quadro 1.** Exemplos de reações catalisadas por enzimas do sistema do citocromo P450.

REAÇÃO	CYP450	SUBSTRATO	REFERÊNCIA
Hidroxilação alifática	CYP1A1, 2B1	n-Hexano	Oguri et al., 1994
	CYP3A4, 2B6	Ciclofosfamida	Parkinson, 2001
	CYP3A4	Testosterona	Parkinson, 2001
	CYP2C9	Tolbutamida	Parkinson, 2001
Hidroxilação aromática	CYP2B1	Tolueno	Oguri et al., 1994
S-oxigenação	CYP3A4	Omeprazol, Lanzoprazol	Parkinson, 2001
N-Oxigenação	CYP2B1, 2B2	Estricnina	Oguri et al., 1994
Epoxidação	CYP1A1, 1A2	Benzantraceno	Oguri et al., 1994
	CYP2E1	Tricloroetileno	Parkinson, 2001
Formação de dióis	CYP1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2C11	DMBA	Oguri et al., 1994.
N-Desalquilação	CYP1A1, 1A2, 2C3	Teofilina	Oguri et al., 1994
	CYP2C19	Diazepam	Parkinson, 2001
	CYP2E1	Cafeína	Parkinson, 2001
	CYP1A2	Cafeína	Parkinson, 2001
N <sub>1</sub> ,N <sub>7</sub> -desmetilação			
N <sub>3</sub> -desmetilação			

O nome (propriamente dito) da enzima é composto da seguinte forma: CYP, como abreviatura indicativa de entidade integrante do sistema de monooxigenases do citocromo P (do inglês CYtochrome P), seguida do algarismo arábico indicativo da família, por exemplo 1, seguido de uma letra que designa a subfamília, digamos A, seguida, por fim, do algarismo arábico que identifica o membro da referida subfamília.

Assim, o CYP1A1 é o primeiro membro da subfamília A da família 1 da superfamília do citocromo P. Para identificar, classificar e agrupar as enzimas que constituem o sistema do citocromo P450 foi estabelecido arbitrariamente os cortes que designam o parentesco entre elas a partir da homologia apresentada entre as suas seqüências protéicas. Esses cortes se situavam, originalmente, em 40% de similaridade para inclusão na família e 55% para inclusão na subfamília. Entretanto, a similaridade absoluta da seqüência perdeu importância em virtude da construção dos dendrogramas elaborados a partir da seqüência protéica dos citocromos P450. As enzimas citocromo P450 continuam sendo denominadas e classificadas em famílias e subfamílias, mas essas classes são atualmente reconhecidas como ramos isolados dos dendrogramas, e as novas enzimas são classificadas de acordo com o encaixe de suas seqüências protéicas dentro desse dendrograma, havendo prioridade na comparação entre regiões evolutivamente mais conservadas. Os membros de cada subfamília são comumente chamados de “isoformas” do citocromo P450, embora deva ser salientado que não se tratam de isoformas segundo o conceito clássico do termo (Nelson, 1998).

O tipo de organismo em que a isoforma foi identificada é indicado pelo primeiro número do nome. Para as isoformas que foram identificadas em animais o sistema reservou, inicialmente, a numeração das famílias de 1 a 49, para aquelas encontradas em eucariotos inferiores, os números de 51 a 69, para as identificadas em plantas, os números de 71 a 99 e para as encontradas em bactérias numeração tem início a partir de 101.

## **1.2. Subfamília CYP1A: metabolismo do 7, 12 - dimetilbenzantraceno**

A subfamília CYP1A de mamíferos possui duas isoformas induzíveis, a CYP1A1 e a CYP1A2. Entre os seres humanos, os fumantes via de regra apresentam essas isoformas induzidas (Parkinson, 2001). Tanto CYP1A1 quanto CYP1A2 são capazes de O-desalquilar ésteres da fenoxazona, como a 7-metoxiresorufina e a 7-etoxiresorufina, que são empregados como substratos marcadores da atividade destas enzimas microsossomais. A CYP1A1 é uma das principais enzimas envolvidas na hidroxilação e na epoxidação do benzopireno, enquanto a CYP1A2 catalisa a N-hidroxilação de aminas aromáticas (Parkinson, 2001).

Entre os humanos, a isoforma CYP1A2 não é expressa em tecidos extra-hepáticos, enquanto a CYP1A1 não é expressa no fígado. Embora estejam presentes em todos os mamíferos, as funções e a regulação de CYP1A difere entre as espécies. Enquanto os hidrocarbonetos poliaromáticos parecem induzir o CYP1A em todas as espécies estudadas, foi observado que o omeprazol (fármaco que inibe a bomba de prótons da mucosa gástrica usado para tratar úlceras) induziu as isoformas humanas, mas não o faz em camundongos e coelhos (Parkinson, 2001). O estresse oxidativo é capaz de modular negativamente *in vitro* a expressão do CYP1A1 em linhagens celulares originárias de hepatomas de ratos, a H4 II EC3, e de tumores humanos, a HepG2 (Morel & Barouki, 1998).

A maioria dos substratos de CYP1A2 identificados até agora apresenta um heteroátomo e uma estrutura relativamente planar, resultante da conjugação de dois anéis aromáticos e/ou heterocíclicos. Entre esses substratos estão: a cafeína, a fenacetina, o estradiol, a teofilina, a acetanilida, o naproxeno, a melatonina, a aflatoxina B1, a 7-metoxiresorufina e a 7-etoxiresorufina (Lewis, 2003).

As isoformas da subfamília CYP1A estão envolvidas na ativação metabólica de diversos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros carcinógenos químicos, mas diferem em relação aos seus substratos preferenciais. A CYP1A1, com maior afinidade por HPA, tem significativa participação na sua ativação, enquanto a CYP1A2, com maior afinidade por anéis heterocíclicos, não tem a mesma importância clínica (Heidel et al., 2000). Ambas as isoformas são induzidas através da ligação de xenobióticos, como HPA, dioxinas e bifenilas policloradas, com receptores Ah ou receptores de hidrocarbonetos arílicos (Hankinson, 1995). As isoformas do CYP1B também são induzidas por esse mesmo mecanismo (receptor Ah). A expressão das isoformas difere sensivelmente entre tecidos, o que faz com que a participação de uma ou outra enzima no aparecimento de toxicidade ou dano venha a diferir também entre órgãos e tecidos (Hankinson, 1995; Heidel et al., 1998; Heidel et al., 2000; Galván et al., 2003; Galván et al., 2005).

O CYP1B1 também possui importante papel na bioativação dos HPA, arilarenos, nitroarenos e arilaminas e conversão dessas moléculas em metabólitos tóxicos ao DNA. CYP1B1 é expresso constitutivamente em tecidos esteroideogênicos, sendo ativo no metabolismo do estradiol, do benzopireno, BP, e do 7, 12 - dimetilbenzantraceno, o DMBA (Ingelman-Sundberg, 2004). O CYP1B1 é induzido por

dioxinas e sua expressão está aumentada em vários tipos de tumores, sem que haja o aumento correspondente de expressão nos tecidos normais (Murray et al., 2001). Sua localização tecidual em humanos é abrangente, mas o emprego de técnicas diferentes para sua detecção confunde o significado clínico dos achados. Usando a técnica de “Northern blotting” foi possível detectar a presença do RNAm para CYP1B1 em vários tecidos, incluindo rins, fígado, intestinos e cérebro. O uso de anticorpos policlonais e monoclonais para a seqüência C-terminal da proteína, entretanto, não evidenciou esta isoforma em microssomos de fígado humano. Utilizando a Transcriptase Reversa e a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foi possível também identificar o CYP1B1 em fígado, linfócitos, tecidos normais dos seios e nas células epiteliais dos pulmões (Murray et al., 2001).

A especificidade do CYP1B1 vem sendo estudada e alguns dados sugerem que esta isoenzima é mais ativa que CYP1A1 e CYP1A2 na metabolização e bioativação de pró-mutágenos, sendo muito efetiva na bioativação da Aflatoxina B1 (Murray et al., 2001).

O mecanismo de ação tóxica do DMBA envolve a hidroxilação da molécula, com posterior esterificação por sulfotransferases. A clivagem heterolítica da ligação éster dá origem ao carbocátion altamente eletrofílico que se liga ao DNA (Gregus & Klaassen, 2001). A hidroxilação inicial é catalisada pelas enzimas da família CYP1, principalmente pelo CYP1A1 (Oguri, 1994), mas em tecidos extra-hepáticos há importante participação do CYP1B1 na ativação metabólica do DMBA (Heidel et al., 1998; Heidel et al., 2000; Galván et al., 2003; Galván et al., 2005).

### **1.3. Subfamília CYP2B e isoforma CYP3A4: metabolismo da ciclofosfamida**

As isoformas da subfamília CYP2B são pouco expressas no fígado humano, órgão em que muitos membros de diferentes famílias e subfamílias contribuem para a biotransformação de xenobióticos (Parkinson, 2001; Lewis, 2003; Ding & Kaminsky, 2003). A família CYP2 tem importante papel no metabolismo hepático humano. Entre os principais substratos do CYP2C8 estão o ácido araquidônico, a carbamazepina, a cerivastatina, o diclofenaco, o ácido retinóico, o retinol, a rosiglitazona, o taxol, a zopiclona e a amiodarona. Esses substratos são geralmente moléculas de estrutura alongada e possuem um ou dois átomos capazes de participar de pontes de hidrogênio

numa distância de 12 átomos. Entre os substratos de CYP2C9 estão a fenitoína, a tolbutamida, o S-ibuprofeno, a S-warfarina, o S-naproxeno, o piroxicam, o ácido mefenâmico e o losartan, estruturas que tendem a ser não planares, com um sítio de ação distante 10 átomos de um aceptor de ponte de hidrogênio. O CYP2E1 é importante na metabolização de várias moléculas de estruturas bem diferentes e de baixa massa molecular, que possuem um aceptor de ponte de hidrogênio de 3 a 5 átomos de distância do sítio de metabolização. Entre esses substratos de CYP2E1 estão moléculas como o 4-nitrofenol, o paracetamol, a dimetilnitrosamina, a anilina, a acetona, o benzeno, o etanol, o butadieno, o halotano, o ácido láurico, o tolueno e o ácido salicílico (Lewis, 2003). Por outro lado, entre os principais substratos para o CYP2B6 estão a 7-benzoxiresorufina, a 4-trifluorometil, a 7-etoxicumarina, a testosterona, o diazepam e a bupropiona. As estruturas desses substratos variam bastante, aparecendo entre eles moléculas não planares contendo, por vezes, um ou dois anéis aromáticos. Muitos substratos para essa isoforma contêm um aceptor para ponte de hidrogênio a uma distância de 6 a 8 átomos do principal sítio de ação. Os substratos para o CYP2B6 tendem a possuir tamanho médio e caráter fracamente básico, ligando-se à enzima no estado não ionizado (Lewis, 2003). Os níveis normais de CYP2B6 em adultos são baixos, mas a enzima é induzida facilmente pela rifampicina, troziglitazona e anticonvulsivantes como o fenobarbital e a fenitoína, que também induzem o CYP3A4 (Parkinson, 2001).

Os membros da subfamília CYP2B estão entre as enzimas citocromo P450 que foram mais bem estudadas em termos de relações estrutura-atividade e têm tido as suas estruturas modificadas por mutações induzidas experimentalmente para melhor entendimento das reações que catalisam (Roy, 1999; Kumar, 2005). Em seres humanos, o CYP2B6 parece ser o responsável pela bioativação da ciclofosfamida (CLF), convertendo-a em seu metabólito que se liga ao DNA. Em ratos, a enzima ativa na bioativação da CLF parece ser a CYP2B1 (Roy et al., 1999). CYP2B6 e CYP2B1 possuem 76% de homologia (Williams, 1995). O CYP3A4 também metaboliza a CLF, mas em menor extensão (Parkinson, 2001).

As enzimas citocromo P450 mais abundantes nos microssomos hepáticos são da subfamília CYP3A: CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7. Essa última enzima é considerada uma isoforma fetal e as duas primeiras isoformas presentes em adultos (Parkinson, 2001).



O mecanismo de bioativação da CLF, uma mostarda nitrogenada, envolve uma hidroxilação no anel que, rearranjado, sofre uma reação intramolecular nucleofílica originando aziridínio, que é uma espécie eletrofílica (Parkinson, 2001). Na etapa de 4-hidroxilação do anel, a participação de CYP2B6 é, em média, 2 a 4 vezes maior do que a o CYP3A4 enquanto, na segunda etapa, a contribuição de CYP3A4 para a atividade enzimática é maior (Huang et al., 2000).

---

<sup>1</sup> Dados recentes sugerem que muitas isoformas de citocromo P450 apresentam padrões cinéticos de equilíbrio não-Michaelianos, ou atípicos. Provavelmente há mais de um sítio ativo e eles seriam simultaneamente operacionais. Um mesmo substrato seria capaz de se ligar a dois sítios ativos, ou substratos diferentes se ligariam ao mesmo tempo a sítios ativos distintos, perturbando um a cinética do outro (Atkins, 2005).

## 2. Avaliação da Toxicidade Genética: teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo foi desenvolvido inicialmente para ser um teste de “triagem” (*screening*) para identificação de substâncias químicas que promovessem danos ao material genético celular ao nível cromossômico (Schmid, 1975). A substância-teste seria administrada ao animal em tratamento sub-agudo e seu efeito seria mensurado pela contagem da frequência de células micronucleadas na leitura das lâminas de esfregaços da medula óssea (Schmid, 1975). A técnica envolvia o uso de linfócitos do sangue periférico e de culturas destes a partir do sangue periférico. O uso deste teste foi ampliado para o monitoramento de populações expostas a agentes potencialmente danosos ao material genético e é usado também em ensaios voltados para a avaliação da genotoxicidade de substâncias químicas (MacGregor et al., 1987; Heddle, 1983; Ashby & Tinwel, 1996; OECD, 1997; Krishna & Hayashi, 2000; Norppa, 2003; OECD, 2004).

O ensaio do micronúcleo tem algumas importantes vantagens quando comparado ao teste de aberrações cromossômicas tais como a maior facilidade de quantificação do desfecho e menor tempo necessário para treinamento de pessoal especializado (Norppa, 2003). Os dois desfechos, no entanto, são relacionados e o estudo de Hayashi e colaboradores (1983) mostrou a relação existente entre as aberrações cromossômicas e o aparecimento dos micronúcleos.

O princípio do teste é simples: durante a anáfase, fragmentos de cromossomos ou, por vezes, cromossomos inteiros e cromátides acêntricas não acompanham os elementos cujos centrômeros são orientados pelo fuso celular. Após a telófase esses elementos que não foram orientados pelo fuso celular dão origem, nas células filhas, a núcleos secundários (satélites) e bem menores que os principais (Schmid, 1975).

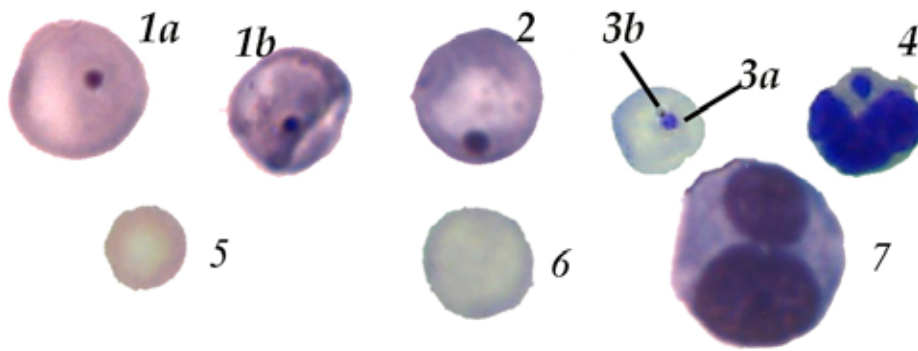
Os micronúcleos aparecem como pequenos grânulos extranucleares que contêm esses elementos fragmentados (ou não) de cromossomos não incluídos em nenhum dos núcleos das células filhas durante a anáfase. Os micronúcleos derivam, portanto, de fenômenos aneugênicos e clastogênicos e servem, igualmente, para evidenciar esses fenômenos (Schmid, 1975; Norppa, 2003). Esses fenômenos, embora resultem de mecanismos diferentes, apresentam desfecho parecido, dependendo da técnica histológica usada para evidenciar esses fenômenos: pequenos grânulos que exibem a mesma coloração do núcleo (figura 1). Os grânulos são normalmente redondos, com bordas bem resolvidas, e raramente apresentam-se ovais ou em forma de meia-lua, mas, por serem menores que os núcleos celulares, recebem o nome de micronúcleos (Schmid,

1975; OECD, 1997; Norppa, 2003). Segundo Fenech e colaboradores (2003b) seus diâmetros variam entre 1/16 e 1/3 do diâmetro do núcleo principal, quando contados em cultura de linfócitos binucleados isolados de sangue periférico.

