

BIOQUÍMICA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA. VII – ALTERAÇÕES LIPÍDICAS DAS MEMBRANAS LISOSSÔMICAS DURANTE A FASE INICIAL DA AGRESSÃO HEPÁTICA

LUIZ ERLON ARAÚJO RODRIGUES

Departamento de Biofunção, Setor de Bioquímica, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 40140 Salvador, BA, Brasil

Biochemistry of schistosomiasis mansoni. VII – Changes of the lipidic composition of lysosomal membranes at the initial phase of liver injury – *Aiming at investigating the changes on the lipidic constitution of hepatic lysosomal membranes at the initial phase of schistosomotic damage, mice have been infected with 30 cercarias and employed for essays in the 30th day of infection. The triacylglycerols decreased from 220 ± 48 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of total proteins in the control mice, to 165 ± 22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in the infected ones. Similarly, the free cholesterol, also decreased from 539 ± 80 to 396 ± 54 $\mu\text{g}/\text{mg}$; the cholesterol esters from 270 ± 35 to 216 ± 36 $\mu\text{g}/\text{mg}$ and the phosphatidylcholines from $44 \pm 5,7$ to $31 \pm 4,9$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. The phosphatidylserines the phosphatidylethanolamines and the sphingomyelins increased, respectively from $58 \pm 9,7$ to $60 \pm 8,5$, from $72 \pm 7,8$ to $111 \pm 15,7$ and from $36 \pm 4,9$ to $63 \pm 7,1$ $\mu\text{g}/\text{mg}$. The free fatty acids showed no statistical significance on their variations. They varied from $1,7 \pm 0,25$ $\mu\text{Eq}/\text{g}$ in the controls to $1,8 \pm 0,39$ $\mu\text{Eq}/\text{g}$ in the infected animals. These results indicated that in the initial phase of hepatic schistosomiasis, before the formation of granulomas, important changes on the lipidic constitution of lysosomal membranes can be detected. It seems that they are provoked by the catabolic excreted by immature or adult worms of *Schistosoma mansoni* present in the portal vein system.*

Key words: schistosomiasis mansoni – lysosomal membranes – lipidic composition of lysosomes – pre-egging phase

Na fase pré-postural da infecção esquistossomótica, podem ser detectados focos inflamatórios no fígado, disseminados, com infiltrado celular predominantemente eosinofílico, intralobular e periportal. Algumas vezes, esta reação inflamatória é acompanhada de fenômenos regressivos graves dos hepatócitos, até mesmo com focos de necrose, com ou sem relação com a presença de esquistossômulo (Raso & Bobliolo, 1970).

Desde 1968, Rodrigues et al., demonstraram que o comportamento bioquímico em camundongos infectados por cem cercárias e com 45 dias de infecção era estatisticamente diferente dos controles, devido principalmente ao estímulo da biossíntese protéica e ao aumento do consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas.

O complexo lisossômico está, segundo Wiloughby (1978), ligado aos mais diversos fenômenos de defesa celular, destacando-se os de origens inflamatórias e imunológicas.

Baxter & Suelter (1983), demonstraram que o conteúdo enzimático destas partículas era capaz de hidrolisar, virtualmente, todas as macromoléculas biossintetizadas, e que estava preservado por um complexo membranoso da estrutura lipoprotéica.

Kangilaski (1981) e Rodrigues & Galle (1985) descreveram vários agentes capazes de modificar fisicoquimicamente, ou mesmo romper essas membranas, permitindo a saída dos componentes intralisossômicos e, contribuindo para o desenvolvimento ou manutenção dos processos inflamatórios.

Neste trabalho são estudadas as alterações na constituição lipídica das membranas dos diversos componentes do comportamento lisossômico hepático, durante a fase pré-postural da infecção esquistossomótica, com o intuito de se contribuir para um melhor entendimento do significado desta fase.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados dois grupos de 25 camundongos albinos, de ambos os sexos, normalmen-

te alimentados e mantidos sob condições semelhantes de umidade, temperatura, iluminação e ingestão hídrica. Um dos grupos foi usado como controle e o outro, infectado com 30 cercárias do *Schistosoma mansoni*, segundo a técnica descrita por Standen (1949). Esta infecção, efetuada nos camundongos ainda jovens, pesando em média 18 g, foi executada no Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (FIOCRUZ – Salvador).

