

BIOQUÍMICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.

V — ATIVIDADE MITOCONDRIAL EM FIGADOS E RINS DE SAGÜIS (*CALLITRIX PENICILLATA*) INFESTADOS PELO *SCHISTOSOMA MANSONI**

Luiz Erlon A. Rodrigues **
Maria de Fátima D. Costa **
Roberto José M. Nascimento **
Túfio Miráglia **

RODRIGUES, L. E. A. et al. Bioquímica da esquistossomose mansônica. V — Atividade mitocondrial em figados e rins de sagüis (*Callitrix penicillata*) infestados pelo *Schistosoma mansoni*. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 17:130-7, 1983.

RESUMO: Foram estudadas mitocôndrias isoladas de figados e rins de sagüis (*Callitrix penicillata*) infestados pela inoculação de 200 cercárias e entre 80 e 100 dias de infecção, nos aspectos relativos às suas atividades respiratórias endógenas, bem como frente ao succinato e ao α ceto glutarato de sódic. Cada experiência foi acompanhada de controle, usando-se mitocôndrias isoladas de figados e rins de animais não infectados. As medidas das atividades respiratórias foram efetuadas polarograficamente e expressas em microlitros de oxigênio consumidos por miligrama de proteínas totais por minuto. Os resultados mostraram que as respirações endógenas das mitocôndrias isoladas dos animais infectados foram sempre maiores do que aquelas observadas nos controles. Detectou-se um estímulo para o fígado de 217% e para o rim de 84%. O succinato de sódio estimulou em 85% a respiração das mitocôndrias dos figados dos animais controles, enquanto a inibiu de 39% nos infectados. Com referência aos rins, este mesmo substrato estimulou a referida respiração tanto nos controles quanto nos infectados, em 89% e 94% respectivamente. O α ceto glutarato estimulou as mitocôndrias hepáticas isoladas dos controles em 48% e as renais em 84%. Nos animais esquistossomóticos ou ele não modificou a capacidade respiratória mitocondrial como se observou para o rim, ou a inibiu de 58%, no caso do fígado. Os dados obtidos sugerem que o fígado sofre muito mais, em termos bioquímicos, com a esquistossomose mansônica do que os rins, pelo menos em nossas condições experimentais. As atividades do sistema enzimático succinato desidrogenase e do complexo α ceto glutarato desidrogenase permitiram identificar bioquimicamente, em nossos animais esquistossomóticos, vários graus de lesão celular, principalmente hepáticos, que vão desde os mais simples, decorrentes de modificações da físico-química dos sistemas de membranas, até os mais graves, tipo necrose.

UNITERMOS: Esquistossomose mansônica. Sagüi (*Callitrix penicillata*). Mitocôndria, fígado. Mitocôndria, rins.

* Parte deste trabalho foi realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Processo nº 40.2564/80.

** Do Departamento de Biofunção e de Biomorfologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia — 40000 — Salvador, BA — Brasil.

INTRODUÇÃO

Um dos parâmetros mais importantes para a avaliação de lesão celular, do ponto de vista bioquímico, é, sem dúvida, a medida da atividade respiratória de suas mitocôndrias.

Essas organelas, especializadas no metabolismo oxidativo, se constituem na principal fonte de energia imediata ou acumulada sob forma de ATP, disponível para a quase totalidade dos processos vitais da célula. Constituídas de dois sistemas de membranas e de uma matriz, onde se encontram dissolvidas várias enzimas do ciclo de Krebs e da lipólise de Lynen, têm, em sua membrana interna, os complexos enzimáticos responsáveis pela cadeia de transporte eletrônico, da fosforilação oxidativa do ADP, da oxidação do succinato, além de outros especializados no transporte de vários metabólitos³.

Tais partículas são extremamente susceptíveis às mínimas variações da fisiologia celular. Modificações do pH, da osmolaridade, da oxigenação, do aporte das mais diferentes substâncias para o citoplasma, podem ser acompanhadas de alterações do metabolismo respiratório mitocondrial.