Os fragmentos que originam o micronúcleo podem também resultar da ação de agentes químicos que perturbem o fuso celular, produzindo aneuploidia (alteração numérica) no lugar de aberração cromossômica, que constitui uma alteração estrutural (Hayashi et al., 1984).

Como os agentes genotóxicos atuam sobre todas as células, indiferentemente, a ocorrência de micronúcleo em eritrócitos (um tipo de célula normalmente anucleada) é um fenômeno que facilita sua identificação e sua contagem. Os elementos não orientados pelo fuso, que não se integraram ao núcleo, tampouco serão expulsos da célula em uma fase posterior (Krishna & Hayashi, 2000). O aumento da frequência de micronúcleos em eritrócitos refletirá, portanto, o aumento de dano induzido ao cromossomo. Os eritrócitos podem ser divididos em dois tipos: imaturos (jovens, policromáticos, ou policromados) e maduros (normocromáticos ou normocromados). A ocorrência de micronúcleos nos eritrócitos maduros não parece estar diretamente relacionada com o tratamento agudo *in vivo*. Recomenda-se que, nos tratamentos agudos e sub-agudos, apenas os eritrócitos policromáticos sejam considerados. Quando o tratamento é mais prolongado, em testes sub-crônicos e crônicos, pode-se contar também a frequência de eritrócitos maduros micronucleados como indicador de toxicidade (OECD, 1997). A técnica de coloração usada na identificação do micronúcleo, assim como o treinamento dos técnicos envolvidos na leitura das lâminas, apresenta menor influência na variação da quantificação do desfecho, mas é recomendável que cada laboratório possua seu próprio histórico de registro para o tratamento e as respostas obtidas em cada teste (Fenech et al., 2003a).

É possível diferenciar os agentes clastogênicos dos aneugênicos pelo uso de técnicas histológicas mais refinadas que identificam seqüências específicas de DNA e de proteínas do centrômero dentro dos micronúcleos (Krishna & Hayashi, 2000; Norppa, 2003).



**Figura 1.** Exemplos de células micronucleadas em medula óssea. 1a: Eritrócito normocromático (maduro). 1b: Reticulócito policromático (jovem). 2: Eritrócito policromático. 3a: Micronúcleo em Eritrócito policromático. 3b: Artefacto de técnica (pigmentação fora de foco). 4: linfócito micronucleado. 5: Eritrócito Normocromático. 6: Eritrócito Policromático. 7: Linfócito Binucleado. Imagens feitas durante os experimentos.

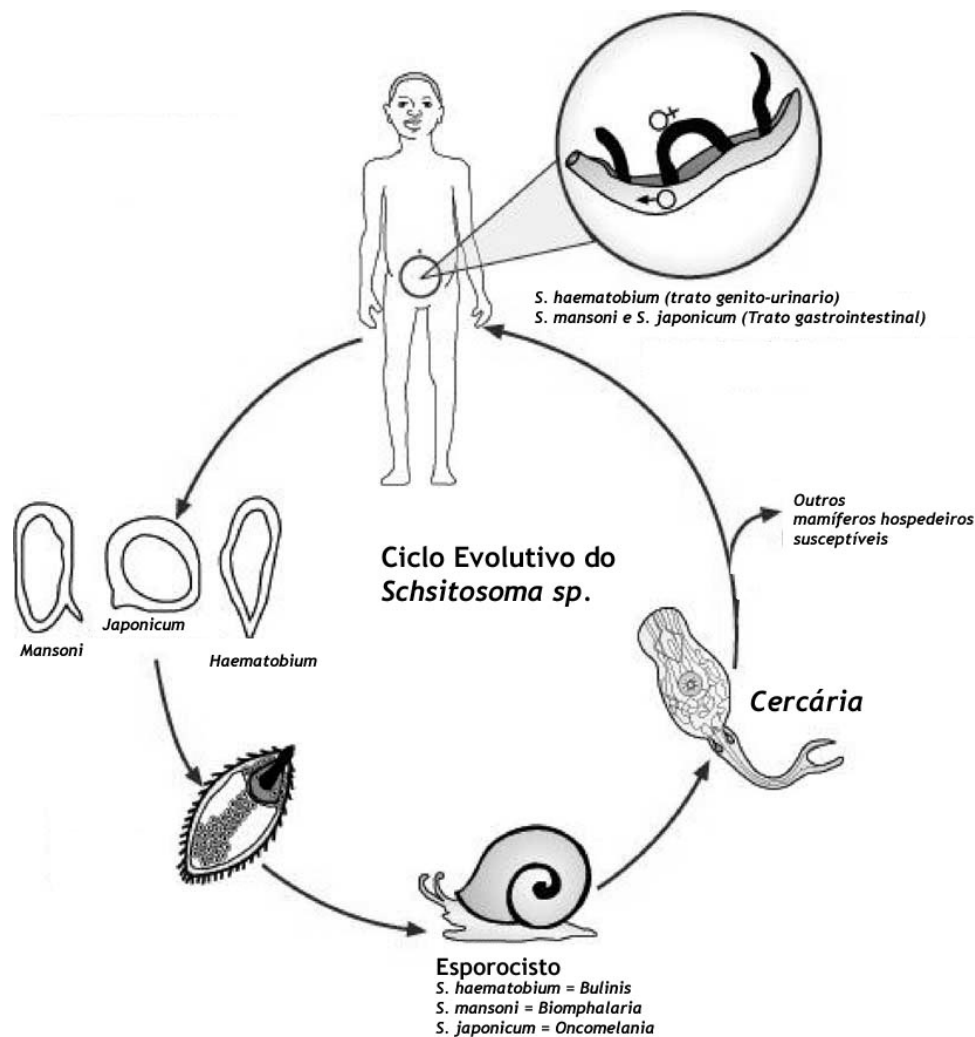
### 3. Modelo experimental Animal: A esquistossomose

#### 3.1. Biologia

A esquistossomose é uma doença parasitária que envolve três fatores: *i.* o agente etiológico que é um helminto patogênico do gênero *Schistosoma*, *ii.* algumas espécies de caramujos, que são os hospedeiros intermediários do parasita, e *iii.* o homem que é um dos hospedeiros definitivos do *Schistosoma mansoni*, do *Schistosoma japonicum* e do *Schistosoma haematobium*. Outros mamíferos, além do homem, podem ser hospedeiros definitivos no ciclo evolutivo dos *Schistosoma spp.* (Katz, 2003). O *S. japonicum*, por exemplo, tem como hospedeiros definitivos o homem, o cachorro, bovinos, búfalos e roedores (Blanchard, 2004). Suspeita-se ainda que, entre os homens, há indivíduos com diferentes susceptibilidades à infecção mansônica. Embora não sejam definitivos, alguns dados sugerem que em certos casos (44%) a diferença entre os indivíduos mais susceptíveis e os menos susceptíveis se deva a fatores genéticos aditivos, enquanto que, em um percentual menor (até 14%), essa diferença poderia ser explicada por fatores ambientais (Quinnel, 2003). Todavia, os estudos que sugerem essa tendência ainda necessitam de confirmação.

São três os principais estágios do ciclo evolutivo do trematódeo: *i.* o estágio de interação entre os hospedeiros (o homem e o caramujo), *ii.* a interação do caramujo com o miracídio, que é a forma infectante para o molusco e *iii.* interação do homem com a cercária, que é a forma infectante para o homem (Kloos, 1987). Em todos os estágios, a

água é o meio que “abriga” o subsistema de interação entre as espécies. Cada espécie de *Schistosoma* tem o seu ciclo associado preferencialmente a determinadas espécies de caramujo (figura 2).

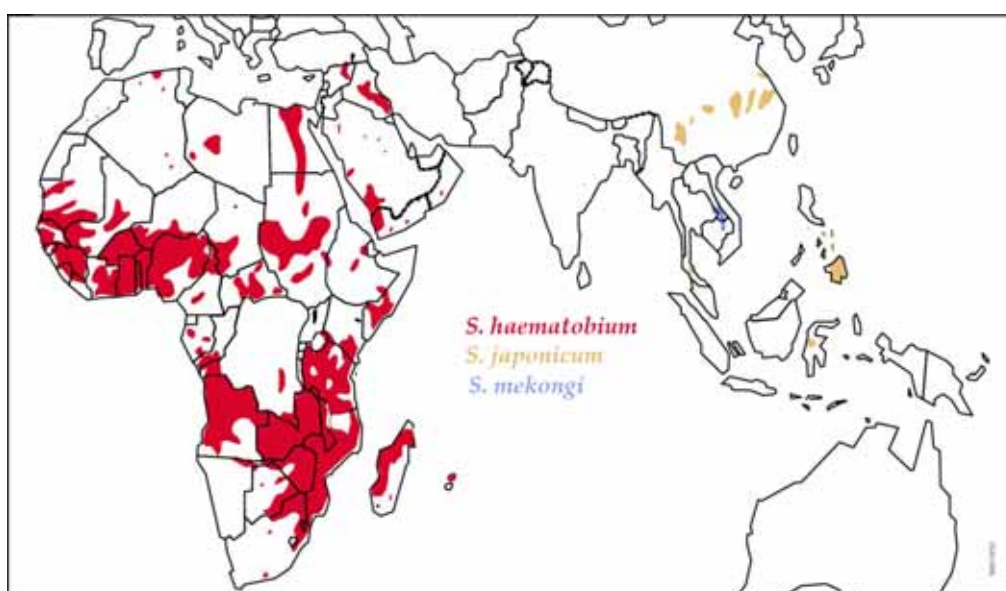


**Figura 2.** Ciclo evolutivo do *Schistosoma* spp. Fonte: Blanchard, 2004, modificado.

Cerca de 3 a 4 semanas após a infecção, o hospedeiro humano começa a liberar ovos junto com as fezes (*S. mansoni* e *S. japonicum*) ou urina (*S. haematobium*). Por essa razão e em virtude da falta de saneamento básico, as áreas endêmicas da parasitose estão normalmente associadas à pobreza. Essas áreas endêmicas para a esquistossomose estão localizadas na África sub-Saariana, na América do Sul e na Ásia (Blanchard, 2003). Os ovos do verme que são eliminados com as fezes chegam às águas onde vivem os hospedeiros intermediários e liberam os miracídios. Cerca de 95% dos ovos encontrados nas fezes são maduros e capazes de liberar o miracídio. É assim que miracídios de *S. mansoni* infectam *Biomphalaria* spp., que os miracídios de *S.*

*japonicum* infectam *Oncomelania* spp. e os miracídios de *S. haematobium* infectam *Bulinus* spp.

Uma vez que os ovos entram em contato com a água e são expostos à luz e temperaturas apropriadas, um miracídio deixa o ovo e, durante sua curta vida de 6 a 12 horas, nada até encontrar um caramujo susceptível em que possa penetrar ativamente, em geral pela antena ou pela pata (Katz, 2003; Kloos 1987). As condições ideais para o miracídio são freqüentemente encontradas em águas doces e quentes, o que explica o porquê da esquistossomose ocorrer fundamentalmente em áreas equatoriais e tropicais do globo (figuras 3 e 4).

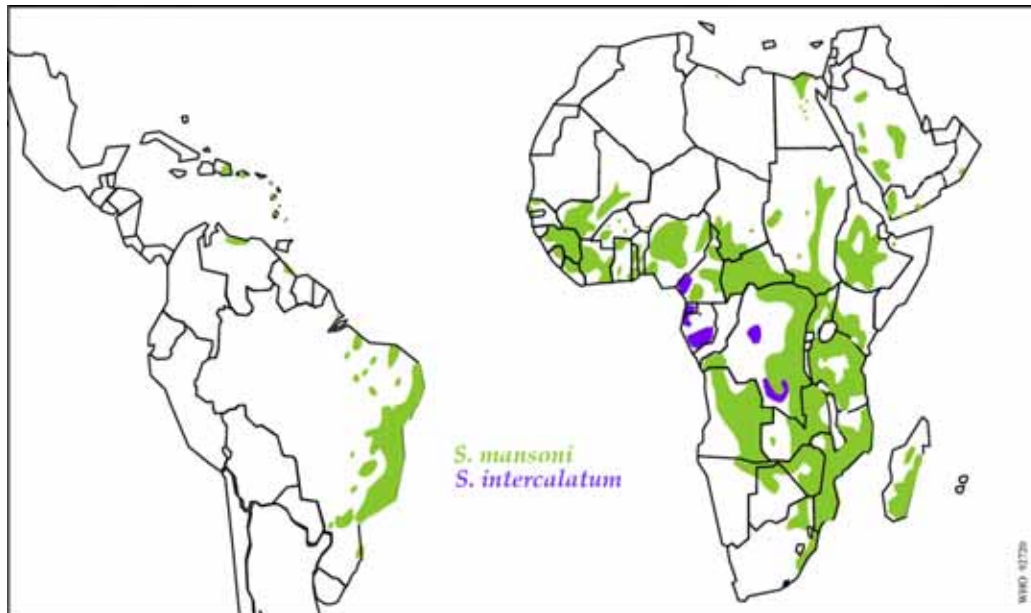


**Figura 3.** Distribuição geográfica das áreas endêmicas para esquistossomose na África e Ásia (Blanchard 2004, modificado).

No interior do molusco o miracídio muda sua forma evolutiva para esporocisto primário e depois secundário. O esporocisto é a forma que dá origem às cercárias. Um único esporocisto dá origem a inúmeras cercárias que saem do molusco e nadam por 1 a 2 dias até encontrar o hospedeiro definitivo, em que penetram ativamente pela pele, perdendo, no processo de penetração, a sua cauda bifurcada (Katz, 2003; Blanchard, 2004; Kloos 1987).

A temperatura da água é muito importante para a manutenção da infectividade da cercária. A 20°C as cercárias não possuem mobilidade suficiente para nadar até

encontrar o hospedeiro e, a 30°C esgotam rapidamente suas reservas energéticas. O número de cercárias que penetram no hospedeiro definitivo depende de vários fatores, como a resistência adquirida pelo hospedeiro às larvas e a frequência e a intensidade da exposição (Kloos, 1987).



**Figura 4.** Distribuição geográfica das áreas endêmicas para esquistossomose nas Américas e África (Blanchard 2004, modificado).

Tendo penetrado no hospedeiro definitivo, o *Schistosoma* muda novamente sua forma evolutiva para se adaptar ao novo ambiente, originando o esquistossômulo. Através da circulação o esquistossômulo migra em 30 dias até as veias mesentéricas, onde o *S. mansoni* evolui tornando-se sexualmente maduro, acasala e inicia a postura dos ovos. O ciclo se completa em cerca de 40 dias (Katz, 2003). A fêmea, com 15 a 20 mm de comprimento, é um pouco maior que o macho que mede de 10 a 15mm e possui uma fenda (canal ginecóforo) onde aloja a fêmea por toda a vida reprodutiva do casal. É dessa interação que vem o nome *Schistosoma*, que significa “corpo fendido” (Katz, 2003).