Todos os animais constituintes do grupo controle e do infectado, com 30 dias de infecção, foram mortos por traumatismo craniano, sem emprego de anestesia. Seus fígados foram imediatamente retirados e colocados, separadamente, em solução tamponada de sacarose 25×10^{-2} M, pH 7.4 e entre 2 a 4°C. De cada um deles foi retirada uma pequena porção para a avaliação histológica de que não estavam sujeitos a qualquer outra doença hepática.

Cada órgão, depois de separado da vesícula biliar, foi picotado na mesma solução e lavado diversas vezes para a retirada, no máximo possível, do sangue. Em seguida os fragmentos foram separadamente ressuspensos na proporção de 1/10, em nova solução tamponada a pH 7.4 e a 2°C, especialmente adaptada para a separação de orgânulos celulares por Voss et al. (1963), e homogeneizados em aparelhos de Potter Elvehjem a 250 rpm, num tempo máximo de 2 min, em banho de gelo fundente.

A fração rica em lisossomos e partículas correlatas, correspondente a cada fígado, foi isolada por centrifugação fracionada e refrigerada a 2°C, no sedimento de $32.000 \times g$, durante 20 min, segundo a técnica proposta por Rodrigues et al. (1968).

Os fragmentos de membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico foram isolados por nova centrifugação a $32.000 \times g$ durante 20 min, a partir do lisado lisossômico, efetuado pela suspensão em água destilada, do sedimento rico nessas partículas, congelado a -20°C e descongelado por duas vezes sucessivas. Segundo de Duve et al. (1961), estes dois fatores físicos, representados pelos choques hipo-osmótico e térmico, são capazes de desintegrar a totalidade dos lisossomos, sem modificações de sua constituição bioquímica. Após duas lavagens consecutivas com água destilada, os fragmentos membranosos obtidos foram usados para a extração e dosagem dos seus componentes lipídicos estruturais. Utilizou-se a técnica

descrita por Bligh & Byer (1970), ligeiramente adaptada, onde cada amostra de membranas foi ressuspensa em água destilada, para o mesmo volume do homogeneizado inicial, e transferida para um homogeneizador, tipo "waring blender", acrescida de volume idêntico ao seu, de clorofórmio e metanol e, em seguida, homogeneizada em duas sessões de 30 segundos. Logo em seguida à homogeneização, todo o conteúdo foi transferido para um funil de separação de 250 ml. A transferência de todo o material foi assegurada pela lavagem da câmara de homogeneização com um volume de álcool metílico, igual ao antes utilizado. Depois de submeter o conjunto de extração, a agitação por 5 min, o mesmo foi colocado em repouso para a separação das fases clorofórmicas e metanol-aquosa. Esta última contém os componentes hidrossolúveis, representados em sua maioria pelas proteínas constitutivas das membranas, enquanto que a clorofórmica contém, segundo Bligh & Byer (1970), praticamente todos os lipídios. Cada fase clorofórmica foi transferida para um frasco de boca larga, identificado com as características do animal de onde resultou e levado para uma estufa com aeração forçada, onde todo o clorofórmio foi evaporado, sob uma temperatura mantida em 60°C , ligeiramente inferior àquela do seu ponto de ebulição. Este procedimento evitou que os lipídios fossem hidrolisados ou sofressem alterações físico-químicas detectáveis.

As amostras resultantes foram suspensas em 5 ml de clorofórmio e usadas para as avaliações bioquímicas dos lipídios totais (Muldner et al., 1962), triglicerídios (Rice, 1970), ácidos graxos livres (Dole, 1976), colesterol total (Delsal, 1954), ésteres do colesterol (Faure, 1954) e dos fosfolipídios totais (Ellefson & Caraway, 1976). Os etanolaminafosfatídios, serinafosfatídios, colinafosfatídios e esfingofosfatídios, fosfolipídios mais expressivos qualitativa e quantitativamente em outros complexos membranosos a exemplo das membranas plasmáticas, mitocondriais, nucleares, do aparelho de Golgi e retículo endoplasmático, foram dosados por cromatografia de camada fina em suporte de sílica gel H, de acordo com a técnica descrita por Skipski et al. (1970). A avaliação quantitativa dos fosfolipídios foi feita através da planimetria de cada mancha isoladamente e os resultados relacionados às proteínas totais, contidas no sedimento original das membranas do comportamento lisossômico, dosadas pela técnica proposta por Lowry et al. (1951).