Já está bem estabelecido que as lesões hepáticas e renais observadas na esquistossomose mansônica humana, após o octagésimo dia de infecção, variam enormemente de acordo com relações hospedeiro-parasita, além dos efeitos que os próprios vermes e/ou ovos vivos ou mortos, são capazes de induzir, química, mecânica e imunologicamente, no hospedeiro. Segundo Raso e Bogliolo¹⁰ (1970), na forma mais comum da esquistossomose mansônica hepato-esplênica, conhecida como forma de Symmers, as lesões fundamentais do fígado são quase exclusivas dos ramos da veia porta, da rede periductal e do conjuntivo que a circunda. Os hepatócitos, as células de Kupffer, os sinusóides e os lóbulos em geral não são atingidos pelo processo. No entanto, sofrem

suas conseqüências de modo secundário. Ovos vivos ou mortos podem penetrar nos pequenos ramos da rede periductal, ocluindo muitos deles e desencadeando a formação de granulomas intravasculares, com a conseqüente interrupção do fluxo portal a esse nível e alteração da circulação intralobular. Todo esse processo é sempre acompanhado de uma inflamação crônica granulomatosa². Os vermes carregados pela corrente embolizam e ocluem ramos de maior calibre e, quando mortos, produzem lesões, algumas vezes extensas, inicialmente necróticas, depois inflamatórias e por fim cicatriciais¹. Devido à trombose portal e ao distúrbio da circulação, os hepatócitos dos lóbulos circundantes podem entrar em atrofia, de acordo com as observações de Raso e Bogliolo¹⁰ (1970).

Quanto às alterações renais, Lima⁵ descreveu um quadro de nefrite intersticial focal, com espessamentos focais da membrana basal dos glomérulos e fenômenos degenerativos do epitélio tubular em portadores da forma hepato-esplênica da esquistossomose mansônica. Fica justificado, diante do exposto, o estudo do metabolismo respiratório mitocondrial como um dos parâmetros bioquímicos de grande valia na determinação do grau de comprometimento celular, nesta parasitose.

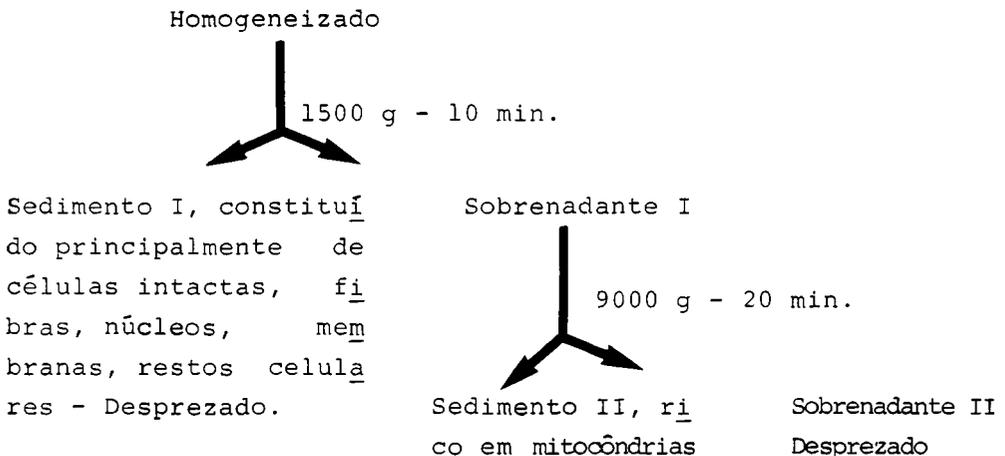
O complexo enzimático, 2 oxoglutarato: lipoato óxido redutase (decarboxilante) 1.2.4.2 — alfaceto glutarato desidrogenase e a succinato: acceptor óxido redutase 1.3.99.1 — succinato desidrogenase foram usados na avaliação da fisio-bioquímica das mitocôndrias. A escolha desses dois sistemas enzimáticos se justificou por serem ambos marcadores mitocondriais e por estarem intimamente relacionados com o ciclo de Krebs — Johnson — Szent Györgyi e, por seu intermédio, com o metabolismo respiratório e de fosforilação oxidativa mitocondrial³.

