

LAÍS DE CARVALHO MARONI

**CINÉTICA DO COMPROMETIMENTO
DO SISTEMA CITOCROMO P-450
MICROSSOMAL HEPÁTICO NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
MURINA**

BELO HORIZONTE

2006

LAÍS DE CARVALHO MARONI

**CINÉTICA DO COMPROMETIMENTO
DO SISTEMA CITOCROMO P-450
MICROSSOMAL HEPÁTICO NA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA
MURINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito parcial
para obtenção do título
de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. José Renan da Cunha Melo
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Dra. Iramaya Rodrigues Caldas
Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou

BELO HORIZONTE

2006

Maroni, Laís de Carvalho
M354c Cinética do comprometimento do sistema citocromo P-450
microsomal hepático na esquistossomose mansônica murina/Laís de
Carvalho Maroni. Belo Horizonte, 2006.
98f. il.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas
Gerais.Faculdade Medicina.
Área de concentração: Patologia Geral
Orientador: José Renan da Cunha Melo
Co-orientadora: Iramaya Rodrigues Caldas
1.Esquistossomose mansoni/fisiopatologia 2.Sistema enzimático
do citocromo P-450/farmacocinética 3.Redutases do citocromo/
farmacocinética 4.Fígado/parasitologia 5.Western blotting 6.
Imunohistoquímica 7.Camundongos I.Título

NLM: WC 810
CDU: 616.995.122

DEDICATÓRIA



Aos meus pais e irmãs - Letícia e Ludmila - pela amizade e confiança;
por serem a minha principal fonte de inspiração e
os principais responsáveis por todos os meus objetivos até hoje alcançados.

AGRADECIMENTOS
ESPECIAIS



Ao Professor José Renan da Cunha Melo,
pela oportunidade de aprendizagem dentro do seu laboratório.

Por todos os ensinamentos fundamentais na formação de um pesquisador.
Pela amizade, confiança e por ter aberto portas que jamais serão esquecidas.

À Iramaya Rodrigues Caldas,
pela amizade e pelo exemplo de pesquisadora organizada e perseverante.

Pela dedicação e correção cuidadosa deste trabalho.

Por ser um exemplo de mulher, dedicada à profissão e batalhadora.

AGRADECIMENTOS



À **Capex e CNPq** – pelas bolsas concedidas aos alunos envolvidos neste projeto.

À **Profa. Helenice Gobbi** pela grande ajuda dos reagentes a serem utilizados na imuno-histoquímica.

Ao **Prof. Alfredo Barbosa**, pelas ajudas constantes durante a realização da imuno-histoquímica e pela agradável convivência durante todo este tempo.

À **Biogen** por ceder quantidades suficientes dos reagentes para que fossem realizados os testes de imuno-histoquímica.

Ao **Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade** pelos ensinamentos durante os experimentos.

Ao **Prof. Paulo Marcos Zech Coelho**, por ter infectado e disponibilizado os animais utilizados no trabalho.

A **Profa. Lúcia Porto**, por ter permitido e ajudado na realização das fotografias e no esclarecimento de algumas dúvidas relacionadas à Patologia.

A **Anna Carolina Lustosa** pela grande ajuda e disponibilidade na realização das análises estatísticas.

Ao **Jamil**, do laboratório de Bioquímica do ICB, UFMG, por ter sido tão prestativo na utilização da ultra-centrífuga.

A toda equipe do laboratório de Cirurgia Experimental - em especial, **Isabela, Klaus, Guilherme, Fabiana, Helen, André, Rodolfo, Roberta, Vinícius, Júlia, Humberto e Felipe Lisboa** - pelas constantes ajudas, por todo incentivo durante o trabalho e principalmente pela amizade.

Àqueles que ajudaram das mais diversas formas: **Lourdinha**, pela realização das reativações antigênicas; **Thaís Ferreira**, pela disponibilidade em ajudar com as tentativas dos *western blot*; **Marina Amaral**, pelos ensinamentos e pela boa vontade com relação à análise morfométrica do trabalho.

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio constantes. Especialmente aos meus pais, irmãs e cunhado, pelo exemplo de união e pelos incentivos.

Ao **Felipe**, por estar sempre ao meu lado; pelo incentivo e por se orgulhar de todo o meu esforço.

Aos meus amigos, por estarem sempre torcendo e enviando energias positivas; pela amizade e por tornarem a minha vida mais alegre – especialmente **Ana Karine, Ana Luísa, Bruna, Eliane, Flávia, Gena, Marina, Natália, Pollanah, Sílvia, Marina Oliveira, Rodrigo Carvalho, Priscila Torrent, Kellyson e Juliana Cristina**.

Aos colegas do mestrado, especialmente às amigas **Letícia Figueiredo**,
Ana Paula Barbosa e Christiane Cartelle, pelo companheirismo durante o curso.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização
deste trabalho... Muito obrigada!

Quando amamos e acreditamos, do fundo de nossa alma, nos sentimos mais fortes que o mundo e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé.

Essa força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa na hora exata, e quando atingimos nosso objetivo ficamos surpresos com nossa própria capacidade.

Paulo Coelho

RESUMO



RESUMO

Vários são os fatores que afetam o metabolismo hepático normal e o de alguns medicamentos. Dentre eles, podem-se citar as doenças agudas ou crônicas que atingem a arquitetura e/ou função hepáticas, como por exemplo, a esquistossomose.

Objetivo: Avaliar as alterações das enzimas citocromo P-450 das subfamílias 1A1, 2A6, 2B1, 2C11, 2E1, 3A2 e redutase, nas fases aguda, crônica e após tratamento com oxamniquine e avaliar a cinética das alterações das enzimas citocromo P-450 das subfamílias 1A1, 2E1 e 3A4 nas fases aguda e crônica.