Os vermes adultos se alimentam do sangue do hospedeiro e regurgitam um pigmento chamado pigmento “esquistossomótico” após a digestão da hemoglobina (Katz, 2003). Esse pigmento pode ser encontrado no tecido hepático.

A longevidade dos vermes adultos no interior do hospedeiro definitivo chega a vários anos. O mais freqüente é que a duração da vida do verme chegue a cerca de três anos ou um pouco mais, mas há relatos em que a longevidade reprodutiva chegou a 30 anos (Kloos, 1987; Katz, 2003).

A principal postura de ovos ocorre durante o dia, quando o hospedeiro tem seu principal contato com a água e promovendo a continuidade do ciclo evolutivo do trematódeo (Kloos, 1987). O *Schistosoma* não completa seu ciclo evolutivo no hospedeiro definitivo.

### 3.2. Epidemiologia

Apesar de se conhecer bem o ciclo da esquistossomose e formas de interromper a transmissão da doença, ela ainda é um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo, infectando cerca de 200 milhões de pessoas. Estima-se que aproximadamente 650 milhões de indivíduos vivam em áreas de risco e, no mundo, há o registro de cerca de 14.000 mortes ao ano devido à doença (WHO, 2001; Chitsulo et al., 2000). As principais áreas de preocupação em relação a esta parasitose são as regiões menos desenvolvidas do globo (Petney, 2001), onde predominam hábitos pouco higiênicos que facilitam a infecção. Como ocorre com outras endemias, as crianças são particularmente vulneráveis à doença.

A doença é endêmica em mais de 74 países e territórios. No caso da doença causada pelo *S. mansoni*, 54 países são atingidos, incluindo o Brasil, enquanto no caso do *S. haematobium* são 53 os países, e no caso do *S. intercalatum* são 10 os países onde há registro da endemia. A doença causada pelo *S. japonicum* é importante em 4 países asiáticos, e o *S. mekongi* está presente endemicamente em 2 países. Há ainda o *S. malayensis* que foi registrado na Malásia (Chitsulo et al., 2000).

Desses trematódeos, são cinco as espécies de maior importância em termos de doença humana o *S. mansoni*, o *S. haematobium*, o *S. japonicum*, o *S. intercalatum* e o *S. mekongi*. Os três primeiros são os de maior relevância epidemiológica, apresentando uma distribuição geográfica que abrange América do Sul, Caribe, África, Oriente Médio e Ásia (Bergquist, 2002; King & Mahmud, 2001). As espécies do gênero *Schistosoma* diferenciam-se morfológicamente pelas formas dos vermes adultos e pelos seus ovos.



Durante a década de 1990 registrou-se um aumento de população em áreas endêmicas e, também, o aparecimento de novas áreas endêmicas para determinadas espécies de *Schistosoma spp.* Exemplo nesse sentido é o aparecimento de esquistossomose urinária causada por *S. haematobium* em regiões onde antes não havia o parasita (Chitsulo et al., 2000).

No Brasil, estima-se que 32 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas e 7 milhões estejam infectadas (WHO, 2001; Chitsulo, 2000). Originária da África, a hipótese mais provável para o surgimento da esquistossomose no Brasil é que o parasita tenha chegado ao país com os escravos, a partir do séc. XVII, e que eles estivessem infectados tanto com *S. mansoni* como com *S. haematobium*, mas somente o *S. mansoni* encontrou hospedeiro intermediário (*Biomphalaria spp.*) capaz de dar continuidade ao seu ciclo de vida (Katz, 2003). São três as espécies de caramujos que são encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni* no Brasil: a *B. glabrata*, a *B. tenogaphila* e a *B. straminea*. Dentre essas, a *B. glabrata* é a de maior importância epidemiológica, pois tem a mais ampla distribuição no território brasileiro e é a espécie mais susceptível à infecção mansônica (Katz, 2003).

Os principais fatores que favorecem a disseminação da esquistossomose são as migrações, o represamento de grandes volumes de água, e a falta de saneamento básico e educação sanitária (Kloos, 1987; Katz, 2003). Movimentos populacionais no Brasil, com destaque para a migração em direção ao sul, propiciaram o aparecimento da esquistossomose em regiões onde antes não havia a doença (Chitsulo et al., 2000).

As crianças e os adolescentes são os grupos etários mais afetados, pois a infecção tem estreita relação não apenas com medidas sanitárias, mas também com hábitos pessoais de higiene. As infecções mais precoces têm sido observadas por volta dos cinco anos de idade sendo mais frequentes entre os 10 e os 14 anos e entre os 15 e os 19 anos de idade. As crianças não desenvolvem imunidade concomitante à infecção, e são também mais susceptíveis à reinfecção, tanto por conta de seus hábitos quanto pelo não desenvolvimento de imunidade (Katz, 2003). Entre os prováveis fatores promotores dessa característica está a nutrição desequilibrada, normalmente associada com maior susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias (Petney, 2001).

Entre os mais velhos a prevalência é menor e não existe diferença de susceptibilidade entre os sexos. Indivíduos que não desenvolvem a forma grave da

doença até os 25 anos parecem não mais apresentar agravamento de seus estados, mesmo morando em áreas endêmicas (Katz, 2003).

Áreas urbanas que apresentam condições apropriadas para a instalação e disseminação da doença levam também à sua urbanização (Katz, 2003). Periferias e áreas das grandes cidades desprovidas de urbanização planejada se tornam locais que favorecem a instalação da parasitose.

O programa nacional de controle, implementado na década de 1970, foi pioneiro em termos mundiais (Chitsulo et al., 2000) e alcançou resultados promissores quanto à redução da prevalência e mortalidade. Programas que objetivam o controle de doenças parasitárias geralmente têm como uma de suas principais ações a intervenção farmacológica nos indivíduos e populações já infectadas. (Bergquist, 2002). A intervenção farmacológica auxiliou na diminuição das taxas de prevalência da doença em áreas endêmicas e essa diminuição implica também uma redução da prevalência da forma grave da doença (Hagan et al., 1998).

Um diagnóstico mais preciso da doença poderia ser obtido com a implementação de uma combinação de testes sorológicos e da pesquisa de ovos nas fezes e, no caso do *S.hematobium*, na urina (Hagan et al., 1998; Blanchard, 2004). Entretanto, essa combinação não parece ser viável em larga escala. Mais útil tem se mostrado a pesquisa clínica clássica em fezes e urina (Blanchard, 2004; Katz 2003).

### **3.3. Fisiopatologia e manifestações clínicas**

Nem sempre existe uma manifestação clínica clara da doença e, quando ela se manifesta, podem aparecer vários quadros clínicos com diferentes intensidades. A infecção pode acompanhar o doente por toda a vida sem manifestar-se por sinais clínicos claros. Na fase inicial da infecção, a esquistossomose mansônica não se mostra (é inaparente) ou pode apresentar uma forma aguda intestinal ou hepatointestinal (desde leve a grave ou toxêmica). Na fase crônica surgem as formas mais graves da doença, como as formas hepatoesplênica e vasculopulmonar (Katz, 2003).

Pacientes com infecção grave por *S. haematobium*, por exemplo, podem apresentar hematúria e disúria, sendo o quadro clássico a manifestação de hematúria ao

fim do ato de urinar. A próstata também é afetada e pode haver hematoespermia (Blanchard, 2004). Entre os sinais clássicos da infecção por *S. mansoni* e por *S. japonicum* estão diarreia com sangue e hipertensão portal nas infecções crônicas (Blanchard, 2004). Uma rara, mas possível complicação da esquistossomose mansônica é a neuroesquistossomose que ocorre quando ovos do parasita chegam ao encéfalo do hospedeiro (Silva et al., 2002).

A parasitose promove respostas diversas do hospedeiro e são essas respostas que vão caracterizar o quadro patológico e a sintomatologia (Katz, 2003). Ao entrarem no organismo, através da pele, as cercárias podem produzir dermatite local. Fatores como a carga parasitária durante a exposição/infecção, a espécie e linhagem do parasita e a idade, etnia, estados nutricionais e imunológicos do hospedeiro são importantes na determinação da evolução do quadro da doença. Os vermes adultos e as formas larvárias dispõem de diversos mecanismos para escapar das defesas do hospedeiro. Assim sendo, o ovo é o principal agente promotor das alterações mais características da patogenia (Katz, 2003; Coutinho et al., 2003) seja simplesmente por ser um agente estranho ao organismo do hospedeiro, seja pelo volume da ovoposição (cerca de 300 ovos por fêmea por dia). São, portanto, as reações inflamatórias crônicas em resposta à presença do ovo que promoverão o aparecimento dos granulomas e os principais quadros associados ao agravamento da doença.

Na fase aguda, em cerca de 30% dos ovos depositados nos tecidos, os complexos antígeno-anticorpo resultantes desencadeiam reações alérgicas podendo aparecer edemas migratórios, febre e urticárias (Katz, 2003). Os outros ovos caem na circulação sanguínea e vão se depositar no parênquima hepático, pulmões, medula óssea, rins, baço, coração, testículos e outros órgãos. São esses ovos seqüestrados nos tecidos que irão dar origem aos granulomas.

Em sua fase inicial, o granuloma é uma zona de necrose causada pelo ovo, para onde migram neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Num momento mais tardio se inicia a produção de colágeno que evolui para formar uma cicatriz (Katz, 2003). Essa evolução é semelhante, de um modo geral, nos tecidos dos mamíferos (hospedeiros definitivos) infectados (Lenzi et al., 2002; Coutinho et al., 2003).

A forma clínica mais grave da esquistossomose mansônica é a forma hepatoesplênica, caracterizada morfológicamente pela fibrose de Symmers (da Silva &

Carrilho, 1992; Andrade et al., 1997; Lambertucci, 2004; Silva-Teixeira, 2004) provocada pela grande quantidade de granulomas no tecido hepático resultante de longos períodos de ovoposição. A esquistossomose hepatoesplênica geralmente ocorre nos grupos etários entre 6 e 20 anos de idade, ou nos indivíduos que convivem com a infecção de forma crônica por 5 a 15 anos (da Silva & Carrilho, 1992). As regiões que fibrosam em torno dos ovos depositados podem comprometer a passagem de sangue nos espaços portais e, conseqüentemente, aumentam a pressão nesse local. A prevalência dessa forma da doença pode chegar a 12% em áreas onde a prevalência de esquistossomose varia entre 40% e 100% (Katz, 2003). A forma hepatoesplênica é também a principal causa de óbitos entre os infectados por *S. mansoni*. Pacientes jovens infectados com uma elevada carga parasitária podem também apresentar uma fase “não-congestiva”, com esplenomegalia, mas sem sinais de hipertensão portal. Com tratamento quimioterápico adequado, o baço regride até se tornar novamente impalpável (da Silva & Carrilho, 1992).

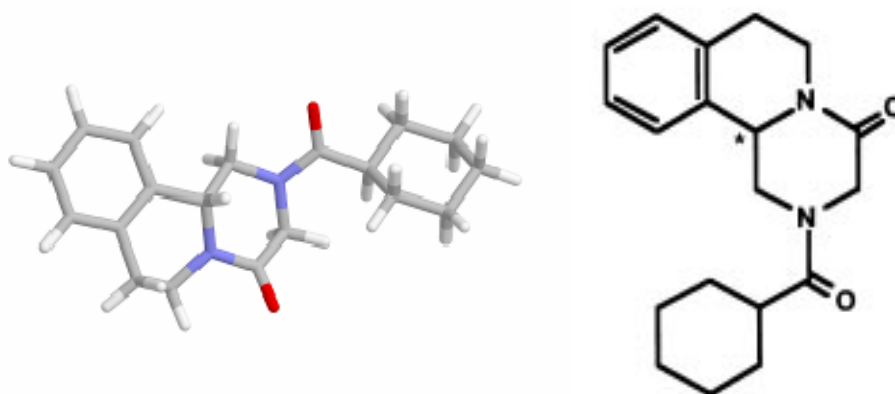
### 3.4. Tratamento

Apesar do esforço mundial para combater a doença, a esquistossomose não teve a sua prevalência global diminuída. Com o passar do tempo, a distribuição geográfica das áreas endêmicas mudou ligeiramente, mas a prevalência global não foi reduzida (Kloos, 1987; WHO 2001) e as áreas de maior incidência continuam sendo aquelas com problemas de saneamento e controle de qualidade da água, *i.e.* aquelas áreas menos desenvolvidas. O mesmo comportamento geográfico da doença tem sido observado no Brasil (Ximenes et al., 2003).

Um dos principais avanços no controle da esquistossomose foi a descoberta da atividade antiparasitária do praziquantel, na década de 1970, nos laboratórios da Bayer<sup>®</sup>, durante pesquisas sobre tranqüilizantes sintetizados por outra empresa, a Merck<sup>®</sup>. A fabricação do praziquantel, com custos relativamente baixos, teve início na década de 1980 e a produção do fármaco, por uma empresa coreana e outra egípcia, possibilitou sua adoção como tratamento de primeira escolha em todo o mundo (Cioli & Picca-Mattocchia, 2003).

O praziquantel (Figura 5) tem sua atividade antihelmíntica associada ao anel pirazino-isoquinolínico e possui duas estruturas quirais com equivalentes toxicidades,

embora diferentes seletividades para vias metabólicas distintas (Cioli & Picca-Mattocchia, 2003). Apenas o enantiômero *levo* é provido de atividade antiparasitária para os trematódeos (Xiao et al., 1998; Cioli & Picca-Mattocchia, 2003). Comercialmente está presente como mistura racêmica e é administrado por via oral em doses que variam entre 40 e 60mg/kg de massa corpórea (Cioli & Picca-Mattocchia, 2003). O praziquantel é rapidamente absorvido por via oral, atingindo seu pico plasmático entre 1h e 2h após a administração. Apresenta efeito de primeira passagem hepática, sendo metabolizado principalmente pelas subfamílias 2B e 3A do citocromo P450. A meia-vida do praziquantel é de cerca de 3h. Em 24h, 80% do praziquantel administrado é eliminado pelas fezes e urina (Cioli & Picca-Mattocchia, 2003). Sua ação é rápida e reversível. Ele altera a fisiologia dos canais de cálcio do verme, provocando paralisia espástica e sua imobilização (Katz, 2003; Hardman & Limbrid, 1996). Em concentrações terapêuticas, o praziquantel ainda é capaz de promover danos tegumentares, levando o verme à morte (Hardman & Limbrid, 1996).



**Figura 5.** Estruturas tridimensional (R) e plana (Cioli, 2003) do Praziquantel. O asterisco na estrutura plana mostra o carbono quiral da molécula. Apenas a forma *levógira* é provida de atividade farmacológica. O medicamento é comercializado como racemato (Andrews, 1985; Xiao 1998). A estrutura tridimensional é apenas ilustrativa, não foi minimizada.

A toxicidade do praziquantel para o hospedeiro é baixa, sendo os principais efeitos adversos as náuseas, a cefaléia e as tonteadas (Katz,2003). Vários estudos de mutagenicidade têm sugerido que o praziquantel é desprovido dessa atividade, mas há estudos conflitantes em relação à sua atividade clastogênica (Anwar, 1994; Montero & Ostrosky, 1997; Cioli & Picca-Mattocchia, 2003).

A principal alternativa farmacológica ao praziquantel é a oxamniquina, derivada 2-aminometil-tetraidroquinolínico, com semelhante eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica, mas não no caso das infecções por *S. japonicum* ou *S. haematobium* (da Silva & Carrilho, 1992; Hardman & Limbrid, 1996; Katz, 2003). Entretanto, além dos mesmos efeitos adversos causados pelo praziquantel, a oxamniquina apresenta, com baixa frequência, efeitos neurotóxicos associados a quadros convulsivos (da Silva & Carrilho, 1992; Hardman & Limbrid, 1996; Katz, 2003). A dose recomendada de oxamniquina é de 15mg/kg de massa corpórea, em dose única. A oxamniquina também é bem absorvida por administração oral e seu pico plasmático ( $C_{max}$ ) ocorre entre 0,5 h e 3h após a ingestão. Cerca de 70% da dose administrada é eliminada na urina como uma mistura de metabólitos farmacologicamente ativos (Hardman & Limbrid, 1996). Na África, a oxamniquina é, por vezes, co-administrada com o metrifonato para tratar as co-infecções por *S. haematobium* e *S. mansoni*.