Finalmente, a condição de primata foi determinante na escolha do sagüi (*Callitrix penicillata*) como animal de experimentação. Segundo Neves ⁸, a reprodução experimental das formas crônicas da esquistossomose mansônica, observadas no homem, principalmente as formas h pato-esplênica (fibrose tipo Symmers), intestinal (hiperplásica) e a c rdio-pulmonar, em animais de laboratório,   difícil e problemática, principalmente devido às relações hospedeiro-parasita, de caráter imunológico. Contudo Lichtenberg e Sadun ⁴, conseguiram reproduzir experimentalmente no chimpanzé, lesões semelhantes àquelas da forma de Symmers.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram efetuadas 40 medidas da atividade respiratória mitocondrial usando-se sagüis, adultos *ad libitum*, pesando entre 160 g e 172 g, infectados pela inoculação de 200 cercárias por animal, na tela subcutânea da coxa entre 80 e 100 dias de infecção. Dez experiências controles foram efetuadas usando-se animais idênticos porém não infectados. Esses animais foram sacrificados por traumatismo cervical, sem o emprego

de anestesia e deles foram retirados os fígados e os rins. Após uma rápida verificação macroscópica desses órgãos, eles foram seccionados separadamente em pequenas porções e então lavadas em solução tamponada a pH 7.4, de sacarose 25×10^{-2} M. Uma dessas porções foi utilizada para o controle histológico dos graus de lesões hepáticas ou renais. Os fragmentos restantes foram ressuspensos na proporção de uma grama para dez mililitros, de uma solução tamponada a pH 7.4 e refrigerada a 2 C, apropriada para a preservação das mitocôndrias, durante um período de até seis horas ⁷. Esta solução   constituída de D-manitol 25×10^{-2} M, fosfato dissódico 5×10^{-3} M, fosfato monopotássico 5×10^{-3} M, TRIS (hidroximetil aminometano — TRIS 5×10^{-2} M, cloreto de potássio 5×10^{-2} M, e etilenodiamina tetra e acetato de sódio-EDTA 2×10^{-4} M. Ainda nessa solução, as porções de fígado ou rim foram homogeneizadas em aparelho de Potter-Elvehjem com êmbolo de teflon, a uma velocidade de 250 rpm, por um máximo de 2 min ¹¹. O homogeneizado assim obtido, foi submetido ao seguinte esquema de centrifugação refrigerada a 2 C, para a separação da fração rica em mitocôndrias.



O sedimento II, constituído especialmente de mitocôndrias, foi ressuspenso na mesma solução tamponada para um volume idêntico ao do homogeneizado inicial e usado para as avaliações das atividades mitocondriais.

As medidas de consumo de oxigênio, foram efetuadas polarograficamente, segundo uma modificação da técnica descrita por Rodrigues e col.¹³ (1980). Foram colocadas na cubeta de reação do polarógrafo, 2,8 ml da suspensão de mitocôndrias, e, sob agitação constante, esperou-se o equilíbrio da temperatura em 37°C, após o que grafou-se por um período de 3 a 5 min. o consumo endógeno, isto é: a respiração mitocondrial, na ausência de substrato adicionado. No fim desse tempo, foram adicionados 0,2 ml do substrato, succinato ou α ceto glutarato de sódio, ambos a $3,3 \times 10^{-3}$ M, para a observação de seus efeitos. As determinações das proteínas totais de cada amostra, que permitiram os cálculos das atividades respiratórias relativas, expressas em microlitros de oxigênio consumidos por miligrama de proteínas por minuto de experiência, foram efetuadas pela técnica descrita por Lowry e col.¹¹ (1961).

Fragmentos de fígados e rins separados para o estudo histopatológico foram fixados em formalina a 10%, incluídos em parafina, reduzidos a cortes de 5 micrometros e corados pela hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

A Fig. 1 expressa as atividades respiratórias endógenas das mitocôndrias isoladas dos fígados de sagüis normais e esquistossomóticos, assim como frente ao succinato e ao α ceto glutarato de sódio. Dados semelhantes para os rins são representados na Fig. 2.

Comparando-se os valores das respirações endógenas, em cada órgão separadamente, notamos que este tipo de respiração, na ausência de substrato adicionado, é sempre maior nas mitocôndrias isoladas dos animais

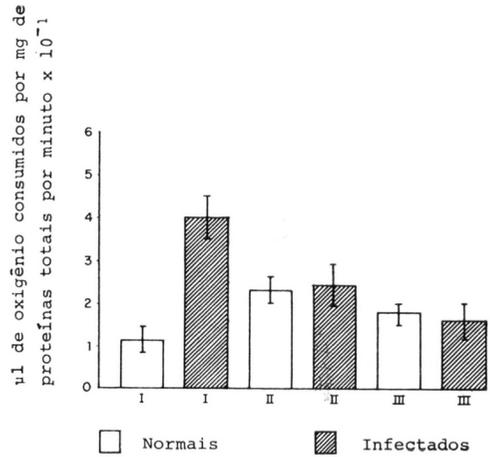


Fig. 1 — Efeito do succinato e do α ceto glutarato sobre a atividade mitocondrial em fígados de sagüis normais e infectados pelo *S. mansoni*. I — Respiração na ausência de substrato adicionado. II — Na presença de succinato de sódio. III — Na presença de α ceto glutarato de sódio.