Métodos: A expressão das isoenzimas do sistema citocromo P-450 foi avaliada através do *western blot* e a cinética das alterações das isoenzimas 1A1, 2E1 e 3A4 foi avaliada por imuno-histoquímica.

Resultados: Os achados revelaram que a maioria das isoenzimas do sistema citocromo P-450 são alteradas durante a infecção por *S. mansoni*, vistos pelo *western blot* e comprovados pela imuno-histoquímica. Algumas isoenzimas (e.g. CYP1A1), porém, apresentam expressão homogênea durante o tempo de infecção estudado. Outras apresentam expressão de forma oscilatória e outras (CYP3A4) são alteradas de forma permanente, o que mostra que a infecção por *S. mansoni* desregula o sistema microssomal hepático, com especificidade para as diferentes isoformas da família P-450.

Conclusão: A infecção por *S. mansoni* altera a expressão de isoenzimas do sistema citocromo P-450.

ABSTRACT



ABSTRACT

Acute and chronic diseases, such as schistosomiasis, may affect the hepatic architecture or function, impairing liver detoxication function and drug metabolism.

Objectives: To evaluate quantitative changes in enzymes of the cytochrome P-450 subfamilies 1A1, 2A6, 2B1, 2C11, 2E1, 3A2 and reductase, during the acute and chronic phases of schistosomiasis and after treatment with oxamniquine by western blot. To evaluate the kinetics of these changes in the subfamilies 1A1, 2E1 and 3A4 during the acute and chronic phases, by immunohistochemistry.

Methods: Cytochrome P-450 isoenzymes expression was evaluated through western blotting and the kinetics of the alterations of the isoenzymes 1A1, 2E1 and 3A4 through immunohistochemistry.

Results: The majority of cytochrome P-450 isoenzymes are altered during the infection by *S. mansoni*. However, some of them (e.g. CYP1A1) showed no modification of its levels of expression during the period studied and the expression of other (e.g. CYP3A4) showed an oscillatory pattern (as seen by immunohistochemistry), suggesting a specific modification in the microsomal hepatic enzymatic system in the course of *S. mansoni* infection.

Conclusion: The infection by *S. mansoni* alters the hepatic microsomal expression of several cytochrome P-450 isoenzymes.

LISTA DE FIGURAS



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ciclo catalítico do CYP-450	09
FIGURA 2 - Esquema de análise seqüencial das lâminas. A área percorrida para captura dos campos e contagem da área marcada pelo anticorpo seguiu o sentido das setas	29
FIGURA 3 - Etapas para contagem da área marcada pelo anticorpo. (A) Marcação imuno-histoquímica da enzima 2E1 de um animal com 50 dias de infecção. A cor rosa representa a marcação do anticorpo. (B) Imagem binária do corte histológico ilustrado em A. A coloração em branco corresponde à marcação pelo anticorpo	29
FIGURA 4 - Expressão dos níveis de CYP1A1 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	32
FIGURA 5 - Expressão dos níveis de CYP2E1 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	33
FIGURA 6 - Expressão dos níveis de CYP2A6 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	34
FIGURA 7 - Expressão dos níveis de redutase no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	35
FIGURA 8 - Expressão dos níveis de CYP2C11 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	36
FIGURA 9 - Expressão dos níveis de CYP2B1 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	37
FIGURA 10 - Expressão dos níveis de CYP3A2 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR)	38
FIGURA 11 - Microscopia do fígado de animal com 30 dias de infecção	39
FIGURA 12 – Ovo e pigmento esquistossomótico em tecido hepático.....	40
FIGURA 13 - Granulomas em fígado de camundongos infectados com 25 cercárias de <i>S. mansoni</i> em diferentes estágios evolutivos	41

FIGURA 14 - Verme adulto de <i>S. mansoni</i> na luz de um vaso sanguíneo, em animal representante da fase aguda, com 50 dias de infecção	42
FIGURA 15 - Marcação imuno-histoquímica da enzima CYP1A1 e controle negativo. Controle negativo da reação (15A) e marcação da isoenzima 1A1 (15B), em animal com 50 dias de infecção por <i>S. mansoni</i>	43
FIGURA 16 - Marcação imuno-histoquímica de CYP1A1 em parênquima hepático. Animal não infectado, grupo controle (A), animal na fase aguda (B) e animal na fase crônica da esquistossomose mansônica (C)	44
FIGURA 17 - Expressão dos níveis de CYP1A1 no sistema microsomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes dias da infecção por <i>S. mansoni</i>	45
FIGURA 18 - Expressão dos níveis de CYP1A1 no sistema microsomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes fases da infecção por <i>S. mansoni</i>	46
FIGURA 19 - Marcação imuno-histoquímica de CYP2E1 em parênquima hepático. Animal não infectado, grupo controle (A), animal na fase aguda (B) e animal na fase crônica da esquistossomose mansônica (C)	47
FIGURA 20 - Expressão dos níveis de CYP2E1 no sistema microsomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes dias da infecção por <i>S. mansoni</i>	48
FIGURA 21 - Expressão dos níveis de CYP2E1 no sistema microsomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes fases da infecção por <i>S. mansoni</i>	49
FIGURA 22 - Marcação imuno-histoquímica de CYP3A4 em parênquima hepático. Animal não infectado, grupo controle (A), animal na fase aguda (B) e animal na fase crônica da esquistossomose mansônica (C)	50
FIGURA 23 - Expressão dos níveis de CYP3A4 no sistema microsomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes dias da infecção por <i>S. mansoni</i>	51
FIGURA 24 - Expressão dos níveis de CYP3A4 no sistema microsomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes fases da infecção por <i>S. mansoni</i>	52