O metrifonato é a terceira e menos usual opção ao tratamento da esquistossomose. É um organofosforado e, como tal, é inibidor das colinesterases, e sofre intensa metabolização no organismo. A dose recomendada é de 7,5mg a 10mg/kg de massa corpórea, três vezes com intervalo de duas semanas, e sua meia-vida é de cerca de 1,5 hora. Apesar de o metrifonato apresentar atividade *in vitro* contra *S. mansoni* (Hardman & Limbrid, 1996), *in vivo* ele apresenta ação apenas contra o *S. haematobium*.

Em 1991, a Comissão Internacional para a Proteção contra Mutágenos e Carcinógenos Ambientais (ICPEMC na sigla em inglês) promoveu uma ampla revisão sobre o potencial genotóxico de compostos usados no tratamento da esquistossomose (Kramers et al., 1991). Atualmente, os principais trabalhos publicados sobre o assunto têm dado especial atenção ao praziquantel, o medicamento mais usado no combate à esquistossomose, ainda que haja suspeitas sobre o desenvolvimento de resistência por parte do trematódeo (WHO, 2001).

Rosin e colaboradores (1994) observaram que o tratamento com praziquantel diminui a frequência de micronúcleos no animal infectado por *Schistosoma mansoni*, ao mesmo tempo que diminui também a contagem dos ovos.

Sucessivas reinfecções, entretanto, têm sugerido que a susceptibilidade ao tratamento com praziquantel tem diminuído nas áreas endêmicas, ainda que sinais de desenvolvimento de resistência não estejam claros (Capron, 1998). Outro inconveniente do praziquantel é que o fármaco atua somente sobre os vermes adultos, sendo necessário repetir o tratamento se houver histórico de exposição recente ou risco de infecção (Blanchard, 2004). Resistência inata ao tratamento é uma ocorrência rara e tem-se conseguido estudar melhor esse aspecto através de reinfecções em modelos experimentais (Hagan et al., 1998; Silva et al., 2003; Cioli et al., 2004). Mesmo nesses raros casos, a cura pode ser alcançada com a manutenção do tratamento por mais tempo (Blanchard, 2004). Por haver sido documentada resistência inata ao tratamento, ainda que rara, torna-se necessário um melhor monitoramento e ajustes no tratamento da esquistossomose (Cioli et al., 2004).

Vacinas contra a esquistossomose têm sido desenvolvidas há algum tempo, num esforço mundial na busca de uma alternativa ao tratamento quimioterápico. Entretanto, por mais promissoras que pareçam as vacinas candidatas, elas ainda não ultrapassaram a longa fase de testes clínicos e não-clínicos (Bergquist, 1998, Hagan et al., 1998, Bergquist, 2002).

#### **4. Esquistossomose crônica**

A infecção crônica, assim como outros estados fisiológicos alterados, implicam mudanças profundas no metabolismo dos organismos hospedeiros, constatadas seja em modelos experimentais *in vivo*, ou até mesmo *ex vivo* em órgãos isolados (Domingo et al., 1967; Tekwani et al., 1988; Coombs et al., 1990; Morgan, 1993; Thompson & Kavaliers, 1994; Morgan, 1997; Morel & Barouki, 1998; Sheweita et al., 1998; Iber et al., 1999; Masumiet al., 1999; Morgan, 2001; Renton, 2001; Sheweita et al., 2001; Morgan et al., 2002; Sheweita et al., 2002; Sheweita et al., 2004). Essas mudanças podem, por vezes, levar a outras conseqüências adversas. Em parte, essas conseqüências adversas dizem respeito a patologias associadas ao tipo de lesão tecidual presente e restritas ao local do organismo onde se encontram, ao órgão ou até mesmo parte dele (Domingo et al., 1967).

Embora não conclusivos, os estudos em modelo animal demonstraram que a infecção por *S. japonicum* pode acelerar o desenvolvimento do câncer (Ishii et al., 1994). Estudos epidemiológicos destacam a possibilidade da infecção por *S. japonicum* ser um fator de risco para o câncer de colo do reto. A infecção por *S. mansoni* afeta também o fígado e é capaz de modificar o perfil de atividade das enzimas responsáveis pela biotransformação de xenobióticos no organismo hospedeiro. De acordo com Sheweita e colaboradores (1998), aos 33 dias de infecção com *S. mansoni*, estão aumentadas as atividades da hidroxilase de hidrocarbonetos Arílicos, NADPH-citocromo redutase, glutathione S-transferase e, também, o conteúdo total de citocromo P450, de glutathione e do citocromo b<sub>5</sub>. A exceção a este quadro de aumento de atividade e conteúdo de enzimas é a diminuição da atividade da glutathione S-transferase notada nos níveis mais elevados de infecção (>300 cercárias/animal). Os autores não observaram alteração da atividade da glutathione redutase. Posteriormente, Sheweita e colaboradores (2002) relataram que camundongos BK-TO infectados com *S. mansoni* têm as atividades de alcóxi-resorufina *O*-desalquilases associadas aos CYP1A1/2 sensivelmente diminuídas. Esses autores notaram ainda que, com o prolongamento da infecção, essa redução de atividade se acentua. Essa depressão é acompanhada de uma diminuição na expressão das apoproteínas dos CYP1A1/2. Esses dados, contudo, não são consistentes com a extensão da formação *in vitro* de aductos benzopireno-DNA, que apresenta uma acentuada elevação aos 15 dias de infecção (+161%), seguida de uma pronunciada queda aos 45 dias de infecção (-72%).

A infecção humana por *S. haematobium* é mais bem documentada. Amostras de tecidos de bexiga com neoplasia (carcinoma celular escamoso, Graus III e IV) de pacientes infectados com o trematódeo exibem diferenças bioquímicas em comparação com amostras de tecido obtidas de pacientes com mesma condição oncológica, mas isentos da infecção. Tecidos neoplásicos isentos da infecção apresentaram diminuição da atividade da Hidroxilase de Hidrocarbonetos Arílicos (AHH), em relação ao tecido controle, sem alteração do conteúdo de radicais livres no teste TBARS. Os tecidos neoplásicos associados à infecção, por outro lado, apresentaram atividade aumentada da Hidroxilase de Hidrocarbonetos Arílicos (AHH), em relação ao controle, com aumento do conteúdo de radicais livres no teste TBARS. Outra diferença entre os dois tecidos neoplásicos foi que o tecido isento da infecção exibiu a metade do conteúdo de citocromo b<sub>5</sub> do tecido controle, enquanto o tecido neoplásico com infecção não diferiu em relação ao controle quanto ao conteúdo total de citocromo b<sub>5</sub> (Sheweita et al., 2004).



Em estudo anterior, comparando tecidos controle com infectados sem desenvolvimento de carcinoma, Sheweita e colaboradores (2001) haviam verificado que o tecido infectado exibia aumento dos conteúdos de citocromo P450, citocromo b<sub>5</sub> e das atividades da AHH, bem como das atividades de monooxigenases relacionadas ao CYP1A1/2, CYP2B1/2 e CYP2E1 e do conteúdo de radicais livres no teste TBARS.

Os danos genéticos no tecido da bexiga provocados pela infecção por *S. haematobium* foram avaliados pela frequência de células esfoliadas micronucleadas (Rosin & Anwar, 1992) e pela presença de aberrações cromossômicas detectadas pelo teste de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (Aly, 1999). A frequência de células micronucleadas aumentou no grupo infectado, mas a formação de micronúcleo foi sensível ao tratamento com praziquantel, tendo diminuído a frequência das células micronucleadas depois que o paciente foi tratado (Rosin et al., 1994). As aberrações cromossômicas mais frequentes nos pacientes com esquistossomose urinária foram anomalias numéricas do cromossomo 9 em pessoas abaixo dos 60 anos de idade, com Tumores Graus I e II (Sayed, 1999).

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, na sigla do inglês *International Agency for Research on Cancer*) fez uma revisão sobre a classificação das esquistossomoses quanto à sua associação com o desenvolvimento de neoplasias. A conclusão do IARC foi que já existem evidências suficientes pra considerar *S. haematobium* como membro do Grupo 1. Isso significa que existem evidências suficientes comprovando que a infecção por este trematódeo é carcinogênica em humanos. Quanto ao *S. japonicum*, o resultado não é conclusivo. Os estudos epidemiológicos não dissociaram adequadamente fatores de confundimento, como idade e sexo, ou ainda, os dados existentes dizem respeito a estudos em que não há um paralelismo adequado entre os grupos infectados e grupos controle. Portanto, a esquistossomose japônica é classificada pelo IARC como pertencente ao Grupo 2b (possível carcinógeno humano). Isso significa que as evidências disponíveis, tanto de estudos epidemiológicos quanto de investigações em modelos animais, são insuficientes para a classificação definitiva da infecção por este agente como carcinogênica para o homem. Em relação à esquistossomose mansônica, o IARC considera que não há dados adequados para sua classificação quanto ao potencial carcinogênico para humanos e, por isso, ela foi enquadrada no Grupo 3 (IARC, 1994).

A relação bem estabelecida entre a infecção por *S. haematobium* e o câncer de bexiga urinária não exclui, entretanto, a possibilidade de associações com o desenvolvimento de patologias em outros tecidos do organismo do hospedeiro (Herrera, 2001). A principal preocupação parece ser ainda os riscos de mutagenicidade e carcinogenicidade decorrentes de prolongados períodos de infecção e da conseqüente inflamação crônica (Herrera & Ostrosky-Wegman, 2001; Fitzpatrick 2001; Phillip et al., 2004). Herrera e colaboradores (2000) identificaram, em sangue periférico de pacientes com neurocisticercose, um aumento da freqüência de aberrações cromossômicas, bem como uma elevação da freqüência de células binucleadas com micronúcleos. Após o tratamento dos pacientes com praziquantel, os autores observaram uma regressão na freqüência desses desfechos que alcançaram níveis comparáveis com os registrados nos indivíduos controle.

#### **4.1. Modulação do metabolismo de xenobióticos pela infecção**

A alteração da farmacocinética ou toxicocinética de xenobióticos tem sido constatada em patologias e em estados fisiológicos específicos (Tekwani et al., 1988, Morel & Barouki, 1998). Pacientes com malária apresentam uma eliminação mais lenta da quinina do que indivíduos saudáveis e, nesse caso, isso é vantajoso para a terapia, pois além de prolongar a meia-vida, aumenta também a concentração plasmática máxima ( $C^{max}$ ) da droga (Tekwani et al., 1988).

As implicações clínicas das alterações das atividades enzimáticas de citocromos P450 não se restringem ao metabolismo de xenobióticos, mas dizem respeito também à biossíntese de substâncias endógenas, como mediadores de inflamação e hormônios (Morgan, 1997).

Os modelos animais são importantes para investigar as alterações de sistemas enzimáticos durante a infecção. Camundongos Balb/c infectados com *Leishmania donovani*, que desenvolvem a forma visceral da infecção, apresentam seu perfil enzimático modificado, tanto em termos dos níveis de apoproteína sintetizada quanto em relação à atividade dessas enzimas de biotransformação (Coombs et al., 1990). A redução do conteúdo total de citocromo P450 nos microsossomos hepáticos foi de aproximadamente 38% e a do conteúdo do citocromo b<sub>5</sub> foi de aproximadamente 31%. A diminuição da NADPH-citocromo P450 redutase foi de 30%, enquanto quase não

houve modificação da NADPH-citocromo b<sub>5</sub> redutase. As atividades microsossomais da aminopirina desmetilase, da anilina hidroxilase, da benzfetamina desmetilase, da etoxicumarina desetilase e da nitrosodimetilamina desmetilase, nos animais infectados, foram reduzidas à metade daquelas registradas nos animais controle. As atividades relacionadas à hidroxilação do DMBA também foram diminuídas nos animais infectados (Coombs et al., 1990). Camundongos infectados com citomegalovírus tiveram sua capacidade de depuração de barbituratos diminuída, o que prolongou o tempo de sono causado pelo pentobarbital (Renton, 2001). Uma análise dos estudos disponíveis na literatura sugere que não só infecções localizadas em determinado tecido podem modular a atividade de enzimas citocromo P450 presentes no próprio órgão afetado (*e.g.* o fígado) mas também que esta modulação pode ocorrer no caso de infecções em que o quadro é predominantemente sistêmico (Morgan, 1997; Morgan, 2001; Morgan et al., 2002; Renton, 2001). Os mecanismos subjacentes a essa resposta metabólica do hospedeiro ainda são pouco claros. Outra área ainda pouco explorada envolve as alterações causadas por infecções na atividade de enzimas citocromo P450 localizadas em tecidos extra-hepáticos.

#### **4.2. Modulação do metabolismo de xenobióticos pela inflamação**

Os mecanismos pelos quais processos infecciosos eventualmente facilitam o desenvolvimento de tumores (Fitzpatrick, 2001) e alteram a biotransformação de xenobióticos parecem envolver, até certo ponto, os próprios mecanismos de defesa do hospedeiro, como a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas pelas próprias células do hospedeiro (Morgan, 1997, Renton, 2001). A célula, por outro lado, dispõe de mecanismos para proteger-se dos efeitos de radicais livres, tais como eliminá-los ou reduzi-los a níveis muito baixos. Entretanto, a infecção pode tornar-se crônica e isso pode saturar a capacidade depurante do sistema enzimático de desintoxicação (Fitzpatrick, 2001). Morel e Barouki (1998) demonstraram que o estresse oxidativo promovido pelo peróxido de hidrogênio ou pela depleção da glutathiona por L-butionina-(S,R)-sulfoximina modula negativamente a expressão do gene *CYP1A1* através de mecanismo envolvendo o fator nuclear de transcrição 1 (NFI). Em modelos animais como o da inflamação induzida por LPS (da sigla em inglês LipoPoliSaccaride, Lipo Poli Sacarídio extraído da parede celular de bactérias) em ratos

Sprague-Dawley, as atividades de CYP2C6/7/12 e CYP2E1 foram reduzidas drasticamente (Morgan, 1993).

O interferon (IFN) tem sido relacionado à modulação da atividade de diversas isoformas do citocromo P450: CYP1A2/3A2, CYP2B1, CYP2C6/11/12, CYP4A1, CYP26C, embora se tenha tido respostas diferentes em organismos diferentes. O Fator de Necrose Tumoral (TNF, da sigla em inglês *Tumor Necrosis Factor*) e Interleucinas (IL) recombinantes se mostraram também capazes de inibir a expressão de CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C12 e CYP3A3 (Renton, 2001).

### **4.3. Mecanismo molecular**

Não parece haver um único mecanismo para a modulação das atividades do sistema do citocromo P450 durante a infecção e a inflamação. Entretanto, o mecanismo mais freqüente parece envolver alterações da síntese *de novo* das enzimas moduladas e a mudança nos níveis de RNAm e da apoproteína (Morgan, 1997).

Ratos machos tratados com LPS e turpentina tiveram os níveis de RNAm para o CYP2C11 diminuídos, indicando que possivelmente a modulação do CYP2C11 se faz através da regulação da sua transcrição. Ratas tratadas com turpentina também tiveram o conteúdo de RNAm para CYP2C12 algo diminuído, mas o conteúdo da apoproteína CYP2C12 sofreu redução bem mais expressiva, o que seria indicativo de que a modulação se deu em algum momento pós-transcricional (Morgan, 1997).

Outros possíveis mecanismos envolvem a renovação do RNA, a síntese protéica, a inibição enzimática que pode ser conseqüência da ação do óxido nítrico (NO), estresse oxidativo, ação da xantina oxidase e PPAR $\alpha$  (Morgan, 1997, Morgan, 2001, Renton, 2001, Morgan et al., 2002).

## OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo principal investigar como a infecção experimental com *Schistosoma mansoni* interfere com a ação clastogênica da ciclofosfamida (CLF) e do DMBA.

Os objetivos específicos foram:

- a) verificar se a infecção (*per se*) por *S. mansoni* causa danos ao material genético, determinados pela frequência de células micronucleadas na medula óssea de camundongos *Swiss Webster*, na fase intermediária de evolução da doença (55 dias pós-infecção com 100 cercárias).
- b) verificar se ocorre alteração do aumento da frequência de micronúcleos em células da medula óssea de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, causado pela administração dos promutágenos CLF, ativado por CYP2B e DMBA, ativado por CYP1A1, na fase intermediária de evolução da infecção por *S. mansoni* (55 dias pós-infecção com 100 cercárias);
- c) verificar se há alteração da mielotoxicidade da CLF e DMBA, avaliada pela frequência de eritrócitos policromáticos, na fase intermediária de evolução da infecção por *S. mansoni* (55 dias pós-infecção com 100 cercárias);

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 5. Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos suíços (*Swiss Webster*) provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. O projeto de pesquisa relativo a este estudo (processo no 114-02) foi previamente submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ e todos os procedimentos que envolveram a manipulação animal foram realizados com base na legislação brasileira e princípios éticos internacionalmente aceitos.

Os animais chegaram ao laboratório com seis semanas de vida e foram mantidos em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) e “cama” de maravalha de pinho branco. Água potável e ração para camundongos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) foram fornecidos *ad libitum*. A temperatura do biotério de experimentação foi mantida constante ( $23 \pm 2$  °C) assim como a umidade relativa do ar (em torno de 70 %) e o ciclo claro-escuro de 12h (período claro de 7:00h às 19:00h). As trocas das “camas” de maravalha ocorreram três vezes por semana, sempre pela manhã.

Após serem recebidos, fêmeas e machos foram alojados em gaiolas distintas por uma semana para aclimação; os machos individualmente e as fêmeas em grupos de 4 animais por gaiola. Depois desse período, cada macho recebeu em sua gaiola duas fêmeas para o acasalamento sendo a co-habitação mantida até o 18º dia, quando as fêmeas grávidas foram transferidas para uma gaiola individual. A partir desse dia, as fêmeas foram monitoradas diariamente para o registro do dia do nascimento dos filhotes.

No 10º dia após o nascimento, os filhotes foram identificados, numerados e destinados, ao acaso, ao grupo controle não infectado ou ao grupo infectado com cercárias de *S. mansoni*. No 21º dia de vida, cada filhote foi retirado da gaiola de sua mãe (desmame), separado por sexo (sexagem) e acondicionado em grupos de quatro animais por gaiola, respeitados os grupos experimentais a que pertenciam.

## 6. Grupos experimentais

Os camundongos foram, aleatoriamente, incluídos em um dos oito grupos experimentais:

a) Grupo I: (controle não-tratado/não-infectado) Esses animais não receberam qualquer tipo de tratamento com clastógeno ou infecção.

b) Grupo II: (controle não-tratado/infectado) Esses animais não receberam qualquer tipo de tratamento com clastógeno, mas foram infectados com cercárias de *S. mansoni*.

c) Grupo III: (controle salina/não-infectado) Esses animais receberam salina (veículo de administração da ciclofosfamida) como tratamento, e não foram infectados.

d) Grupo IV: (controle óleo de milho/não-infectado) Esses animais receberam óleo de milho Mazola® (veículo de administração de DMBA) como tratamento, e não foram infectados.

e) Grupo V: (Ciclofosfamida/não-infectado) Esses animais receberam ciclofosfamida (Fosfaseron ®; Ítaca Laboratórios, Rio de Janeiro; CAS nº6055-19-2) como tratamento, e não foram infectados.

f) Grupo VI: (Ciclofosfamida/infectado) Esses animais receberam ciclofosfamida (Fosfaseron ®; Ítaca Laboratórios, Rio de Janeiro; CAS nº6055-19-2) como tratamento, e foram infectados com cercárias de *S. mansoni*.

g) Grupo VII: (DMBA/não-infectado) Esses animais receberam 7,12-dimetil-benzantraceno (DMBA, Sigma Aldrich®, CAS nº57-97-6) como tratamento, e não foram infectados.

h) Grupo VIII: (DMBA/infectado) Esses animais receberam 7,12-dimetil-benzantraceno (DMBA, Sigma Aldrich®, CAS nº57-97-6) como tratamento, e foram infectados com cercárias de *S. mansoni*.

**Quadro 2.** Tratamento recebido pelos grupos experimentais.

Grupo (n)	Tratamento				
	<i>S. mansoni</i>	Salina	Óleo de milho	Ciclofosfamida	DMBA
<b>I</b> (35)					
<b>II</b> (30)					
<b>III</b> (12)					
<b>IV</b> (22)					
<b>V</b> (25)					
<b>VI</b> (23)					
<b>VII</b> (19)					
<b>VIII</b> (18)					

Todos os tratamentos com os agentes clastogênicos foram realizados com seringas hipodérmicas descartáveis, sendo utilizado um conjunto de seringa e agulha (Saldanha Rodrigues®) para cada animal.

## 7. Trematódeos e Infecção

As cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa BH, Brasil) foram fornecidas pelo Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) na FIOCRUZ onde o ciclo do trematódeo é mantido em caramujos (*Biomphalaria glabrata*) e camundongos Suíços.

Na parte da manhã caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, previamente infectados com miracídios originários de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de camundongos Suíços, foram expostos à luz artificial por cerca de duas horas para que liberassem cercárias em um pequeno recipiente contendo água. Esse recipiente foi levado ao Biotério de Experimentação do Laboratório de Toxicologia Ambiental, onde ocorreu a infecção dos camundongos jovens usados no presente estudo.

Ainda durante a manhã os filhotes foram marcados para a identificação e destinados aos grupos experimentais. A infecção ocorreu como se segue. Cada filhote com 10±1 dias de vida ficou em contato com 3mL de água destilada contendo 100 (cem) cercárias durante 20 minutos. O filhote e a água contendo as cercárias foram mantidos aquecidos por meio de lâmpada incandescente (60W) posicionada próxima à placa de petri coberta com uma tela de arame. A contagem das cercárias foi feita usando



uma lupa estereoscópica Zeiss®, modelo Stemi SV11® e com o auxílio de uma micropipeta, empregada para a transferência das cercárias do recipiente original para a placa de petri.

Transcorrido o tempo fixado para a infecção (20 minutos) os animais retornaram às suas ninhadas originais, onde permaneceram até o desmame. À suspensão restante na placa de petri foi adicionado álcool iodado para facilitar a contagem das cercárias que não penetraram e posterior cálculo do índice de penetração.

## **8. Índice de penetração**

O índice de penetração (*i.e.* a percentagem de cercárias que penetraram em cada animal foi obtido subtraindo o número de cercárias remanescentes na placa de petri (cabeças isoladas + cercárias íntegras) do total adicionado (100).

Camundongos, cujo índice de penetração foi inferior a 98% não foram usados nos experimentos.

## **9. Exposição ao agente clastogênico**

Entre os dias 54 e 56 após a infecção com *Schistosoma mansoni*, e 24h antes de sofrerem a eutanásia, os camundongos foram tratados com o agente clastogênico (CLF ou DMBA) ou apenas com o veículo correspondente (salina ou óleo de milho), conforme o grupo a que pertenciam. A via de administração foi a intraperitoneal (ip) sendo a solução salina o veículo para a CLF e o óleo de milho o veículo para o DMBA. Foi administrada uma única dose dos clastógenos aos animais-teste e uma única dose do veículo aos animais-controle.

A CLF (CAS n°6055-19-2) foi obtida através de doação do produto Fosfaseron® pelo Laboratório Ítaca, Rio de Janeiro. Os animais receberam uma dose de 25mg/kg de CLF, sendo o volume injetado igual a 10mL/kg, 24h antes da eutanásia. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo e recebeu uma única dose de salina (NaCl 0,9% m/v em água destilada) sendo o volume injetado igual a 10mL/kg.

O DMBA (CAS n°57-97-6) foi comprado da empresa Sigma Aldrich®. Os animais receberam uma dose de 35mg/kg de DMBA em óleo de milho (volume injetado igual a 10mL/kg), 24h antes da eutanásia. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo usado para suspender o DMBA recebendo uma dose de óleo de milho puro (Mazola®) correspondente a 10mL/kg.

## **10. Eutanásia, coleta da medula óssea e preparo das lâminas**

Os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical entre os dias 55 e 57 após a infecção. Animais que haviam sido infectados, mas cujo fígado não apresentava sinais visíveis a olho desarmado de intensa formação de granulomas não foram usados nos experimentos.

Os fêmures dos animais foram retirados cirurgicamente. A medula óssea foi extraída de cada fêmur com auxílio de seringa hipodérmica e agulha adequada (Saldanha Rodrigues®) e recolhida em soro fetal bovino (Cripion®). A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1000rpm e 20°C numa centrífuga Eppendorf® 5804 R e o sobrenadante foi quase totalmente descartado para que o “*pellet*” fosse ressuspenso no soro restante. Uma gota desse *pellet* ressuspenso foi colocada em lâmina limpa e desengordurada (Glass Técnica®) para fazer o esfregaço que foi seco ao ar antes da coloração.

O corante usado no preparo das lâminas foi uma mistura de Giemsa (Merck®) e May-Grünwald (Isofar®). O Giemsa é preparado com tampão fosfato (hidrogenofosfato comprado da Merck® e di-hidrogenofosfato comprado da Reagen®) pH 6,8 no lugar da água destilada:

- A) May-Grünwald. Trata-se de uma solução 3% m/v dos corantes eosina-azul de metileno segundo May-Grünwald (Vetec®) em metanol, misturada com tampão fosfato pH6,8 numa proporção de 1:1. A solução metanólica foi estocada em geladeira e a diluição foi preparada no momento do uso, na quantidade necessária.
- B) Giemsa. Trata-se de uma solução 0,0002% m/v dos corantes eosina-azul de metileno segundo Giemsa (Merck®) em uma mistura de glicerina, metanol e tampão fosfato pH6,8.

O esfregaço foi corado em jarras tipo Coplin, no dia seguinte ao do seu preparo. A primeira jarra contém uma solução 3% m/v da mistura de corantes segundo May-Grünwald em Metanol misturada com tampão fosfato pH 6,8 descrita anteriormente. Nessa solução as lâminas permanecem 3 minutos. A segunda solução, onde as lâminas permanecem 2 minutos, foi uma diluição da primeira solução com água destilada, numa proporção de 1:1. A terceira solução, onde as lâminas permanecem por 10 minutos, foi uma solução do corante segundo Giemsa em metanol/glicerina/tampão fosfato.

Depois de coradas, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas com papel de filtro e tiveram os seus versos limpos com metanol. Depois de secas, as lâminas ficam em contato com xileno por 5 minutos. Depois de evaporado o xileno (Merck®), as lâminas estão prontas para a leitura.

Antes, porém, da leitura ao microscópio, as lâminas foram codificadas para que não fosse possível a identificação do animal e do grupo experimental a que esse animal pertencia. Apenas o mestrando leu todas as lâminas.

O microscópio usado para analisar as lâminas foi um aparelho da marca Olympus®, modelo BX45®. Para cada animal foi contado um total de 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) e o número de EPC a cada 200 eritrócitos contados. Para cada grupo há um mínimo de 5 (cinco) animais.

## **11. Análise Estatística dos dados**

Os resultados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SPSS®, versão 9.

## **12. Reagentes e demais equipamentos**

O corante May-Grünwald foi proveniente da Hiedel® e o Giemsa da Vetec®. Tanto o hidrogenofosfato quanto o di-hidrogenofosfato e o Metanol (todos com grau

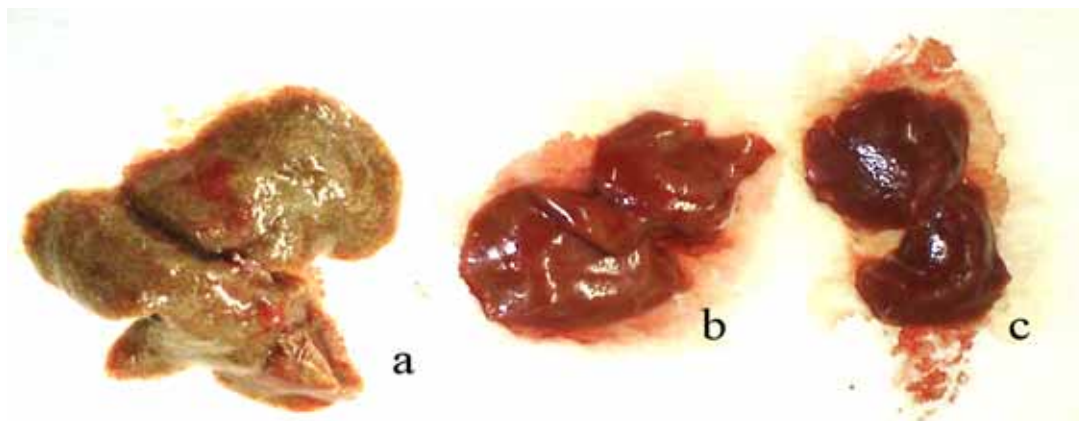
P.A.) foram provenientes da Vetec®. Para as imagens digitalizadas usou-se um microscópio Zeiss®, modelo Axiolab RE® ou uma lupa estereoscópica Zeiss®, modelo Stemi SV11® acoplados a um microcomputador Compaq® Evo D300® equipado com processador PentiumIV 1,7GHz e 128MB RAM, rodando Windows®2000 SP4 e o programa utilizado para captura das imagens foi o Image-Pro Plus® v. 4.5 da Media Cybernetics®. A imagem dos fígados dos camundongos foi feita com uma câmera fotográfica digital Sony® modelo Cybershot® 4,1Mpx.

## RESULTADOS

### 13. Sinais de toxicidade e manifestação clínica da infecção com *S. mansoni*

Ao serem mortos, os camundongos foram examinados para identificação de eventuais sinais de toxicidade e para a detecção da presença de alterações hepáticas sugestivas da formação de granulomas ao redor dos ovos retidos nos fígados daqueles que haviam sido infectados com *Schistosoma mansoni*. Animais que apresentavam piloereção e feridas não foram utilizados no experimento.

Para constatar que a infecção com *S. mansoni* causou doença com comprometimento hepático, este órgão foi cuidadosamente examinado a olho desarmado, como descrito anteriormente. O fígado dos animais não infectados apresenta coloração avermelhada mais intensa e superfície lisa, enquanto o dos camundongos infectados é de coloração mais escura e tem a superfície com aspecto granuloso que reflete a formação de granulomas ao redor dos ovos do verme retidos no parênquima hepático. O fígado dos animais tratados com CLF ou com DMBA apresentou coloração visivelmente mais pálida do que a dos órgãos dos infectados e não infectados que receberam apenas o veículo.



**Figura 6.** Fígado de camundongos: a) infectado com *S. mansoni*; b) tratado com DMBA; c) controle não-infectado e não tratado com clastógenos. Imagem feita durante os experimentos.

### 14. Eficiência da infecção dos camundongos com cercárias de *S. mansoni*

A eficiência da infecção dos camundongos foi avaliada pela determinação do índice de penetração das cercárias (IP%). Como descrito na literatura e constatado em estudos anteriores do nosso laboratório, os valores obtidos para o IP% foram elevados, próximos de 100%, indicando que o método de infecção escolhido é muito eficiente.

Apenas um dos camundongos expostos às cercárias de *S.mansoni* exibiu índice de penetração inferior a 97%, sendo este animal excluído do experimento. Como pode ser visto na Tabela 1, o valor do IP% variou entre 98% e 100% não diferindo entre os grupos ou entre os sexos (análise estatística empregando o teste de Kruskal-Wallis e ou o teste U de Mann-Whitney).