RESULTADOS

A Tabela resume os resultados, estatisticamente tratados e correspondentes aos fígados dos animais controles e com 30 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Todos eles foram expressos em microgramas do lipídio em questão, por miligrama de proteínas totais, presentes em cada amostra de membranas lisossômicas analisada. No caso específico dos ácidos graxos livres eles foram expressos em normalidade, correlacionada com as proteínas totais ($\mu\text{Eq}/\text{mg}$).

Os triglicerídios variaram de $220 \pm 48 \mu\text{g}/\text{mg}$ nos controles para $165 \pm 22 \mu\text{g}/\text{mg}$ nos infectados, com 35 dias de duração da infecção. Essa diminuição do teor de triglicerídios presentes nas membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, na fase inicial da infecção foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e corresponde em termos médios, a um valor 25% menor que o encontrado nos controles.

No que se refere aos teores de colesterol e dos colesterolesterídios, os resultados obtidos para o grupo dos infectados mostraram uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$), tanto do colesterol total quanto dos seus ésteres e, por extensão, também do colesterol livre, quando comparados com o dos controles.

O colesterol total passou de $539 \pm 80 \mu\text{g}/\text{mg}$ nos controles, para $396 \pm 54 \mu\text{g}/\text{mg}$ nos infectados. Isto corresponde a um decréscimo de 27%. Os ésteres do colesterol apresentaram 20% de decréscimo. Passaram de $270 \pm 35 \mu\text{g}/\text{mg}$ nos controles, para $216 \pm 36 \mu\text{g}/\text{mg}$. O índice de esterificação, nos dois grupos, permaneceu, praticamente inalterado, em torno de 50%.

As pequenas variações observadas entre os grupos controle e infectado, relativas às concentrações de ácidos graxos livres, expressas em microequivalentes-grama por miligrama de proteínas totais, não foram significativas.

Os valores achados para os lipídios totais, dosados nas membranas lisossômicas isoladas de fígados dos animais controles, $700 \pm 156 \mu\text{g}/\text{mg}$, não foram estatisticamente diferentes daqueles encontrados para os animais com 30 dias de infecção esquistossomótica, $645 \pm 122 \mu\text{g}/\text{mg}$.

A Figura expressa os resultados encontrados para os fosfolipídios analisados e referentes aos grupos controle e infectado. Nos animais controles, os etanolaminafosfatídios contribuem para a constituição desses complexos de membranas, com teores 24% maiores que os serinafosfatídios e 61% maiores que os colinafosfatídios. Essas diferenças foram todas dignificantes.