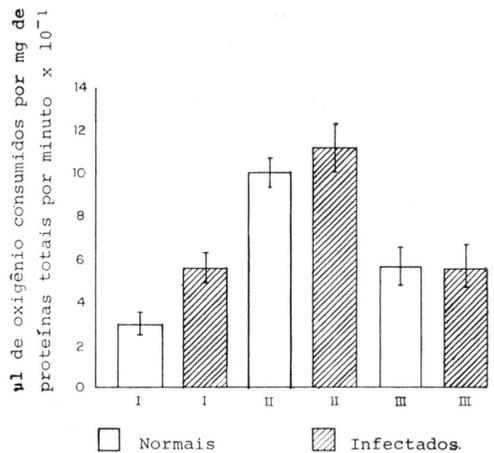


Fig. 2 — Efeito do succinato e do α ceto glutarato sobre a atividade mitocondrial em rins de sagüis normais e infectados pelo *S. mansoni*. I — Respiração na ausência de substrato adicionado. II — Na presença de succinato de sódio. III — Na presença de α ceto glutarato de sódio.

infetados que nos controles. Houve um aumento de 217% para os fígados e de 84% para os rins. O succinato de sódio adicionado às mitocôndrias hepáticas e renais dos animais controles estimulou suas respirações em 85 e 216%, respectivamente. Já o α ceto glutarato foi responsável por um estímulo bem menor, de 48% para os mitocôndrias dos fígados e de 84% para aquelas dos rins. Quando essas organelas intracelulares foram isoladas de fígados e rins de animais esquistossomóticos, nas condições de nossas experimentações, e estimulados pelo succinato e pelo α ceto glutarato, mostraram um comportamento bem diferente daquele observado nos controles. Assim, o succinato inibiu de 39% a respiração mitocondrial hepática, enquanto estimulou de somente 94%, a renal. O α ceto glutarato, ao contrário, não mostrou nenhum efeito sobre a respiração de mitocôndrias isoladas de rins de sagüis infetados enquanto que inibiu de 58% as hepáticas, nesses mesmos animais.

Voltando às atividades respiratórias, na ausência de substratos adicionados, notamos que os endógenos, tanto para os animais controles quanto para aqueles infetados experimentalmente pelo *S. mansoni*, nas nossas condições, são maiores para as mitocôndrias renais que para as hepáticas. Nos controles, o endógeno renal é 1,45 vezes maior que o hepático. Nos sagüis esquistossomóticos este fenômeno persiste, no entanto é de menor intensidade, isto é, 0,42 vezes maior.

As avaliações histológicas foram tomadas como padrões de medida da lesão hepática e renal nos animais infetados. A Fig. 3 mostra fotomicrografias típicas de lesões hepáticas encontradas nesses animais.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos confirmaram as observações de Rodrigues e col.¹⁴, em 1968 e por Rodrigues e Gaudenzi¹², em 1969. Esses investigadores, trabalhando com fígados de camundongos normais e infec-

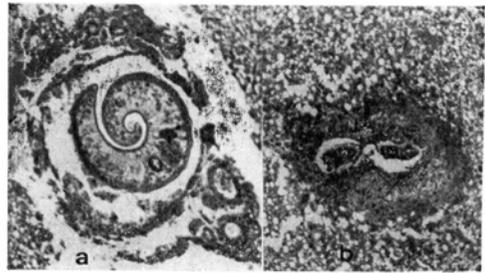


Fig. 3 — Cortes de fígado de *Callitrix penicillata* infetado pelo *S. mansoni* (x 80). a) Presença de verme em ramo da veia porta. b) Desenvolvimento de granuloma em torno de dois ovos do referido verme. Notar esteatose dos hepatócitos dispostos ao redor do granuloma.

tados pelo *S. mansoni*, notaram um aumento do metabolismo respiratório, frente a diversos substratos do ciclo de Krebs — Johnson — Szent Györgyi, com referência à homogeneizados livres de células hepáticas, oriundas de animais infetados.