LISTA DE TABELAS



LISTA DE TABELAS

1 - Cronograma de sacrifício dos animais para estudo por <i>western blot</i>	21
2 - Cronograma de sacrifício dos animais para estudo imuno-histoquímico	21
3 - Diluição dos anticorpos primários para <i>western blot</i> de fígado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i>	22
4 - Diluição dos anticorpos primários para imuno-histoquímica em fígado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP – Fosfatase alcalina
BSA – Albumina bovina sérica
CT – Grupo controle
CYP – Citocromo P-450
FA – Grupo fase aguda
FC – Grupo fase crônica
FUNASA – Fundação Nacional de Saúde
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio (água oxigenada)
HE – Hematoxilina – eosina
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
kg - quilogramas
µg - microgramas
µm - micrômetros
µm² - micrômetros quadrados
mg - miligramas
mL - mililitros
NI – Grupo não-infectado
PBS – Salina tamponada com fosfato
pH – Potencial hidrogeniônico
TBS – Salina tamponada com tris
TR – Grupo tratado

SUMÁRIO



SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Esquistossomose mansônica	1
1.1.1 A doença	1
1.1.2 Patogenia	2
1.1.3 Patologia	4
1.2 Sistema Citocromo P-450	6
1.2.1 Caracterização	6
1.2.2 Indução e inibição enzimática	9
1.2.3 Isoformas de P-450	11
1.3 Expressão do CYP-450 na Esquistossomose	13
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.1.1 Infecção dos camundongos	20
3.2 Western blot	22
3.2.1 Separação dos microsomos	23
3.2.2 Protocolo do western blot	23
3.2.3 Análise da intensidade da banda	25
3.2.4 Análise estatística	25
3.3 Histologia Convencional (HE)	25
3.4 Imuno-histoquímica	26
3.4.1 Protocolo de imuno-histoquímica	27
3.4.2 Contagem das áreas marcadas pelos anticorpos	28
3.4.3 Análise estatística	30
3.4.3.1 Avaliação da área marcada pelo anticorpo	30
4. RESULTADOS	32
4.1 Western blot	32
4.2 Histologia Convencional (HE)	39

4.3 Imuno-histoquímica	43
4.3.1 CYP 1A1	43
4.3.2 CYP 2E1	47
4.3.3 CYP 3A4	50
5. DISCUSSÃO	54
5.1 Metodologia	54
5.2 Resultados	57
5.3 Perspectivas Futuras	61
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	73

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose mansônica

1.1.1 A doença

A esquistossomose mansônica decorre da contaminação do hospedeiro humano pelo parasita *Schistosoma mansoni* (1) e tem a água como veículo de transmissão. É uma doença que se caracteriza por uma fase aguda, que muitas vezes não se manifesta clinicamente, e outra crônica, na qual podem ser evidenciadas as formas graves, principalmente pela hipertensão porta ou pulmonar (2).

Essa doença está distribuída de maneira endêmica em muitos países em desenvolvimento, como em áreas tropicais e subtropicais na África, Ásia e América do Sul. No mundo, estima-se a existência de duzentos milhões de pessoas infectadas, estando seiscentos milhões de pessoas expostas ao risco da infecção. A esquistossomose é considerada a segunda doença tropical em importância no mundo e a terceira doença parasitária mais frequente (3). No Brasil, a área endêmica para a esquistossomose abrange cerca de dezenove estados com aproximadamente vinte e seis milhões de habitantes expostos ao risco da infecção. Ocorre de forma endêmica e focal desde os estados do Maranhão até Minas Gerais com certa penetração no Espírito Santo. Apresenta ainda, focos isolados nos

estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Goiás e Tocantins.

1.1.2 Patogenia

A patogenia da esquistossomose e suas formas clínicas têm sido relacionadas a vários fatores, tais como carga parasitária, idade, cepa e fatores imunológicos do hospedeiro definitivo. Após conseguir a penetração da cabeça na pele do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos. Ainda pelas ações lítica e mecânica, os esquistossômulos migram pelo tecido subcutâneo, até atingir vasos linfáticos ou venosos, para alcançar o coração e depois os pulmões. Os esquistossômulos então se dirigem para o sistema porta, alimentando-se e desenvolvendo-se em machos e fêmeas adultos, aproximadamente, 30 dias após a penetração. A partir daí, migram, acasalados, para o sistema venoso portal, onde farão a oviposição. Os primeiros ovos são vistos cerca de 35 a 40 dias após a infecção do hospedeiro.

Os ovos do *Schistosoma mansoni* e a reação inflamatória granulomatosa que se forma ao redor deles são exemplos fundamentais de patogenia da esquistossomose. Os granulomas apresentam, durante seu desenvolvimento, 3 estágios evolutivos que se sucedem: estágio necrótico-exsudativo, produtivo e de cicatrização por fibrose (4, 5, 6).

No estágio necrótico-exsudativo, que é característico das fases iniciais da infecção esquistossomótica, um ou mais ovos embrionados são circundados por

zona de necrose, onde comumente são encontrados imunocomplexos (7). Externamente a essa área observa-se exsudato celular constituído por granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) e mais periféricamente, por linfócitos, plasmócitos e macrófagos. No estágio produtivo o ovo habitualmente já se encontra fragmentado ou deformado e o infiltrado celular é constituído por macrófagos, linfócitos e plasmócitos. É comum o encontro de células gigantes multinucleadas e o granuloma nessa fase é menor quando comparado com o do estágio anterior. Finalmente, no estágio de cicatrização por fibrose, o granuloma é ainda menor e se resume a fragmentos da casca do ovo circundado por escasso infiltrado inflamatório mononuclear e, mais externamente, por zona de fibrose.