TABELA

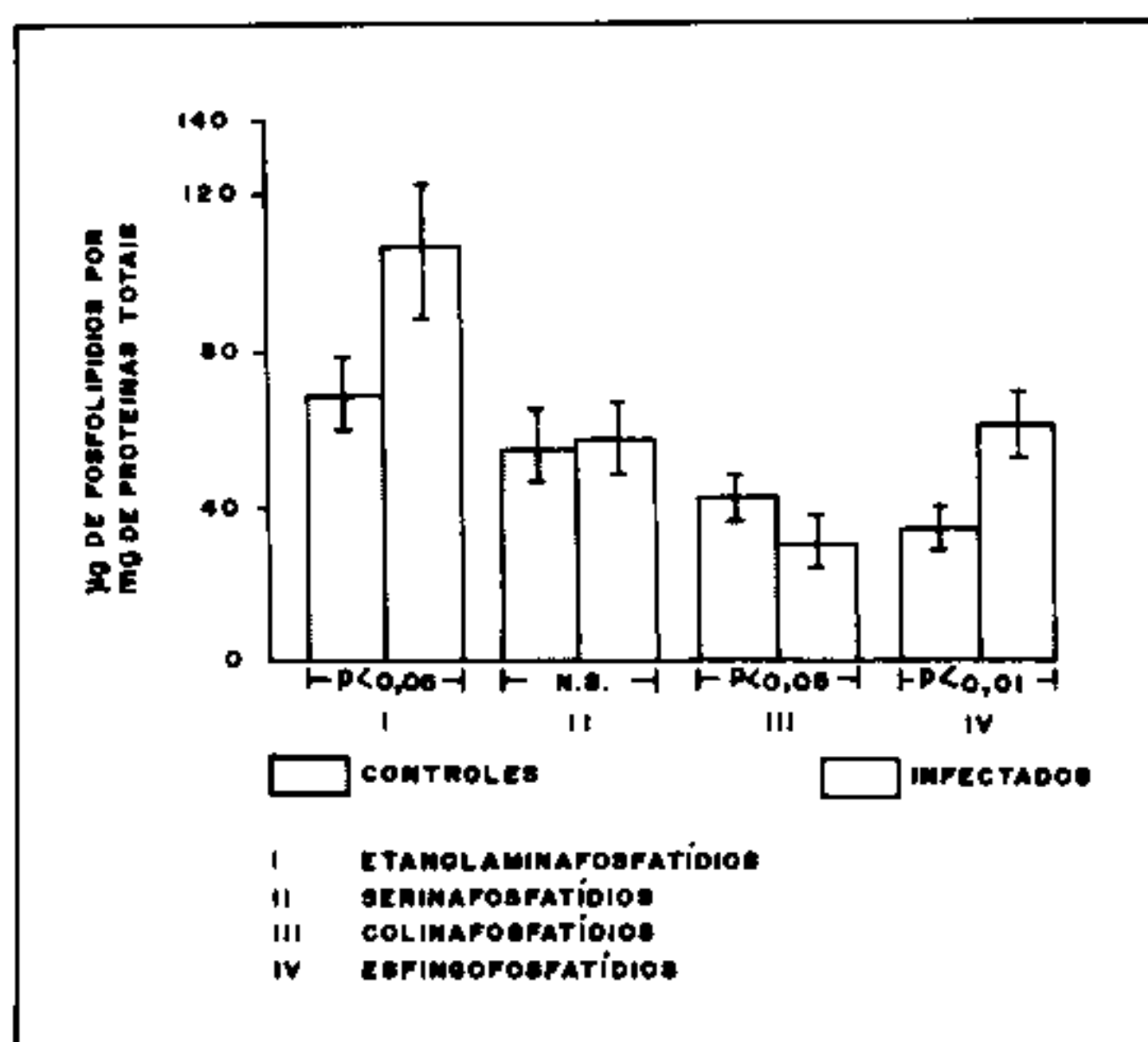
Variações dos teores lipídicos nas membranas dos lisossomos isolados de fígados de camundongos controles e com 30 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni*

Tipos de lipídios	Resultados expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas totais na amostra analisada	
	Controles	Infectados
Triglicerídios	220 ± 48	165 ± 22 $p < 0,05$
Colesterol total	539 ± 80	396 ± 54 $p < 0,05$
Ésteres do colesterol	270 ± 35	216 ± 36 $p < 0,05$
Lipídios totais	700 ± 156	645 ± 122 N. S.
Ácidos graxos livres em $\mu\text{Eq}/\text{mg}$	$1,7 \pm 0,35$	$1,8 \pm 0,39$ N. S.

N. S. = Não significante estatisticamente.

As membranas lisossômicas dos animais controles possuem 32% mais serinafosfatídios do que colinafosfatídios. Somando-se os valores encontrados para os três tipos de glicerofosfatídios, correspondentes ainda aos animais controles, chegou-se à conclusão que as membranas lisossômicas, isoladas de fígado desses animais, possuem 3,8 vezes mais de substâncias pertencentes a este grupo que de esfingofosfatídios.

As membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, isoladas de fígados de animais com 30 dias de infecção, mostraram uma concentração 54% maior em etanolaminafosfatídios do que aquelas isoladas dos controles. Este aumento foi significativo e da ordem de $p < 0,05$. O aumento de 75% verificados com esfingofosfolipídios foi altamente significativo, $p < 0,01$. Enquanto os serinafosfatídios, estatisticamente, não variaram, os colinafosfatídios diminuíram de 30%. Esta diminuição, sempre relacionada com os controles, foi estatisticamente significativa, $p < 0,05$.



Variações dos teores de fosfolipídios nas membranas dos lisossomos isolados de fígados de camundongos controles e com 30 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

DISCUSSÃO

Rodrigues (1984), demonstrou que a integridade funcional dos complexos de membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, em fígados de camundongos infectados por 100 cercárias do *S. mansoni*, estava bastante alterada após os primeiros 45 dias após exposição cercariana e que esta alteração estava, por sua vez, relacionada ao aumento da labilida-

de das membranas lisossômicas e diretamente ligada ao tempo de infecção.