As observações atuais, feitas com mitocôndrias isoladas de sagüis normais e esquistossomóticos, usando-se uma técnica polarográfica adaptada, bem mais sensível, mostraram que o estímulo ocorrido nos animais infetados foi maior no endógeno hepático, do que no renal. Tal estímulo pode ser explicado, em parte, pela maior população de células inflamatórias que acompanha a lesão esquistossomótica. A constatação de que o endógeno mitocondrial do rim é quase uma vez e meia maior que o hepático, talvez se prenda ao fato de que, anatomicamente, o rim é mais irrigado por sangue arterial do que o fígado, onde grande parte do sangue afluyente vem pela veia porta. Ainda neste órgão, segundo Junqueira e col.², a artéria hepática se ramifica continuamente formando as arteríolas interlobulares. Algumas irrigam os espaços portais e outras terminam diretamente nos sinusóides onde promovem misturas do sangue arterial, com o venoso do sistema porta. Apesar de aceitáveis, essas

explicações não são por si só isentas de críticas. A sugestão de um fator estimulador de respiração presente nas mitocôndrias isoladas dos fígados e dos rins dos animais infectados cresce de importância quando se sabe que, sendo os resultados expressos em atividade relativa, isto é, microlitros de oxigênio consumidos por miligrama de proteínas totais por minuto, uma maior população levaria a um aumento da taxa protídica e a uma conseqüente compensação da atividade relativa. A escolha dos substratos, succinato e α ceto glutarato de sódio deve-se ao fato de que os sistemas enzimáticos, responsáveis por seus metabolismos oxidativos, são exclusivos das mitocôndrias e, portanto, mapeadores dessas organelas. A succinato desidrogenase é uma flavoproteína de peso molecular em torno de 200.000 daltons, intimamente ligada à ubiquinona e ao citocromo b. Participa da constituição da membrana interna e representa uma das entradas mais ativas da cadeia respiratória mitocondrial. Por fazer parte do sistema membranal, serve como um sensível indicador das mínimas alterações da físico-química das mitocôndrias e, por extensão, da própria fisiologia celular.

O complexo α ceto glutarato desidrogenase é bem mais complicado. Com um peso molecular em torno de 6 milhões de daltons, é representado por uma estrutura protéica do tipo pentenário, composta de 48 cadeias polipeptídicas, divididas igualmente entre as

três enzimas fundamentais que o compõe. Encontra-se dissolvido na matriz mitocondrial e se constitui num excelente indicador bioquímico de lesões mais drásticas da célula, do tipo necrose, onde as mitocôndrias se desorganizam ao ponto de romperem suas membranas, com a conseqüente saída das enzimas contidas em seu interior.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, somos levados a concluir que o fígado sofre muito mais em termos bioquímicos com a esquistossomose mansônica que o rim, pelo menos em nossas condições experimentais. A observação dos efeitos concernentes ao succinato e ao α ceto glutarato em ambos os órgãos, leva a essa conclusão. Enquanto que nos rins dos animais esquistossomóticos o succinato continuou ativando o metabolismo respiratório mitocondrial e o α ceto glutarato, não estimulou, nem inibiu, no fígado, ambos substratos inibiram bastante a respiração endógena mitocondrial correspondente aos animais infectados. Tais dados estão de acordo com os diversos graus de lesão celular que se observam na fase hépato-esplênica da esquistossomose mansônica. Estão presentes, nesse quadro nosológico, desde as mínimas lesões celulares, caracterizadas por alterações físico-químicas dos sistemas de membranas, até as mais graves, tipo necrose.

RODRIGUES, L. E. A. et al. [Biochemistry of mansonic schistosomiasis. V — Mitochondrial activity in livers and kidneys of marmosets (*Callitrix penicillata*) infected with *Schistosoma mansoni*]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 17:130-7, 1983.