Variações do padrão evolutivo descrito acima são comuns, sendo raro o encontro de ovos associados a reação inflamatória mínima ou ausente (4, 5, 6). A reação inflamatória e o tamanho do granuloma variam com a intensidade e duração da infecção esquistossomótica, com a fase do ciclo evolutivo de cada granuloma e, até mesmo, entre os diversos órgãos comprometidos; entretanto, alguns autores ressaltam que o principal fator determinante dessa variabilidade é a resposta imune do hospedeiro (7).

A esquistossomose evolui em duas fases: aguda e crônica. Nos seres humanos, a fase aguda aparece em torno do 50º dia e dura até cerca de 120 dias após a penetração da cercária. Nesta fase, os pacientes apresentam sintomatologia variada, sendo febre alta, mal-estar, emagrecimento, tosse, diarreia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia, além de alterações hematológicas como

leucocitose e eosinofilia as manifestações mais frequentes. Essa fase pode ser grave e acompanhar-se de toxemia, caracterizando a forma toxêmica (8).

A fase crônica pode apresentar grandes variações do ponto de vista clínico, o que irá determinar diferentes formas clínicas para a doença. A forma clínica intestinal, a mais frequente, é caracterizada por episódios ocasionais de diarreia muco-sanguinolenta com dor ou desconforto abdominal. A forma clínica hepatointestinal, além dos sintomas intestinais, caracteriza-se também pela presença de hepatomegalia. A forma hepatoesplênica, que se manifesta sob a forma compensada é caracterizada por hepatoesplenomegalia com discreta hipertensão portal. A forma hepatoesplênica descompensada é mais grave e pode manifestar-se por sangramento de varizes do esôfago, por anemia, por desnutrição ou por quadro de hiperesplenismo (9). Os animais usados no presente trabalho, na fase crônica, apresentaram a forma hepatoesplênica, com hepatoesplenomegalia acentuada.

1.1.3 Patologia

Os granulomas periovulares são encontrados em vários órgãos, principalmente nos intestinos e no fígado. São vistos focos intralobulares de necrose e necrobiose no fígado, com destruição de hepatócitos, infiltração porta de histiócitos, eosinófilos, linfócitos, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer. No baço há hiperplasia dos cordões de Billroth e eosinofilia intensa (8).

O decréscimo no tamanho do granuloma, observado entre as fases aguda e crônica, foi chamado de modulação. A modulação é um processo extremamente

complexo que envolve células T, macrófagos, fatores solúveis, citocinas, prostaglandinas, anticorpos, imunocomplexos, etc (10).

A arquitetura normal dos lóbulos hepáticos não sofre mudança na esquistossomose (11). O fígado se torna maior, endurecido e o seu lobo esquerdo, com freqüência, é maior do que o direito (2); sua textura apresenta-se firme e com uma superfície granular, distinguindo-se do aspecto nodular da cirrose hepática (11). A lesão básica está em torno do tecido conjuntivo que circunda os ramos intra-hepáticos da veia porta (8). Nos espaços de Disse, há depósitos de material e colágeno fibrilar na membrana basal subendotelial, com capilarização dos sinusóides (12).

A fibrose hepática se desenvolve a partir deste acúmulo de colágeno depositado no fígado (13), com a proliferação de células sintetizadoras de colágeno, aumento na síntese de colágeno, ou até pela deficiência na degradação deste componente (14). Foi demonstrado, em animais experimentais, que o conteúdo de colágeno no fígado aumenta paralelamente com a formação de granulomas circundando os ovos do parasita (15).

Tratos portais se tornam, de certa forma, bloqueados com granulomas e desorganizados pela inflamação e pela fibrose (7). A estrutura lobular permanece preservada, salvo em alguns casos, quando ocorrem áreas focais de necrose ou nódulos regenerativos, na provável dependência de trombos intra-hepáticos ou de isquemia após hemorragias digestivas maciças (16).

Na esquistossomose não há, portanto, cirrose e sim fibrose (17). O aspecto típico se mostra quando os espaços porta, grandes e fibrosos, aparecem como “manchas brancas” circundadas por parênquima hepático (18, 19). Essa lesão é chamada fibrose de Symmers (20), sendo aceita como peculiar à esquistossomose. A forma de *Symmers* consiste, do ponto de vista anatômico, em inflamação crônica produtiva, causada pelos ovos que penetram no conjuntivo periportal (peripileflebite) e pela propagação desta à parede dos ramos porta (pileflebite). Não ocorre subversão da arquitetura lobular do fígado, mas ocorre neoprodução conjuntivo-vascular intensa e sistematizada (21).

1.2 Sistema Citocromo P-450

1.2.1 Caracterização

O citocromo P-450 foi identificado primeiramente em 1958 nomeado por apresentar um pigmento (P) com o espectro de, no máximo, 450nm, quando reduzido e ligado ao monóxido de carbono (22, 23). Este pigmento foi posteriormente caracterizado como uma hemoproteína P450, em 1961.

A superfamília de citocromo P-450 (CYP) é uma família de enzimas que catalisa numerosas reações, incluindo o metabolismo de ácidos graxos, biotransformação xenobiótica, além da síntese e metabolismo de substratos endógenos (24, 25, 26, 27). As várias isoformas de CYP envolvidas com biotransformação xenobiótica e metabolismo de drogas estão agrupadas nas subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3 (28).

A superfamília de CYP-450 é subdividida e classificada segundo recomendações de um comitê de nomenclatura, de acordo com a base do aminoácido, critérios filogenéticos e organização do gene. No entanto, sabe-se que a sequência de aminoácidos é extremamente diversa, apesar da forma estrutural ter sido conservada durante a evolução (29).

Vários fatores contribuem para alterar os níveis e atividade das várias isoformas, incluindo fatores genéticos, ambientais, fisiológicos (30), dieta, infecções e estímulos inflamatórios (31). Além destes, substâncias xenobióticas podem induzir ou inibir a atividade das isoformas (32), principalmente pelo fato dessas isoformas de P-450 apresentarem pesos moleculares e especificidades pelos diferentes substratos (33).