**Tabela 1.** Índice de Penetração (IP%) das cercárias de *S. mansoni* nos camundongos.

Grupo Experimental		IP%	
		Média ± DP	mín-máx
Infectados com <i>S. mansoni</i>	Macho	100,00 ± 0,00	100 - 100
	Fêmea	99,86 ± 0,54	98 - 100
Infectado com <i>S. mansoni</i> + CLF <sup>1</sup>	Macho	100,00 ± 0,00	100- 100
	Fêmea	99,90 ± 0,32	99 - 100
Infectado <i>S. mansoni</i> + DMBA <sup>2</sup>	Macho	100,00 ± 0,00	100 - 100
	Fêmea	100,00 ± 0,00	100 - 100

<sup>1</sup>A CLF foi administrada por via i.p. em dose única de 25mg/kg de peso corpóreo.

<sup>2</sup>O DMBA foi administrado por via ip em dose única de 35mg/kg.

Os camundongos foram expostos a 100 cercárias durante 20min. Os grupos não diferem quanto ao IP% (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,704$ ).

## 15. Alteração do peso corpóreo dos animais

O peso dos camundongos foi registrado a partir do dia de infecção, época em que os animais tinham aproximadamente 10 dias de vida. O peso médio dos animais pertencentes aos grupos que seriam infectados (separados por sexo) é apresentado na tabela 3. Não houve diferença entre os pesos de machos e fêmeas dentro de um mesmo grupo.

**Tabela 2.** Peso corporal (g) dos camundongos no dia da infecção com cercárias de *S. mansoni*.

Tratamento	Sexo	Peso (Média ±DP), g
Infectados com <i>S. mansoni</i>	Macho	4,82± 0,93
	Fêmea	4,78 ± 0,59
Infectados com <i>S. mansoni</i> + CLF <sup>1</sup>	Macho	6,21 ± 1,39
	Fêmea	6,25 ± 1,01
Infectados com <i>S. mansoni</i> + DMBA <sup>2</sup>	Macho	5,19 ± 0,86
	Fêmea	5,49 ± 0,90

<sup>1</sup>A CLF foi administrada por via i.p. na dose única de 25mg/kg de peso corpóreo. <sup>2</sup>O DMBA foi administrado por via ip em dose única de 35mg/kg, 10mL/kg.

Entre o dia da infecção e o dia em que foram mortos, os animais cresceram tendo o peso corporal aumentado aproximadamente oito vezes, passando o peso médio de 5,3g para 40,8 g de peso corpóreo (Tabelas 2 e 3). A tabela 4 mostra o ganho médio de peso para cada sexo em cada grupo.

**Tabela 3.** Peso corporal (g) dos camundongos no dia em que foram mortos.

Tratamento	Sexo	Peso (Média ± DP), g	p
Não infectado e não tratado*	Macho	44,43 ± 4,24	<0,01
	Fêmea	35,02 ± 4,66	
Infectados com <i>S. mansoni</i>	Macho	37,82 ± 5,50	0,74
	Fêmea	37,22 ± 5,47	
Não infectados tratados com salina	Macho	44,36 ± 2,07	0,15
	Fêmea	44,75 ± 5,09	
Não-infectados tratados com óleo de milho	Macho	44,00 ± 2,90	0,67
	Fêmea	44,74 ± 4,16	
Não-infectados tratados com CLF* <sup>1</sup>	Macho	43,41 ± 4,26	<0,01
	Fêmea	36,23 ± 4,47	
Infectados com <i>S. mansoni</i> + CLF* <sup>1</sup>	Macho	39,69 ± 2,69	<0,01
	Fêmea	31,97 ± 4,10	
Não-infectados tratados com DMBA* <sup>2</sup>	Macho	48,79 ± 5,90	0,03
	Fêmea	42,45 ± 5,65	
Infectados com <i>S. mansoni</i> + DMBA* <sup>2</sup>	Macho	44,06 ± 3,21	0,17
	Fêmea	39,30 ± 6,24	

\*Valor de *p* refere-se a comparações entre machos e fêmeas dentro de um mesmo grupo. <sup>1</sup> A CLF foi administrada por via i.p. na dose única de 25mg/kg de peso corpóreo. <sup>2</sup>O DMBA foi administrado por via ip na dose única de 35mg/kg. Os veículos “salina” e “óleo de milho” foram administrados em volume correspondente a 10mL/kg.

Como esperado, dentro de um mesmo grupo, os machos adultos foram mais pesados do que as fêmeas de mesma idade (Gráfico 1). Em virtude da doença, os animais adultos infectados com *S.mansoni* tenderam a apresentar peso corporal menor do que os não infectados (tabela 4).

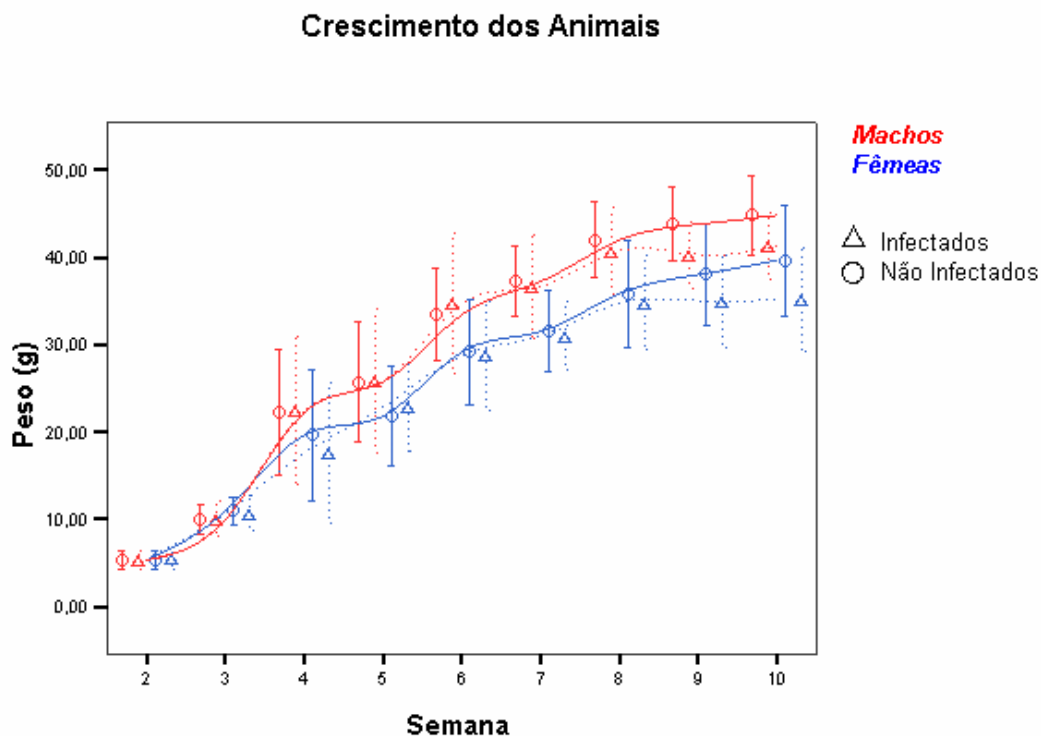
**Tabela 4.** Ganho médio de peso corporal (g) dos camundongos suíços, machos e fêmeas, durante o período de 55 dias de infecção com *S. mansoni*.

Tratamento	Sexo	Δ Peso (Média±DP), g
Não infectado e não tratado*	Macho	39,44 ± 3,99
	Fêmea	30,20 ± 4,15
Infectados com <i>S. mansoni</i>	Macho	33,00 ± 5,34
	Fêmea	32,44 ± 5,76
Não infectados tratados com salina	Macho	39,34 ± 2,38
	Fêmea	38,80 ± 5,27
Não-infectados tratados com óleo de milho	Macho	38,35 ± 2,40
	Fêmea	39,95 ± 4,11
Não-infectados tratados com CLF* <sup>1</sup>	Macho	37,74 ± 4,16
	Fêmea	30,38 ± 4,79
Infectados com <i>S. mansoni</i> + CLF* <sup>1</sup>	Macho	33,47 ± 3,75
	Fêmea	25,73 ± 4,05
Não-infectados tratados com DMBA* <sup>2</sup>	Macho	43,30 ± 5,89
	Fêmea	36,95 ± 6,11
Infectados com <i>S. mansoni</i> + DMBA* <sup>2</sup>	Macho	38,88 ± 3,00
	Fêmea	33,81 ± 5,84

\*A diferença entre machos e de fêmeas foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup>O tratamento com Ciclofosfamida consiste em dose única i.p. 25mg/kg. <sup>2</sup>O tratamento com DMBA consiste em dose única i.p. 35mg/kg.

Comparando o crescimento de machos e fêmeas entre os animais não infectados e os animais que foram infectados com cercárias de *S. mansoni* observamos que, ao fim da décima semana, houve diferença estatisticamente significativa, com a tendência de que os animais infectados tiveram menores ganhos de peso que aqueles não infectados, e que as fêmeas ganharam menos peso que os machos (gráfico 1).





**Gráfico 1.** Alteração de peso corporal dos camundongos a partir da infecção com 100 cercárias de *S. mansoni* aos 10 dias de vida

## 16. Efeito da Infecção com *S. mansoni* sobre a Frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN)

A tabela 6 mostra a frequência de Eritrócitos Policromados (ou policromáticos) micronucleados (EPCMN), por mil Eritrócitos Policromados, no grupo controle não-tratado (*i.e.* camundongos não infectados e não tratados com agente clastogênico) e nos controles tratados apenas com os veículos da CLF e DMBA. Como pode ser visto, a frequência de EPCMN foi maior nos machos do que nas fêmeas não tratadas. ( $p=0,04$ ), mas não diferiu entre sexos nos demais grupos.

Os machos tratados com salina exibiram uma frequência de EPCMN menor do que os que não receberam qualquer tratamento, embora não diferente daquela apresentada no grupo não tratado ( $p=0,06$ ). Nenhuma outra diferença foi notada entre os diferentes grupos de camundongos que não receberam os agentes clastogênicos CLF ou DMBA (Tabela 5).

**Tabela 5.** Frequência (%; média  $\pm$  DP) de EPCMN nos camundongos infectados e não infectados com *S. mansoni* que não foram expostos a agentes genotóxicos.

Tratamento	Sexo (n)	%EPCMN (Média $\pm$ DP)
Não infectado e não tratado*	Macho (20)	2,30 $\pm$ 1,61
	Fêmea (15)	1,17 $\pm$ 0,72
Não infectados tratados com salina	Macho (6)	1,00 $\pm$ 0,55
	Fêmea (6)	1,33 $\pm$ 0,61
Não-infectados tratados com óleo de milho	Macho (11)	1,50 $\pm$ 1,14
	Fêmea (11)	1,18 $\pm$ 0,72
Infectados com <i>S. mansoni</i>	Macho (16)	1,44 $\pm$ 0,61
	Fêmea (14)	1,43 $\pm$ 0,83

\* Machos diferem de fêmeas ( $p < 0,05$ ). Os veículos “salina” e “óleo de milho” foram administrados em volumes correspondentes a 10mL/kg de peso. Os camundongos foram mortos 24h após a administração do veículo.

Os resultados indicam, portanto, que a infecção não alterou a frequência de EPCMN.

### 17. Efeito da ciclofosfamida (CLF) e do 7, 12 - dimetilbenzantraceno (DMBA) sobre a frequência de EPCMN

A tabela 6 nos mostra que, tal como esperado, os tratamentos com CLF e DMBA induziram um claro aumento da frequência de EPCMN.

Na tabela 6 pode ser observado ainda que os efeitos clastogênicos da CLF e do DMBA nos camundongos infectados foram menores do que aqueles registrados nos animais não infectados. Esses resultados sugerem, portanto, que a infecção com *S. mansoni* atenuou os efeitos dos dois clastógenos.

**Tabela 6.** Freqüência de EPCMN (%) em relação ao total de EPC e percentagem de EPC em relação ao total de eritrócitos na medula óssea de camundongos.

Tratamento:	%EPCMN Média ± DP (Grupo, N)			% EPC Média ± DP (Grupo, N)		
	Não Tratado	Ciclofosfamida	DMBA	Não Tratado	Ciclofosfamida	DMBA
<b>Não Infectado</b>	1,81 ± 1,41 (I, 35)	8,28 ± 4,40 (V, 25) <sup>b</sup>	5,03 ± 4,60 (VII, 19) <sup>b</sup>	50,07 ± 5,60 (I, 35)	46,20 ± 9,00 (V, 25) <sup>a</sup>	44,97 ± 5,49 (VII, 19) <sup>b</sup>
<b>Infectado</b>	1,43 ± 0,70 (II, 30) <sup>a</sup>	3,61 ± 1,80 (VI, 23) <sup>b, c</sup>	1,42 ± 0,79 (VIII, 18) <sup>a</sup>	44,07 ± 7,81 (II, 30) <sup>b</sup>	42,98 ± 9,07 (VI, 23) <sup>b</sup>	36,97 ± 6,76 (VIII, 18) <sup>b, c</sup>

<sup>a</sup> Não difere do Grupo I,  $p > 0,05$ .

<sup>b</sup> Difere do Grupo I,  $p < 0,05$ .

<sup>c</sup> Difere do grupo que recebeu o mesmo tratamento, mas não foi infectado,  $p < 0,05$ .

Machos e Fêmeas foram reunidos porque não houve diferença entre sexos (exceto no grupo não tratado não infectado,  $p = 0,04$ ). EPCMN) Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, EPC) Eritrócitos Policromáticos, DP) Desvio Padrão.



**Figura 7.** Micronúcleo em Eritrócito Policromado em camundongos tratados com Ciclofosfamida. Imagem feita durante os experimentos.

## **18. Efeitos da infecção com *S. mansoni* e do tratamento com CLF e DMBA sobre o percentual de Eritrócitos Policromados no total de eritrócitos da medula óssea (mielotoxicidade)**

A frequência de Eritrócitos Policromáticos (EPC) entre os primeiros 200 eritrócitos contados nos esfregaços de medula óssea é usada como um indicador de eventuais efeitos adversos do tratamento sobre a função deste órgão hematopoiético. A redução da frequência reflete uma diminuição da formação de novos eritrócitos traduzindo, por exemplo, o efeito mielotóxico de um agente químico.

Não notamos diferenças entre sexos quanto à frequência de EPC nos diversos grupos analisados.

A infecção com *S. mansoni*, todavia, pareceu alterar esse percentual, diminuindo o número de EPC (tabela 6). O tratamento com os veículos (NaCl 0,9% e óleo de milho) aparentemente também causou uma ligeira redução do percentual de Eritrócitos Policromados em comparação com o grupo não tratado e não infectado (tabela 7).

A tabela 6 mostra que os tratamentos com o CLF e DMBA reduziram o percentual de EPC na medula óssea indicando que ambos, além de genotóxicos, foram também, em certa medida, mielotóxicos. Tendo em vista o mecanismo de ação das duas substâncias, a interferência com a proliferação celular e a mielotoxicidade são esperadas. No presente experimento, a diminuição da proliferação celular foi de pequena magnitude indicando o acerto na escolha das doses dos agentes clastogênicos, doses estas que produziram claro efeito genotóxico acompanhado de mielotoxicidade discreta.

Comparando o resultado de cada tratamento com o resultado para os veículos de administração (tratados com CLF contra salina e tratados com DMBA contra óleo) vemos que não houve diferença de resposta entre os grupos.

Com exceção do grupo que foi infectado e tratado com DMBA cuja percentagem de eritrócitos jovens foi significativamente menor daquela obtida para o grupo que recebeu apenas o veículo (óleo de milho) com valor de  $p < 0,01$ , as demais diferenças entre tratados com clastógenos e respectivos controles veículo não foram estatisticamente significativas (tabelas 6 e 7).

**Tabela 7.** Frequência de EPCMN (%) em relação ao total de EPC e percentagem de EPC em relação ao total de eritrócitos na medula óssea para os grupos controle.