Aquele achado experimental é bastante sugestivo e parece indicar que a maior fragilidade dos lisossomos em animais infectados pelo *S. mansoni*, pode estar correlacionada com modificações na constituição lipídica das membranas desses orgânulos. Os resultados atuais mostraram que os triacilglicerois, por exemplo, tiveram seus teores diminuídos durante os primeiros 30 dias de infecção. Esta variação, para menos, parece concordante com o aumento do consumo de oxigênio verificado em mitocôndrias isoladas de fígado de animais nessa fase da infecção esquistossomótica (Rodrigues et al., 1968). Possivelmente, este tipo de lipídio de reserva é utilizado bioenergicamente durante esta fase de estímulo respiratório e de biossíntese protéica, contribuindo para uma diminuição dos seus teores nas membranas lisossômicas decorrente do "turnover" de que estas participam, principalmente, com o citoplasma.

O aumento da labilidade da membrana dos componentes do complexo lisossômico, no caso específico da esquistossomose mansônica, parece ligado à presença de substâncias catabólicas liberadas pelos vermes imaturos e/ou ovos, ou ainda, pelo menor aporte de oxigênio dissolvido, decorrente do infiltrado inflamatório que se estabelece como também, possivelmente, por alterações nos sinusóides hepáticos.

Vários mecanismos tentam explicar as variações de estabilidade por que passam as diversas membranas do compartimento lisossômico, quando submetidos aos mais diferentes estímulos físicos, químicos e biológicos. Raz & Goldman (1976), sugeriram que o aumento na permeabilidade das membranas estaria ligado a fenômenos osmóticos os quais promoveriam a entrada de substâncias de baixo peso molecular para o interior lisossômico. Isto talvez ajudasse a explicar o aumento da pinocitose de lipídios de baixo peso molecular, principalmente os ácidos graxos livres e triglicerídios, pelos lisossomos, nos períodos iniciais do envolvimento hepático na esquistossomose mansônica.

Finalmente, parece válido supor que o desequilíbrio bioquímico que se estabelece entre os diferentes lipídios que contribuem para a constituição das membranas dos diversos componentes do compartimento lisossômico, pode explicar, em parte, a participação desses orgânulos,

mesmo na fase inicial da esquistossomose mansônica hepática. O aumento na fragilidade de suas membranas é sempre acompanhado da saída de parte do seu conteúdo e, conseqüentemente, do estabelecimento e/ou manutenção do processo inflamatório.

Os resultados experimentais obtidos permitem, portanto, conjecturar sobre o emprego terapêutico de drogas com propriedades estabilizadoras das membranas do compartimento lisossômico, a exemplo dos corticosteróides e outras (Rodrigues, 1986), desde a fase inicial da infecção esquistossomótica, contribuindo talvez, para uma resposta inflamatória menos intensa ao nível do fígado.

RESUMO

Bioquímica da esquistossomose mansônica. VII – alterações lipídicas das membranas lisossômicas durante a fase inicial da agressão hepática – Com o intuito de se estudarem as alterações nos teores lipídicos, constituintes das membranas lisossômicas, em fígados, durante a fase inicial da agressão esquistossomótica, foram utilizados camundongos infectados com 30 cercárias e 30 dias de infecção. Os triaglicéridos passaram de $220 \pm 48 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas totais nos controles, para $165 \pm 22 \mu\text{g}/\text{mg}$, nos infectados. Na mesma ordem também diminuíram o colesterol livre de 539 ± 80 , para $396 \pm 54 \mu\text{g}/\text{mg}$; os ésteres do colesterol de 270 ± 35 , para $216 \pm 36 \mu\text{g}/\text{mg}$ e os colinafosfatídios de $44 \pm 5,7$ para $31 \pm 4,9 \mu\text{g}/\text{mg}$. Os serinafosfatídios, os etanolaminafosfatídios e os esfingofosfatídios aumentaram, respectivamente de $58 \pm 9,7$ para $60 \pm 8,5$, de $72 \pm 7,8$ para $111 \pm 15,7$ e de $36 \pm 4,9$ para $63 \pm 7,1 \mu\text{g}/\text{mg}$. Os ácidos graxos livres não se alteram significativamente, passaram de $1,7 \pm 0,35 \mu\text{Eq}/\text{g}$, nos controles, para $1,8 \pm 0,29 \mu\text{Eq}/\text{g}$ nos animais infectados. Esses resultados parecem indicar que na fase inicial de esquistossomose mansônica hepática, antes da formação dos granulomas, são detectadas alterações importantes na constituição lipídica das membranas do compartimento lisossômico. Elas, talvez, sejam devidas a produtos catabólicos, excretados por vermes imaturos ou adultos, presentes em vasos do sistema portal.