Algumas drogas também podem alterar a expressão das isoformas de P-450, como por exemplo praziquantel (34), omeprazol e lansoprazol (35), interferon- α recombinante (36), interferon β (37), tabaco (38), lindane (39, 40) e a oxamniquine (41).

A LPS, também conhecida como endotoxina de bactérias gram-negativas, diminui o metabolismo de droga por CYP em várias espécies de animais, incluindo roedores (42) e humanos. No entanto, em outros casos, ela também pode ser capaz de aumentar a atividade da subfamília CYP3A.

In vivo, a grande maioria das biotransformações medicamentosas são catalisadas por enzimas celulares específicas. Nas células, as enzimas do sistema CYP-450 podem se localizar no retículo endoplasmático, na mitocôndria, no citosol, nos lisossomas, ou mesmo no envelope nuclear da membrana plasmática (33) de inúmeros tecidos (30).

Não existe uma regra para a distribuição tecidual das enzimas P450. Como suas funções são extremamente diversas, elas podem ser encontradas em todos os tipos de tecidos, em todos os tipos de organismos (29). As enzimas P-450 foram primeiramente descritas em fígado de mamíferos, onde eram especialmente abundantes e apresentavam função essencial no metabolismo de drogas (22, 43).

Os avanços da Biologia Molecular e o estudo do genoma permitiram a caracterização bioquímica individual de enzimas P-450, assim como a sua função. Até o presente momento, existem mais de 270 famílias de CYP diferentes, com 18 famílias registradas em mamíferos (44).

As várias enzimas de CYP-450 podem metabolizar vários componentes exógenos, incluindo drogas, químicos ambientais e poluentes, além de produtos naturais de plantas. Em geral, as enzimas P-450, particularmente aquelas encontradas no fígado, são responsáveis em converter substâncias hidrofóbicas em um número maior de derivados hidrofílicos, facilitando a depuração do organismo (44).

Várias enzimas do sistema CYP-450 estão localizadas nas membranas lipofílicas dos retículos endoplasmáticos hepático e de outros tecidos, onde ocorre processo de oxidação-redução (figura 1). Neste, participam duas enzimas microsossomais: a flavoproteína NADPH citocromo P450-reduetase e a hemoproteína CYP-450 (33), que se interagem pela camada de lipídios (30).

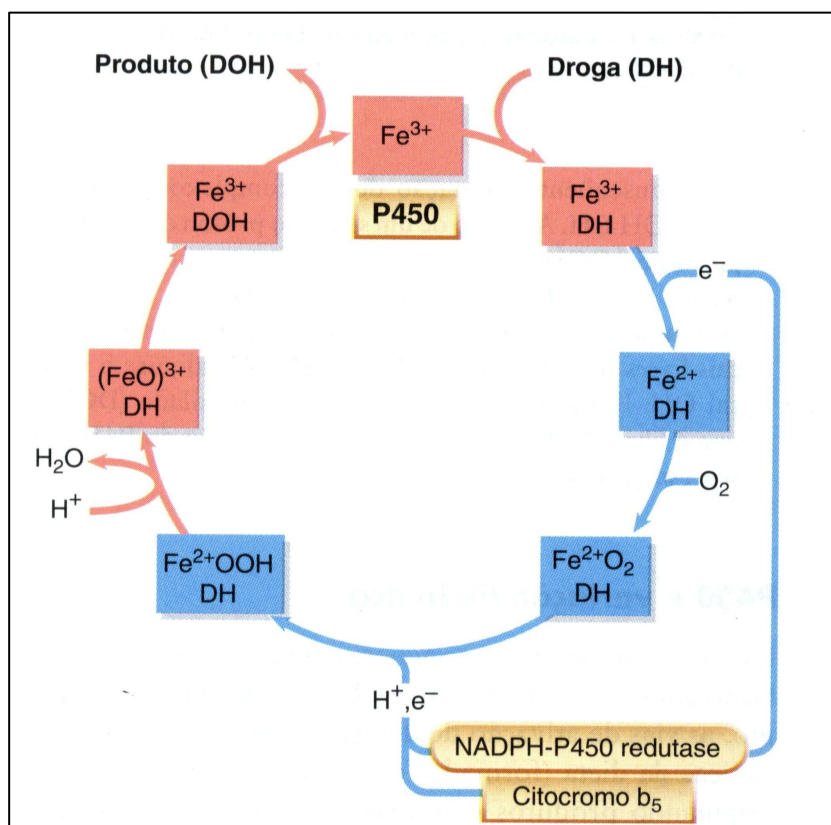


FIGURA 1 – Ciclo catalítico do CYP-450. O P-450, que contém ferro na forma férrica (Fe^{3+}), combina-se com uma molécula de droga (DH), recebe um elétron da NADPH-P450 redutase, que reduz o ferro a Fe^{2+} , combina-se com o oxigênio molecular, um próton e um segundo elétron (da NADPH-P450 redutase ou do citocromo b_5) para formar um complexo $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}\cdot\text{DH}$. Esse complexo combina-se com outro próton, produzindo água e um complexo oxeno férrico $(\text{FeO})^{3+}\cdot\text{DH}$. O $(\text{FeO})^{3+}$ extrai um átomo de hidrogênio da DH, com formação de um par de radicais livres de vida curta, liberação da droga oxidada (DOH) do complexo e regeneração da enzima P-450 (45).

1.2.2 Indução e inibição enzimática

Alguns substratos medicamentosos quimicamente diferentes, quando administrados repetidamente, são capazes de “induzir” a CYP-450, através do aumento da taxa de síntese da isoforma e/ou da redução de sua taxa de degradação (33).