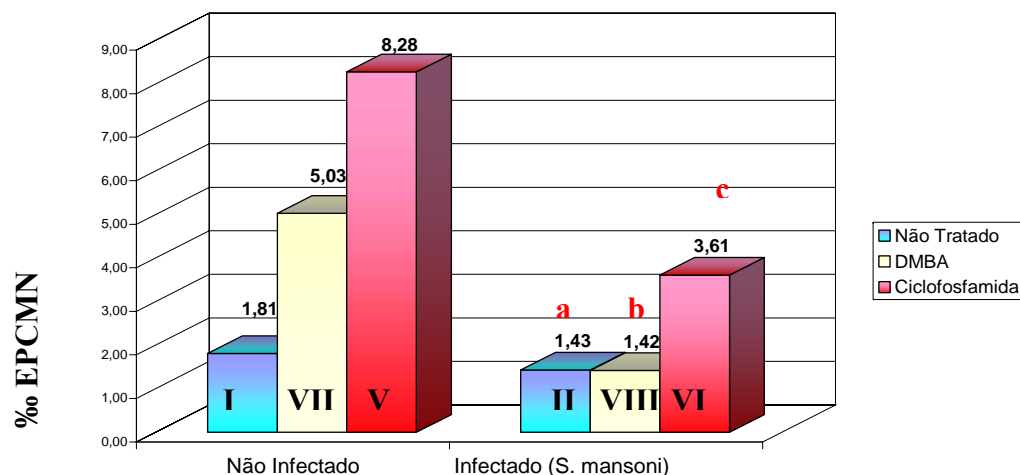
Grupo (n)	%EPCMN (Média ± DP)			% EPC (Média ± DP)		
	I - Não Tratado (35)	III - Salina (12)	IV - Óleo de milho (22)	I - Não Tratado (35)	III - Salina (12)	IV - Óleo de milho (22)
	1,81 ± 1,41	1,17 ± 0,58 <sup>a</sup>	1,34 ± 0,94 <sup>a</sup>	50,07 ± 5,60	45,92 ± 4,07 <sup>b</sup>	43,36 ± 2,92 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Não difere do Grupo I (Não tratado, não infectado),  $p > 0,05$ .

<sup>b</sup> Difere do Grupo I (Não tratado, não infectado),  $p < 0,05$ .

A comparação sem a diferenciação entre sexos é feita pois nos grupos não houve diferença entre machos e fêmeas, à exceção do Grupo não tratado, não infectado onde essa diferença foi pequena ( $P=0,04$ ). EPCMN) Eritrócitos Policromáticos Micronucleados, EPC) Eritrócitos Policromáticos, DP) Desvio Padrão.

**Frequência de EPCMN**



**Gráfico 2** Frequência de EPCMN em medula óssea de camundongos suíços. Exposição ao DMBA (35mg/kg ip) e à Ciclofosfamida (25mg/kg ip). **a)** Não difere do Grupo I ( $p > 0,05$ ), **b)** Não difere dos Grupos I e II ( $p < 0,05$ ), **c)** difere dos Grupos I e V ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

### 19. Sobre o método de infecção com *Schistosoma mansoni*

Investigamos, em modelo murino de esquistossomose mansônica, se esta doença parasitária alteraria o efeito de dois agentes genotóxicos que dependem de ativação metabólica. Como o amadurecimento dos vermes no organismo do hospedeiro requer aproximadamente dois meses, optamos por método de infecção viável em camundongos muito jovens (10 dias de vida). Assim sendo, a modulação dos efeitos genotóxicos da CLF e do DMBA foi avaliada em fase de evolução da doença em que já há comprometimento hepático (55 dias pós-infecção, 65 dias de vida) mas os animais ainda podem ser considerados adultos jovens. Trabalhos anteriores de nosso grupo haviam demonstrado que a eficiência de penetração nessa tenra idade (10 dias) é semelhante àquela que ocorre com o método mais difundido de infecção de animais em idade adulta, isto é, a penetração percutânea através da exposição da cauda do camundongo. Quando a infecção ocorre em camundongos com tenra idade, aparentemente, é maior a proporção das cercárias que penetraram através da pele que são posteriormente recuperadas como vermes adultos através de perfusão hepato-mesentérica (Fidalgo-Neto et al., 2004).

Empregamos, portanto, o modelo de infecção anteriormente testado e usamos o índice de penetração das cercárias de *S. mansoni* como controle interno do experimento. Controlando adequadamente o aquecimento produzido por duas lâmpadas incandescentes, obtivemos os mesmos índices de penetração descritos anteriormente, *i.e.* aproximadamente 100% das cercárias penetraram através da pele dos camundongos.

A confirmação do êxito da infecção, ou seja, de que as cercárias que penetraram se transformaram em vermes adultos sexualmente maduros que, após o acasalamento, iniciaram a ovoposição, foi feita pela inspeção visual dos fígados quando os camundongos foram mortos (dia 55 pós-infecção). A presença de grande número de ovos retidos no parênquima hepático, e a reação granulomatosa que se forma ao redor deles, altera o aspecto do órgão o que pode ser visto a olho desarmado, tal como ilustrado (Figura 6). O fígado de todos os animais, que foram considerados “infectados” para fins deste estudo, tinham o aspecto típico, inconfundível, do órgão repleto de granulomas ao redor de grande número de ovos do helminto retidos no tecido.

## 20. Sobre a atenuação do efeito genotóxico da CLF e do DMBA em camundongos infectados com *S. mansoni*

A CLF e o DMBA são substâncias genotóxicas com conhecido efeito clastogênico *in vitro* e *in vivo*. Assim sendo, ambas são frequentemente usadas como controles positivos em estudos de toxicologia genética (Morita et al., 1997; Hayashi et al., 2000; Gomes-Carneiro et al., 2003). Os dois agentes genotóxicos, nas doses escolhidas para esse estudo, aumentaram de forma moderada a frequência de EPCMN em EPC da medula óssea de camundongos machos e fêmeas não infectados. Como a dose escolhida foi suficiente para produzir um efeito claramente mensurável, mas não produziu nem o efeito máximo nem mielotoxicidade acentuada, poderíamos eventualmente detectar tanto uma exacerbação quanto uma atenuação do efeito genotóxico em decorrência da infecção.

A modulação da genotoxicidade de agentes químicos por infecções parasitárias é muito pouco estudada, embora haja suspeitas de que algumas doenças causadas por helmintos estejam associadas a neoplasias em seres humanos. Uma das associações mais consistentes é a da esquistossomose urinária, causada pelo *Schistosoma haematobium*, e o carcinoma da bexiga urinária (Shaw et al., 1999). A infecção induz um processo inflamatório crônico na bexiga em virtude da deposição de um grande número de ovos do parasita que ficam retidos nos tecidos sub-epiteliais. É possível que o processo de carcinogênese esteja de alguma forma relacionado à inflamação crônica, mas os elos entre a infecção e o aparecimento do câncer de bexiga ainda são pouco claros. Sheweita e colaboradores (2004) relataram que a atividade de enzimas de fase I e II da biotransformação de xenobióticos está alterada na bexiga de pacientes com esquistossomose urinária e câncer de bexiga e sugeriram que o elo entre as duas doenças poderia ser a modificação do metabolismo de carcinógenos químicos causada pela infecção/inflamação.

Associações positivas entre colangiocarcinoma, ou câncer dos ductos biliares, e infecções por outros trematódeos, como o *Opisthorchis viverrini* e a *Fasciola hepatica*, também tem sido descritas no homem e em animais (Sripa, 2003; Montero et al., 1999; Gentile et al., 1998).

A suspeita de que a esquistossomose pudesse ser um fator de risco para neoplasias levou Osada e colaboradores a investigar o efeito genotóxico de diferentes extratos do parasita (*S. mansoni* e *S. haematobium*) e seus ovos em testes

mutagenicidade. Os resultados obtidos por esses pesquisadores foram, no entanto, essencialmente negativos sugerindo que os vermes não contêm agentes genotóxicos.

Estes achados não excluem a possibilidade de que a doença causada por esses trematódeos possa, por outros mecanismos, iniciar ou promover a carcinogênese (Osada et al., 2005).

Alguns outros estudos com *Schistosoma sp*, porém, têm reforçado a suspeita de que estas doenças possam ser um fator de risco para o câncer. Neste sentido, a infecção com *S. haematobium* foi associada ao aumento da frequência de células micronucleadas (Anwar & Rosin 1993; Anwar, 1994), enquanto a infecção com *S. japonicum* foi associada ao aumento da incidência de câncer de colo do reto (IARC, 1994; Ishii et al., 1994). Em relação à infecção com *S. mansoni* há relativamente poucos estudos experimentais e epidemiológicos sobre uma possível associação com o desenvolvimento de câncer.

Dois estudos experimentais envolvendo testes de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, um em camundongos infectados com *S. mansoni*, (33 dias após a infecção) e outro com fração S9 hepática de camundongos infectados com *S. japonicum* (15 semanas após a infecção), apresentaram resultados divergentes (Matsuoka et al., 1989; Awney et al., 2001). No estudo com *S. mansoni*, numa fase inicial da infecção, quando ainda são escassos os granulomas (33 dias pós-infecção), a infecção aumentou o efeito genotóxico (nas linhagens TA98 e TA102) do benzo(a)pireno, pró-mutágeno ativado pela isoenzima CYP1A1 em tecido hepático de camundongos (Awney et al., 2001). A infecção de camundongos com *S. japonicum*, por outro lado, diminuiu consideravelmente a capacidade da fração S9 hepática de ativar pró-mutágenos como a aflatoxina B1, o 2-acetilaminofluoreno e o 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol, o que atenuou o efeito mutagênico dessas substâncias no teste de Ames (Matsuoka et al., 1989).

Os dados obtidos nesse trabalho indicaram que a infecção com *S. mansoni per se* não aumentou, 55 dias após a infecção, a frequência de eritrócitos micronucleados tendo como referência a frequência (basal) registrada em camundongos não infectados. Portanto, a infecção com *S. mansoni per se* não parece aumentar – pelo menos na medula óssea – a ocorrência de danos genéticos que poderiam iniciar um processo de carcinogênese.

Foi relatado por Sheweita e colaboradores, e também outros autores, que a esquistossomose altera a expressão e a atividade de enzimas citocromo P450 envolvidas na biotransformação de xenobióticos (Sheweita et al., 1998; Sheweita et al., 2001;



Sheweita et al., 2002). Essas alterações podem, em princípio, modificar o efeito genotóxico de substâncias químicas interferindo tanto com a ativação metabólica e eliminação de pró-mutágenos quanto com a velocidade de eliminação de mutágenos de ação direta.

Os resultados do presente estudo mostraram que camundongos infectados com *S. mansoni* apresentaram uma diminuição do efeito do DMBA, que se traduziu por uma atenuação do aumento da frequência de EPCMN causado por este pró-mutágeno. Como o DMBA, para exercer o seu efeito clastogênico, depende da ativação metabólica por isoenzimas das subfamílias CYP1A (CYP1A1) e, possivelmente CYP1B (CYP1B1), é possível que a diminuição do efeito clastogênico do DMBA nos infectados se deva à diminuição generalizada da expressão e atividade de isoformas citocromo P450 que ocorre nas fases de evolução da doença (e.g. 55 dias pós-infecção) em que há comprometimento hepático (Sheweita et al., 1998; Sheweita et al., 2002).

A CLF também é um pró-fármaco e pró-mutágeno cuja ativação depende das isoenzimas CYP2B6 e CYP3A4. Assim a atenuação do efeito clastogênico da CLF notada nos camundongos infectados com *S. mansoni* poderia ser explicada pelo mesmo mecanismo (diminuição da expressão e atividade de enzimas citocromo P450 induzida pela infecção).

## **21. Sobre a mielotoxicidade**

A mielotoxicidade foi avaliada determinando a proporção dos eritrócitos jovens (policromáticos) no total de eritrócitos (células policromáticas + normocromáticas). A proporção de eritrócitos jovens é uma indicação da proliferação dos eritrócitos na medula óssea dos camundongos e a sua alteração (redução) é um sinal de mielotoxicidade.

A infecção com *S. mansoni* praticamente não alterou a proliferação celular em relação ao grupo que não foi infectado e que não recebeu os agentes clastogênicos. O tratamento com o DMBA causou discreta redução da proliferação celular, diminuindo a proporção de eritrócitos jovens na medula óssea. O tratamento com a CLF também apresentou apenas uma leve toxicidade para a medula óssea. Esses resultados indicam que as doses usadas de DMBA e CLF produziram claro efeito genotóxico, sem induzir, entretanto, mielotoxicidade acentuada.

## CONCLUSÕES

A infecção com *Schistosoma mansoni per se* não aumentou a frequência de EPCMN em relação aos níveis observados em camundongos não infectados e não tratados. Esses resultados sugerem que, 55 dias após a infecção, quando o fígado exhibe granulomas ao redor dos ovos do parasita, a esquistossomose mansônica não aumenta a frequência de danos genéticos na medula óssea dos camundongos.

Os nossos dados também indicaram que a infecção com *S. mansoni* interferiu com o efeito clastogênico da CLF e do DMBA em camundongos, atenuando os aumentos da frequência de EPCMN causados pela CLF e pelo DMBA. Esses resultados indicam que a genotoxicidade desses dois mutágenos é reduzida pela infecção com *S. mansoni* na fase da doença em que já há ovos retidos e formação de granulomas no fígado (55 pós-infecção). Como tem sido descrito que nessa fase da esquistossomose mansônica murina há acentuada depressão da atividade de monooxigenases hepáticas, incluindo das isoformas CYP1A1 e da subfamília CYP2B, envolvidas na ativação metabólica desses dois pró-mutágenos, é possível que a atenuação do efeito genotóxico tenha sido devida à formação reduzida ou mais lenta dos metabólitos que causam dano ao DNA. Pouco se sabe, entretanto, sobre os efeitos da infecção com *S. mansoni* sobre a atividade das isoenzimas citocromo P450 do tecido hematopoiético existente na medula óssea.

Embora preliminares e envolvendo apenas dois agentes genotóxicos, os dados do presente estudo não são consistentes com a hipótese de que a esquistossomose mansônica está associada a maior risco de câncer, quer através de um efeito direto da parasitose sobre a iniciação da carcinogênese, quer *per se*, quer pela exacerbação do efeito de carcinógenos químicos de ocorrência ambiental. Ao contrário, os dados aqui apresentados sugerem que a infecção tende a reduzir esse risco, atenuando o efeito de carcinógenos que dependem de ativação metabólica.

## BIBLIOGRAFIA

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagar L, Hemminki K, Merlo F et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mut Res* 2000; 463:111-172.

Altman DG. *Practical statistics for medical research*. Londres: Chapman & Hall; 1997.

Aly MS, Khaled HM. Chromosomal aberrations in bilharzial bladder cancer as detected by Fluorescence In Situ Hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1999; 114:62-67.

Andrade ZA, Silva LM, Souza MM. An Experimental Approach to the Pathogenesis of "Pipestem" Fibrosis (Symmers' Fibrosis of the Liver). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1997; 92 (Pt 5): 699-706.

Andrews P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacol. Ther.* 1985 29 (Pt 1): 129-156.

Anwar WA e Rosin MP. Reduction in chromosomal damage in schistosomiasis patients after treatment with praziquantel. *Mut Res* 1993; 298:179-185.

Anwar WA. Praziquantel (antischistosomal drug): is it clastogenic, co-clastogenic or anticlastogenic? *Mutat. Res.* 1994; 305: 165-173.

Ashby J, Tinwell H. The rodent bone marrow micronucleus assay: contrast between its sensitivity to human carcinogens and its sensitivity to NTP rodent carcinogens. *Mutat. Res.* 1996; 352:181-184.

Atkins WM. Non-Michaelis-Menten kinetics in Cytochrome P450-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45:291-310.