ABSTRACT: Mitochondria isolated from livers and kidneys of marmosets (*Callitrix penicillata*) which were infected with 200 cercariae were studied, not less than 80 but not more than 100 days after infection, with regard to their endogenous respiratory activities. Sodium succinate and α keto glutarate were used as substrates. Each experiment was compared with a control specimen, using isolated mitochondria of livers and kidneys from non infected animals. The measurement of the respiratory activity was made polarographically and expressed in microliters of oxygen consumed per milligram of total protein per minute. The results showed that the endogenous respiration of mitochondria isolated from infected animals was always greater than those observed in the control specimens. A stimulus of 217% to the liver and of 84% to the kidney were observed. The sodium succinate activated the respiration of the control livers approximately 85% and provoked an inhibition of 39% in the infected marmoset. Concerning the kidneys this same substrate stimulated both, about 84% and 94% respectively. The α keto glutarate stimulated the hepatic mitochondrial respiration approximately 48% and the renal respiration about 84%. In reference to the schistosomotic animals, the α keto glutarate did not modify the mitochondrial respiratory capacity of the kidney but did inhibit that of the liver by 58%. The data obtained from our experimental conditions suggest that the liver suffers, much more, in biochemical terms, from mansonic schistosomiasis, than do the kidneys. The activities of the succinate dehydrogenase system and of the α keto glutarate complex, permitted the biochemical identification of the different degrees of cellular lesions, mainly in the liver, in our schistosomotic marmosets. These lesions varied from the simplest ones, caused by physical-chemical modifications of the membrane systems, to the most serious ones, such as necrosis.

UNITERMS: Schistosomiasis. Callithricidae. Mitochondria, liver. Mitochondria, kidneys.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOGLIOLO, L. O portoradiograma post-mortem na esquistossomose mansônica hepato-esplênica. *Rev. Ass. med. bras.*, 2:379-85, 1956.
2. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. & CONTOPOULOS, A.N. *Basic histology*. 2nd ed. Los Altos, Calif., Lange Medical Publ., 1977.
3. LEHNINGER, A. *Principles of biochemistry*. New York, Ed. Worth Publishers, 1982.
4. LICHTENBERG, F.V. & SADUN, E.H. Experimental production of bilharzial pipe-stem fibrosis in the chimpanzee. *Exp. Parasit.*, 22:264-78, 1968.
5. LIMA, J.P.R. Estudo das chamadas lesões "ectópicas" na esquistossomose mansônica. I — Incidência geral. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8:167-72, 1966.
6. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
7. MARTINELLI, R.; RODRIGUES, L.E.A.; MACHADO, A.E.C. & ROCHA, H. The effect of acute uremia on the liver mitochondrial activity. *Nephron*, 17:155-60, 1976.
8. NEVES, J. Quadro Clínico. In: Cunha, A.S., ed. *Esquistossomose mansoni*. São Paulo, Ed. Sarvier, 1970. p. 131-91.

RODRIGUES, L.E.A. et al. Bioquímica da esquistossomose mansônica. V — Atividade mitocondrial em fígados e rins de sagüis (*Callitrix penicillata*) infestados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 17:130-7, 1983.

9. RASO, P. Lesões vasculares e intra hepáticas na forma hêpato-esplênica da esquistossomose mansônica. *Hospital*, Rio de Janeiro, 52:517-50, 1957.
10. RASO, P. & BOGLIOLO, L. Patologia. In: Cunha, A.S. ed. *Esquistossomose mansoni*. São Paulo, Ed. Sarvier, 1970. p. 79-130.
11. RODRIGUES, L.E.A.; COSTA, M.F.D.; SA, S. & NADER, N. Ação protetora *in vivo* do verapamil sobre lisossomas isolados de fígado de camundongos submetidos à intoxicação alcoólica crônica. *Rev. bras. Pesq. med. biol.*, 13:127-33, 1980.
12. RODRIGUES, L.E.A. & GAUDENZI, T.F. Estudo bioquímico da esquistossomose mansônica hepática. Utilização de alguns substratos do ciclo cítrico em combinação com a L-arginina, por fígados de camundongos normais e infectados experimentalmente. *Gaz. med. Bahia*, 69(1):1-7 1969.
13. RODRIGUES, L.E.A.; MACHADO, A.E.C.; COSTA, M.F.D. & ARAUJO, I.M. Novo método para a determinação da atividade ceruloplasmínica nos líquidos biológicos. *Rev. bras. Pat. clin.*, 16:120-24, 1980.
14. RODRIGUES, L.E.A.; OLIVEIRA, U.R. & GAUDENZI, T.F. Estudo bioquímico da esquistossomose mansônica hepática. I — Relação hospedeiro-parasita na infecção experimental do camundongo. *Gaz. med. Bahia*, 68(2):61-9, 1968.

Recebido para publicação em 28/09/1982
Aprovado para publicação em 17/12/1982