A indução resulta em aceleração do metabolismo (30) e, habitualmente, em diminuição da ação farmacológica do indutor, bem como dos medicamentos concomitantemente administrados (33). Além disso, a indução pode associar-se ao aumento da toxicidade no caso dos fármacos que são metabolizados em formas reacionais (33).

As duas isoformas mais extensivamente estudadas são: CYP-450 2B1, induzida pelo tratamento com o fenobarbital e CYP-450 1A1, pelo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Além destas, já foi comprovada a ação dos glicocorticóides, antibióticos macrolídios, anticonvulsivantes e alguns esteróides sobre uma forma específica denominada CYP-450 3A1 (33) e também sobre o CYP-450 3A4 (30). A isoniazida, a acetona ou a administração crônica do etanol induzem uma isoforma diferente, CYP-450 2E1, responsável pela ativação das nitrosaminas carcinogênicas (33, 30).

Os poluentes ambientais também são capazes de induzir o CYP-450. A exposição ao benzopireno, presente na fumaça do tabaco e carne de churrasco, induz reconhecidamente a CYP-450 1A1 e altera a taxa do metabolismo

medicamentoso hepático e extra-hepático (30), tanto em animais experimentais, como em seres humanos (33). Outros agentes químicos ambientais que reconhecidamente induzem os citocromos P-450 específicos incluem os bifenis policlorados (PCBs), que são amplamente utilizados na indústria sob a forma de materiais isolantes e plásticos (33).

Outros substratos medicamentosos podem inibir a atividade das enzimas P-450. O proadifeno é um dos mais conhecidos. Este composto liga-se à molécula do citocromo e, a partir daí, é capaz de inibir competitivamente o metabolismo de potenciais substratos (33).

Os medicamentos que contêm o imidazol também podem inibir por competição, ligando-se firmemente ao heme-ferro do CYP-450 e reduzindo de forma eficaz o metabolismo dos substratos endógenos (testosterona) ou de outros medicamentos administrados simultaneamente (33).

A inibição de enzimas do CYP que participam na biotransformação medicamentosa resulta em elevadas concentrações do fármaco original, por aumento da biodisponibilidade e maior incidência de toxicidade da droga (30).

1.2.3 Isoformas de P-450

Foram identificadas 12 famílias de genes do CYP-450 nos seres humanos. Uma determinada família de CYP-450 divide-se em subfamílias e as

sequências protéicas dentro da mesma família têm semelhança superior a 55%. Várias enzimas do CYP-450 podem coexistir em uma única célula (30).

As famílias 1, 2 e 3 de CYP-450 (CYP1, CYP2 e CYP3) codificam as enzimas que participam na maioria das biotransformações de fármacos, enquanto as famílias restantes são importantes no metabolismo de compostos endógenos como esteróides e ácidos graxos (30).

CYP1 – a expressão da família de gene CYP1 é induzida pelo receptor hidrocarbono aril, um fator transcricional que é ativado pela ligação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, onde as isoformas 1A1 e 1B1 parecem agir de forma mais eficaz. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são encontrados nos produtos de incineração industrial, fumaça do cigarro, e comidas grelhadas no carvão (44). CYP1A1 e CYP1A2 são enzimas expressas em quantidades variadas, em diferentes tecidos (44). A isoforma 1A1 apresenta grande correlação com a carcinogênese no pulmão (28).

CYP2 – esta compreende a maior família de CYP-450 dos mamíferos. CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, e CYP2C19 juntos, metabolizam mais da metade das drogas prescritas frequentemente, além do ácido araquidônico e de alguns esteróides (44). No entanto, CYP2E1, CYP2F1 e CYP2J2, também são citadas como isoformas auxiliares no metabolismo de algumas drogas (44).

Apesar da família CYP2 ser bastante conhecida, algumas isoformas de CYP-450 apresentam funções ainda obscuras (44). Camundongos *knockout* ou

deficientes no gene *Cyp2e1* parecem ser normais, mas são muito resistentes aos efeitos tóxicos do benzeno (46), indicando, portanto, uma função no metabolismo xenobiótico para esta subfamília (44).

As hepatites C e B são doenças virais que levam ao aumento da expressão da isoforma de CYP2A6 (47). Já a hepatite A está relacionada ao aumento na expressão dessa mesma isoforma (48). A isoforma 2B1 metaboliza várias drogas lipofílicas e esteróides, de forma bastante eficiente. A isoforma 2C11 está envolvida na oxidação de vários xenobióticos e é regulada por hormônios gonadais. A isoforma 2E1 é responsável pela ativação de nitrosaminas carcinogênicas, apresentando habilidade em converter o dioxigênio em radicais livres, que levam à carcinogênese (28).

CYP3 – a família CYP3 apresenta quatro membros, sendo CYP3A4 e CYP3A5 as enzimas P450 de maior expressão no fígado humano e no trato gastrointestinal. As enzimas dessa família são também conhecidas por metabolizarem mais de 120 drogas prescritas e substratos endógenos, tais como esteróides e ácidos biliares (44).

Evidências sugerem que drogas diversas podem induzir membros da família CYP3A4, e que a capacidade de um componente particular de induzir as enzimas CYP3A varia entre espécies (44). A isoforma 3A2 metaboliza esteróides e é expressa somente em machos (28).

1.3 Expressão do CYP-450 na Esquistossomose

Poucos são os trabalhos que relacionam a expressão de isoformas CYP 450 na esquistossomose. Alguns estudos, relacionando as alterações do metabolismo de drogas e doenças hepáticas, tais como a hepatite (49) e cirrose (50), concluíram que o grupo no qual havia maiores alterações hepáticas, apresentou diminuição do conteúdo de CYP-450. Várias doenças parasitárias causam alterações no metabolismo de drogas, como amebíase, ancilostomíase e tripanossomíase (51).