Palavras-chave: esquistossomose mansônica – membranas lisossômicas – composição lipídica dos lisossomos – fase pré-postural

REFERÊNCIAS

- BAXTER, J. F. & SUETLER, C. H., 1983. Skeletal muscle lysosomes: comparison of lysosomes from normal and dystrophic avian pectoralis muscle e function of age. *Muscle & Nerve*, 6: 187-194.
- BLIGH, E. G. & DYER, W. J., 1970. The lipids. p. 302-361. In: *Fundamentals of clinical chemistry*. N. W. Tietz, ed. W. B. Saunders Comp. Philadelphia.
- De DUVE, C.; WATTIAUX, R. & WIBO, R., 1961. Effects of fat soluble compounds on lysosomes "in vitro". *Biochem. Pharmacol.*, 9: 97-116.
- DELSAL, J., 1954. Lipides du sang. p. 53-54. In: *Techniques de Laboratoire Chimie Clinique*. Vol. 2, J. Loiseleur, ed. Masson et Cie. Paris.
- DOLE, V. P., 1976. Fat acids in plasma. p. 494-496. In: *Fundamentals of clinical chemistry*. 2nd edition. N. W. Tietz, ed. W. B. Saunders Comp. Philadelphia.
- ELLEFSON, R. D. & CARAWAY, W. T., 1976. Lipids and lipoproteins. p. 474-483. In: *Fundamentals of clinical chemistry*. 2nd edition. N. W. Tietz, ed. W. B. Saunders Comp. Philadelphia.
- FAURE, M., 1954. L'analyse des lipides, identification et dosage de leur constituantes. p. 753-754. In: *Chimie physique et biologique*. Vol. I, J. Loiseleur, ed. Masson et Cie. Paris.
- KANGILASKI, J., 1981. Secrets of inflammation only partly revealed. *Med. News*, 246 (22): 2543-2544.
- LOWRY, D. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J., 1951. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MULDNER, H. G.; WHERETT, J. R. & CUMMINGS, J. N., 1962. Some applications of thin layer chromatography in the study of cerebral lipids. *J. Neurochem.*, 9: 607-615.
- RASO, P. & BOGLIOLO, L., 1970. Patologia. p. 78-130. In: *Esquistossomose mansônica*. A. S. Cunha, ed. Sarvier e Editora da USP, São Paulo.
- RAZ, A. & GOLDMAN, R., 1976. Differential effects of lipids on the osmotic fragility of lysosomes. *Experientia*, 32: 447-449.
- RICE, E. W., 1970. *Standard methods of clinical chemistry*. p. 215-222. Vol. 6, R. P. McDonald, ed. Academic Press. New York.
- RODRIGUES, L. E. A., 1984. Aspectos bioquímicos lisossômicos na esquistossomose mansônica hepática experimental. Salvador, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 221 p. (Tese de Titular).
- RODRIGUES, L. E. A., 1986. Papel dos lisossomos nos processos inflamatórios. Efeitos do íon zinco sobre os componentes do compartimento lisossômico. Salvador, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, 203 p. (Tese de Doutorado).
- RODRIGUES, L. E. A. & GALLE, P., 1985. Lysosomotropisme et action anti-inflammatoire des sels d'or. *Rev. Rhumat.*, 62 (7-9): 479-483.
- RODRIGUES, L. E. A.; OLIVEIRA, U. R. & GAUDENZI, T. F., 1968. Estudo bioquímico da esquistossomose mansônica hepática. I – relação hospedeiro-parasita na infecção experimental de camundongos. *Gaz. Med. Bahia*, 68 (2): 61-69.
- SKIPSKI, V.; PETERSON, R. F.; SANDERS, J. & MARCLAY, M., 1970. Phospholipids. p. 344-346. In: *Fundamentals of clinical chemistry*. N. W.

- Tietz, ed. W. B. Saunders Comp. Philadelphia.
- STANDEN, O. D., 1949. Experimental schistosomiasis. II – Maintenance of *Schistosoma mansoni* in the laboratory with some notes on experimental infection with *S. haematobium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 43: 268-283.
- VOSS, D. O.; COWLES, J. C. & BACILA, M., 1963. A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. *Analyt. Biochem.*, 6: 211-222.
- WILLOUGHBY, D. A., 1978. Inflammation. *Endeavour*, 2 (2): 57-65.