Awney HA, Ghzlan HE, Sheweita SA, Mostafa MH. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection increased the mutagenicity of benzo(a)pyrene, the activity of aryl hydrocarbon hydroxylase and the formation of hepatic microsomal hydrogen peroxide. *Toxicology.* 2001; 163(Pt 2-3):213-8.

Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: Hardman JG, Limbird LE, editores-chefes. Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. Santiago: McGraw-Hill; 1996. p.3-20.

Bergquist NR. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998; 93 (Supl 3):95-101.

Bergquist NR. Schistosomiasis: from risk assessment to control. Trends Parasitol. 2002; 18 (Pt 7):309-314.

Blanchard TJ. Schistosomiasis. Trav. Med. Infect. Disease 2004; 2:5-11.

Capron A. Schistosomiasis: Forty Years' War on the Worm. Parasitol. Today 1998; 14 (Pt 10): 379-384.

Chitsulo L, Engles D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. Acta Trop. 2000; 77:41-51.

Cioli D, Pica-Mattoccia L. Praziquantel. Parasitol. Res. 2003; 90 (Suppl): 3-9.

Cioli D, Botros SS, Wheatcroft-Francklow K, Mbaye A, Southgate V, Tchuente LAT et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. Int. J. Parasitol. 2004; 34(8):979-87.

Coombs GH, Wolf CR, Morrison VM, Caft JA. Changes in xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver following infection with *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 1990; 41:17-24.

Coutinho EM, Barros AF, Barbosa Jr A, Oliveira SA, Silva LM, Araújo RE et al. Host Nutritional Status as a Contributory Factor to the remodeling Schistosomal hepatic fibrosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2003; 98 (Pt 7): 919-25.

Da Silva LC, Carrilho FJ. Hepatic Schistosomiasis – Pathophysiology and Treatment. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 1992; 21 (Pt 1):163-177.

Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochrome P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-related chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003; 43:149-173.

Domingo EO, Warren KS, Stenger RJ. Increased incidence of hepatoma in mice with chronic Schistosomiasis mansoni treated with a carcinogen. *Am. J. Pathol.* 1967; 51 (Pt 3):307-321.

Edler, Lutz. Statistical methods for short-term tests in genetic toxicology: The first fifteen years; *Mutat. Res.* 1992; 277:11-33.

Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M, Chang WP, et al. Intra- and Inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmatic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide scoring exercise by the HUMN project. *Mutat. Res.* 2003a; 534:45-64.

Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mutat. Res.* 2003b; 534:65-75.

Fidalgo-Neto AA, De-Carvalho RR, De-Oliveira ACAX, Manhães-Rocha DA, Paumgarten FJR. Penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in suckling and adult Swiss Webster and DBA/2 mice. *J. Exp. Anim. Sci.* 2004; 43:29-38.

Fitzpatrick FA. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int. Immunopharmacol* 2001; 1:1651–1667.

Galván N, Jaskula-Sztul R, MacWilliams PS, Czuprynski CJ, Jefcoate CR. Bone marrow cytotoxicity of benzo[a]pyrene is dependent on CYP1B1 but is diminished by Ah receptor-mediated induction of CYP1A1 in liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 193:84-96.

Galván, N, Teske DE, Zhou G, Moorthy B, MacWilliams PS, Czuprynski CJ, et al. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in liver and lung by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene do not affect distribution of polycyclic hydrocarbons to target tissue: role of AhR and CYP1B1 in bone marrow cytotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 202 (Pt 3):244-257.

Gentile JM, Gentile GJ, Nannenga B, Johnson M, Blankespoor H, Montero R. Enhanced liver cell mutations in trematode-infected Big Blue transgenic mice. *Mutat. Res.* 1998; 400(Pt 1-2):355-60.

Gomes-Carneiro MR, De-Oliveira ACAX, De-Carvalho RR, Araújo IB, Souza CAM, Kuryiama SN et al. Inhibition of cyclophosphamide-induced teratogenesis by b-ionone. *Toxicol. Lett.* 2003; 138:205-213.

Gregus Z, Klaassen C. Mechanisms of Toxicity. In: Klaassen CD, organizador. Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. Nova Yorque, McGraw-Hill, 2001. p. 133-224.

Hagan P, El Meleigy M, Traore M. Schistosomiasis research: the end of the beginning. *Parasitol Today* 1998; 14 (Pt 10):392-4.

Hankinson O. The Aryl hydrocarbon Receptor Complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995; 35:307-340.

Hardman JG, Limbird LE, editors. As bases farmacológicas da terapêutica. McGraw Hill; 1996. p. 748-750.

Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M. Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 1984; 127:129-137.

Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD e dol. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring.. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35:234-252.

Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen-Tox Program; *Mutat. Res.* 1983; 123:61-118.

Heidel SM, Czuprynski CJ, Jefcoate CR. Bone marrow stromal cells constitutively express high levels of cytochrome P4501B1 that metabolize 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54:1000-1006.

Heidel SM, MacWilliams PS, Baird WM, Mohaiza-Dashwood W, Buters JTM, Gonzalez FJ, et al. Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Cancer Res.* 2000; 60:3454-3460.

Herrera LA, Ramirez T, Rodriguez U, Corona T, Sotelo J, Lorenzo M, et al. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000; 94:61-65.

Herrera LA, Ostrosky-Wegman P. Do helminths play a role in carcinogenesis? *Parasitol. Today* 2001; 17 (Pt 4):172-175.

Huang Z, Roy P, Waxman DJ. Role of Human Liver Microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in Catalyzing N-dechloroethylation of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Biochem. Pharmacol.* 2000; 59:961-972.

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs Volume 61: Infection with Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*: Infection with Schistosomes. 1994. p.45. <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol61/m61-1.htm> (acessado em 22/mar/2005)

Iber H, Sewer MB, Barclay TB, Mitchel SR, Li t, Morgan ET. Modulation of drug metabolism in infectious and inflammatory diseases. *Drug Metabol. Rev.* 1999; 31 (Pt 1):29-41.

Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of Cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002; 181-182:447-452.

Ingelman-Sundberg M. human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 2004; 369:89-104.

Ishii A, Matsuoka H, Aji T, Ohta N, Arimoto S, Wataya Y, et al. Parasite infection and cancer: with special emphasis on *Schistosoma japonicum* infections (Trematoda). A review. *Mutat. Res.* 1994; 305:273-281.

Katz N. Esquistossomose. In: Cimerman, S e Cimerman B, editores. *Medicina Tropical*. Rio de Janeiro: Atheneu; 2003. p. 175-183.

Kim D, Guengerich FP. Cytochrome P450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45:27-49.

King, CH., Mahmud, AAF. Schistosomiasis. In: Guerrante RL, organizador. *Essentials of Tropical infectious Diseases*. Philadelphia: Library of Congress; 2001.

Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1958; 75:376-386.

Kloos H. Schistosomiasis ecology: water resources development in the Awash Valley of Ethiopia. In: Akhtar R, editor. *Health and Disease in Tropical Africa. Geographical and medical viewpoints*. Chur: Harwood Academic publishers; 1987. p.305-333.

Kramers PG, Gentile JM, Gryseels BJAM, Jordan P, Katz N, Mott KE et al. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication No. 18: Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. *Mutat. Res.* 1991; 257(1):49-89.

Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 2000; 455:155-166.



Kumar S, Chen CS, Waxman DJ, Halpert JR. Directed Evolution of Mammalian Cytochrome P450 2B1: Mutations Outside of the Active Site Enhance the Metabolism of Several Substrates Including the Anticancer Prodrugs Cyclophosphamide and Ifosfamide. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (20):19569-75.

Lambertucci JR, Silva LCS, Andrade LM, Queiroz LC, Pinto-Silva RA. Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2004; 37 (Pt 4):333-337.

Laven JSE, Vleugels MPH, Dofferhoff ASM, Bloemberg P. Schistosomiasis haematobium as a cause of vulvar hypertrophy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1998; 79:213-216.

Lenzi JA, Mota EM, Pelajo-Machado M, Vale LS, Vale SB, Andrade ZA et al. Intestinal fibrovascular nodules caused by *Schistosoma mansoni* infection in *Calomys callosus*, Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae): a model of concomitant fibrosis and angiogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2002; 97 Suppl 7: 117-27.

Lewis DFV. Human cytochromes P450 associated with the phase I metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. *Curr. Med. Chem.* 2003; 10:1955-1972.

Lin JH, Lu AYH. Interindividual variability in inhibition and induction of Cytochrome P450 enzymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001; 41:535-67.

MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.* 1987; 189:103-112.

Masumi S, Moriyama M, Kannan Y, Ohta M, Koshitani O, Sawamoto O, et al. Changes in hepatic nitrogen metabolism in isolated perfused liver during development of thioacetamide-induced cirrhosis in rats. *Toxicology* 1999; 135:21-31.

Matsuoka H, Aji T, Ishii A, Arimoto S, Wataya Y, Hayatsu H. Reduced levels of mutagen processing potential in the *Schistosoma japonicum*-infected mouse liver. *Mutat. Res.* 1989; 227 (Pt 3):153-7.

Milward-De-Andrade R, Souza MB, Paranhos MAS. Infecção experimental de camundongos albinos com cercárias de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, previamente submetidas a ação de termofosfato magnésiano; *Cad. Saúde Pública* 1989; 5 (Pt 2):151-159.

Montero R, Gentile GJ, Frederick L, McMannis J, Murphy T, Silva G et al. Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis.* 1999; 14 (Pt 2):217-20.

Montero R, Ostrosky P. Genotoxic activity of praziquantel. *Mutat. Res.* 1997; 387: 123-139.

Morel Y, Barouki R. Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (Pt 41):26969-26976.

Morgan ET. Down-regulation of multiple cytochrome P450 gene products by inflammatory mediators *in vivo*: Independence from the Hypothalamo-Pituitary axis. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45 (Pt 2):415-419.

Morgan ET. Regulation of Cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metabol. Rev.* 1997; 29 (Pt 4):1129-1188.

Morgan ET. Regulation of cytochrome P450 by inflammation mediators: why and how? *Drug Metab. Dispos.* 2001; 29 (Pt 3):207-212.

Morgan ET, Li-Masters T, Cheng PY. Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology* 2002; 181-182:207-210.

Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato SI, Shimada H et al. Evaluation of the rodent micronucleous assay in the screening of IARC carcinogenesis (Group 1, 2A and

2B): The summary report of the 6<sup>th</sup> collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS; *Mutat. Res.* 1997; 389:3-122.

Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. Regulation, function and tissue specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001; 41:297-316.

Nelson DR. Cytochrome P450 Nomenclature. *Methods Mol. Biol.* 1998; 107:15-24.

Norppa H, Falck GCM. What human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003; 540:153-163.

OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guideline for the testing of Chemicals- Mammalian Erythrocyte Micronucleous Test; N° 474, 1997.

OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals: Draft proposal for a new guideline 487: In Vitro Micronucleus Test. OECD. 2004.

Oguri K, Yamada H, Yoshimura H. Regiochemistry of cytochrome P450 isozymes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994; 34:251-279.

Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 1962; 237: PC1375-PC1376.

Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 1964; 239 (Pt 7):2370-2378.

Omura T. Forty years of Cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999; 266:690-698.

Osada Y, Kumagai T, Masuda K, Suzuki T, Kanazawa T. Mutagenicity evaluation of *Schistosoma* spp. extracts by the umu-test and V79/HGPRT gene mutation assay. *Parasitol. Int.* 2005; 54(Pt 1):29-34.

Palmer G, Reedijk J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB): Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1060(3):599-611.

Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klaassen CD, organizador. Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons. Nova Yorque, McGraw-Hill, 2001. p. 133-224.

Petney TN. Environmental, cultural and social changes and their influence on parasite infections. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31:919-932.

Phillip M, Rowley D, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer Biol.* 2004; 14:433-439.

Pitot III HC and Dragan YP. Chemical Carcinogenesis *In: KLAASSEN C. D. Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons.* 6<sup>a</sup> ed., Nova Yorque: McGraw-Hill; 2001.

Plant N. Cytochrome P-450. In: Plant N. *Molecular Toxicology.* Portland: Bios Scientific Pub Ltd; 2003. p. 209-249.

Ponggese G e Feldmeier H. Female genital schistosomiasis: facts and hypotheses. *Acta Trop.* 2001; 79:193-210.

Quinnel RJ. Genetics of susceptibility to human helminth infection. *Int. J. Parasitol.* 2003; 33: 1219-31.

Renton KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 2001; 92:147-163.

Rosin M, Anwar W. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. *Int. J. Cancer* 1992; 50:539-543.

Rosin MP, Saad el Din Zaki S, Ward AJ, Anwar WA. Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. *Mutat. Res.* 1994; 305:283-92.

Roy P, Yu LJ, Crespi CL, WaxmanDJ. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver p-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal p-450 profiles. *Drug Metabol. Dispos.* 1999; 27 (Pt 6):655-666.

Santos BF Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A (org) *Animais de Laboratório – criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz; 2002. p.115-118.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 1975; 19 (Pt 1):9-15.

Shaw ME, Elder PA, Abbas A, Knowles MA. Partial Allelotype of schistosomiasis-associated bladder cancer. *Int. J. Cancer* 1999; 80:656-661.

Sheweita AS, Mangoura AS, El-Shemi AG. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection induce changes in drug-metabolizing enzymes. *J. Helmintol.* 1998; 72:71-77.

Sheweita AS, El-Maati MRA, El-Shahat FG, Bazeed MA. Changes in the expression of cytochrome P450 2E1 and the activity of carcinogen-metabolizing enzymes in *Schistosoma haematobium*-infected human bladder tissues. *Toxicology* 2001; 162:43-52.

Sheweita AS, Mubark J, Doenhoff MJ, Mostafa MH, Marginson GP, O'Connor PJ, et al. Changes in the expression of cytochrome P450 isozymes and related carcinogen metabolizing enzyme activities in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Helmintol.* 2002; 76:71-78.

Sheweita AS, El-Shahat FG, Bazeed MA, El-Maati MRA, O'Connor PJ. Effects of *Schistosoma haematobium* infection on drug-metabolizing enzymes in human bladder cancer tissues. *Cancer Lett.* 2004; 205:15-21.

Silva LM, Menezes RM, de Oliveira SA, Andrade ZA. Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 36 (Pt 3): 335-341.

Silva LM, Oliveira CN, Andrade ZA. Experimental neuroschistosomiasis – Inadequacy of the murine model. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2002; 97 (Pt 4): 599-600.

Silva-Teixeira DN, Contigli C, Lambertucci JR, Serufo JC, Rodrigues-Jr V. Gender-Related Cytokine Patterns in Sera of Schistosomiasis Patients with Symmers' Fibrosis. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2004; 11 (Pt 3):627-630.

Sripa B. Pathobiology of opistorchiasis: an update. Acta Trop. 2003; 88(Pt 3):209-20.

Tekwani BL Shukla OP, Ghatak S. Altered drug metabolism in parasitic diseases. Parasitol. Today 1988; 4 (Pt 1):4-10.

Thompson SN, Kavaliers M. Physiological bases for parasite induced alterations of host behaviour. Parasitology 1994; 109 Suppl:S119-S138.

Williams DA. Drug metabolism. In: Foye WO, oragnizador. Principles of medicinal chemistry. Filadélfia: Williams & Wilkins; 1995. p. 83-139.

World Health Organisation (WHO). Research and Training in Tropical Diseases website (<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/diseaseinfo.htm>). Acessado em 17 de julho de 2005.

World Health Organisation (WHO). Progress 2001-2002: sixteenth program report; 2001; (<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr16/pr16.pdf>) Acessado em 17 de julho de 2005.

Xiao S, You J, Mei J, Hu Y, Zhou D, Catto BA. In vitro and in vivo effect of levopraziquantel, dextropraziquantel versus racemic praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma japonicum*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 1998;16(Pt 5):335-41.

Ximenes R, Southgate B, Smith PG, Guimaraes Neto L. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in an urban area in the Northeast of Brazil. *Rev. Panam. Salud Pública* 2003; 14 (Pt 6):409-21.