São vários os fatores que afetam o metabolismo hepático normal e de alguns medicamentos. Dentre eles, podem-se citar as doenças agudas ou crônicas que atingem a arquitetura ou função hepáticas (33), tais como a esquistossomose (52). Tais doenças podem levar tanto à indução de algumas isoformas de CYP-450 como à inibição de outras (31).

O conteúdo de CYP-450 foi reduzido consideravelmente na esquistossomose experimental. O conteúdo de CYP-450 reduziu 30% com 8 semanas de infecção, voltando ao nível normal em 14 semanas de infecção (53).

O efeito da duração da infecção pelo *S. mansoni* na expressão das isoformas de CYP-450 foi investigado. Houve inibição de algumas isoformas (1A1, 2B1 e 2B2) a partir do 45º de infecção (54).

O número infectante de cercárias de *S. mansoni* pode alterar a intensidade e as ações farmacológicas de várias drogas. O conteúdo de CYP-450 foi

aumentado em até 72% na infecção com 180 cercárias de *S. mansoni* (55). A influência do número de cercária na infecção por *S. mansoni* sobre o sistema P-450 também foi investigada, utilizando até 600 cercárias po animal (56).

O fenobarbital pode induzir algumas enzimas hepáticas, repondo o conteúdo CYP-450 (57). A administração de lindane aumenta a atividade de demetilases (DMN) (39) e de hidroxilases (AH) (40).

O praziquantel aumenta a atividade enzimática de aniline 4-hidroxilase, em animais infectados com *S. mansoni* e tratados quando comparados com animais com 9-13 semanas de infecção, sem tratamento (34).

A diminuição do conteúdo de enzimas CYP hepáticas, em camundongos infectados com *S. mansoni*, levou a uma redução da taxa de metabolismo xenobiótico. O declínio das atividades de CYP na esquistossomose murina tem sido associado a uma resposta inflamatória ao redor dos ovos do parasita localizada no parênquima hepático porque não houve mudança nas atividades de CYP ou no metabolismo xenobiótico em camundongos atímicos (58).

Por este motivo foram também estudadas possíveis alterações no conteúdo de CYP-450 em camundongos infectados com *S. mansoni*, com somente 15 a 30 dias de infecção, fase pré-postural. Não houve alteração de CYPs hepáticas após 2 semanas de infecção, mas houve uma leve alteração após 1 mês. Segundo os autores, essa mudança parece depender da isoforma de CYP e também do sexo do animal estudado (59).

Não somente as atividades das enzimas são diferentemente moduladas, mas também, a magnitude, a direção (se aumenta ou diminui a expressão) e o tempo dos efeitos parecem depender do tipo de agente infeccioso e inflamatório (59).

Embora existam publicações eventuais sobre alterações no sistema de citocromo P-450 na vigência da infecção por esquistossomose, o estudo da cinética das alterações funcionais hepáticas no sistema microsomal ao longo da infecção esquistossomótica não foi ainda descrita na literatura, o que justifica a proposição deste trabalho.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da infecção pelo *S. mansoni* na expressão de enzimas do sistema citocromo P-450 no parênquima hepático, pelas técnicas de *western blot* e imuno-histoquímica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a expressão das subfamílias 1A1, 2A6, 2B1, 2C11, 2E1, 3A2 e redutase de enzimas citocromo P-450, nas fases aguda, crônica da esquistossomose mansônica murina e após tratamento com oxamniquine, por *western blot*.
2. Avaliar a cinética das alterações das subfamílias 1A1, 2E1 e 3A4 de enzimas citocromo P-450 nas fases aguda e crônica da esquistossomose mansônica murina, pela técnica de imuno-histoquímica.

MATERIAIS E MÉTODOS



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados em duas etapas utilizando camundongos *swiss* machos (1ª etapa), ou fêmeas (2ª etapa). Os animais foram infectados com 25 cercárias de *Schistosoma mansoni* da cepa LE, por via cutânea, no laboratório GIDE do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Transferidos para o biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, os animais foram mantidos em temperatura ambiente, com dieta alimentar e água *ad libitum*, até serem sacrificados de acordo com o cronograma abaixo.

3.1.1 Infecção dos camundongos

Na primeira etapa do trabalho os animais foram divididos em quatro grupos de pelo menos 10 animais cada: controle (animais não infectados), fase aguda (animais com 70 dias de infecção), fase crônica (animais com 154 dias de infecção) e grupo de animais tratados com oxamniquine, administrado em dose única de 400mg/kg, por via gástrica, aos 140 dias de infecção e sacrificados 60 dias após.

Tabela 1 – Cronograma de sacrifício dos animais para estudo por *western blot*.

Grupo	Sacrifício	N° Animais
Controle	-	10
Fase Aguda	70 dias	10
Fase Crônica	154 dias	10
Tratados	60 dias após tratamento	10

Os dias do sacrifício foram contados a partir do dia de infecção, exceto nos animais tratados, que receberam oxamniquine (400mg/kg) no 140º dia de infecção e foram sacrificados 60 dias após.

Para a segunda etapa do experimento, os animais foram infectados com 25 cercárias e foram sacrificados 5 animais por vez aos 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 85 e 140 dias de infecção além de animais do grupo controle, de acordo com a tabela abaixo.

Tabela 2 – Cronograma de sacrifício dos animais para estudo imuno-histoquímico.

Grupo	Sacrifício	N° Animais
Controle	-	10
Fase pré-postural	30 dias	5
Fase Aguda	35 dias	5
Fase Aguda	40 dias	5
Fase Aguda	45 dias	5
Fase Aguda	50 dias	5
Fase Aguda	60 dias	5
Fase Aguda	70 dias	5
Transição FA / FC	85 dias	5
Fase Crônica	140 dias	5

Os dias do sacrifício foram contados a partir do dia de infecção.
FA = fase aguda e FC = fase crônica.

Após o sacrifício dos animais, o abdômen foi aberto e segmentos de fígado foram retirados e identificados. O fígado dos animais da 1ª etapa foi retirado, colocado em nitrogênio líquido e transferido para armazenamento em um freezer a –

80°C até serem realizados ensaios de *western blot*. O fígado dos animais da 2ª etapa foi retirado e fixado em formol tamponado a 10%, para posterior processamento histológico.

3.2 Western blot

Os anticorpos primários utilizados para realização do *western blot* foram anti-CYP1A1, anti-CYP2A6, anti-CYP2B1, anti-CYP2C11, anti-CYP2E1, anti-CYP3A4 e anti-CYP c redutase (Calbiochem). O anticorpo secundário utilizado era conjugado à peroxidase, diluído a 1:10000 (Dako).

As diluições dos anticorpos primários estão ilustradas na tabela 3.

Tabela 3 - Diluição dos anticorpos primários para *western blot* de fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*.

Anticorpo primário	Diluição
anti-CYP1A1	1:1000
anti-CYP2A6	1:1000
anti-CYP2B1	1:5000
anti-CYP2C11	1:5000
anti-CYP2E1	1:5000
anti-CYP3A2	1:5000
anti-Redutase	1:5000

CYP = sistema citocromo P-450.

3.2.1 Separação dos microssomos

A fração microssomal hepática foi preparada (60), como descrito em

seguida: o fragmento de tecido separado para a técnica de *western blot* foi pesado, cortado em pedaços pequenos e adicionado tampão de homogeneização (3 vezes o peso do tecido – w/v) e o inibidor de protease (Boehringer Mannheim), homogeneizador (Fisher Scientific) para terminar a maceração do tecido, num total de 8 vezes.

O homogeneizado foi centrifugado durante 20 minutos, a 10.000 x g. O sobrenadante foi então coletado e o *pellet*, descartado. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado durante 90 minutos, a 105.000 x g e novamente coletado e armazenado (citosol). O *pellet* foi ressuspenseo com tampão de homogeneização com volume igual ao volume inicial utilizado (3x w/v) e centrifugada por 90 minutos, a 105.000 x g.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (microsomas) foi ressuspenseo em tampão de ressuspensão como descrito. As amostras foram imersas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C. Foi armazenada uma pequena alíquota das amostras para posterior determinação da concentração de proteínas (61).

3.2.2 Protocolo do western blot

As canaletas do gel de poliacrilamida preparado no laboratório, a uma concentração de 10% foram preenchidas com a solução de microsomas contendo 20µg de proteína/canaleta. A voltagem aplicada na cuba de eletroforese foi de 50 volts por 1h e em seguida aumentada para 100 volts, durante 2h. Foram colocados

200mL do tampão de transferência em uma cuba e os materiais para montagem do *blot* foram mergulhados neste tampão.

O gel foi transferido para uma cuba contendo tampão de transferência (0,302% tris, 1,44% glicina, 20% metanol). Após montado, o “sanduíche” foi levado para a cuba preenchida com o tampão de transferência a 4° C a 80 volts, por 16h.

Terminada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi colocada em uma cuba contendo solução de *ponceau red* (0.1%, w/v em 5% de ácido acético) sob agitação durante 15-30 segundos para avaliar a adequação do processo de transferência. A membrana foi bloqueada com TBS Tween 20 a 0,05% e leite desnatado 5%, por 1h na temperatura ambiente.

Os anticorpos primários foram diluídos em TBS/BSA 5% e incubados com a membrana de nitrocelulose, a 4°C, sob agitação, por 16h. Em seguida, a membrana foi lavada com solução de Tween 20 0,05% em TBS, duas vezes por 10 minutos e incubada com o anticorpo secundário, por 2h, a 4°C, sob agitação, seguida de lavagem da membrana por 3 vezes por 15 minutos, com TBS Tween 20, 0,05%.

3.2.3 Análise da intensidade da banda

Para a análise da intensidade da banda marcada no *western blot*, foi utilizado o aparelho Kodak Image Station 2000 RT. O *software* Kodak Molecular

Imaging Software v.4.0.1 foi utilizado e os valores foram armazenados para posterior análise estatística.

3.2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Prism 4.0. Foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

3.3 Histologia convencional (HE)

Todos os fragmentos de fígados fixados em formaldeído 10% foram incluídos em blocos de parafina após processo de desidratação (álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto I e álcool absoluto II), diafanização (xilol I e xilol II) e impregnação (parafina I e parafina II). Após a inclusão dos blocos, o material foi cortado em micrótomo, na espessura de 5 μ m e corado com hematoxilina/eosina (HE). A histologia convencional foi utilizada para analisar morfológicamente a evolução da infecção nos fígados em estudo.

3.4 Imuno-histoquímica

Os fragmentos de fígado, fixados em formaldeído 10%, foram processados como descrito, cortados em micrótomo, a uma espessura de 3 μ m e processados para detecção das enzimas nos tecidos conforme descrito abaixo, utilizando os anticorpos primários descritos na tabela 4.

As lâminas de vidro foram tratadas com uma solução de lisina (Sigma-Aldrich), diluída a 1:10, para evitar que os cortes se desgarrassem no momento de exposição a alta temperatura, no processo de reativação antigênica. Foram colocados dois cortes em série, de um mesmo espécimen de fígado, em uma mesma lâmina: um foi utilizado como controle negativo da reação imunohistoquímica (sem incubação com o anticorpo primário) e o outro como teste.

Os seguintes anticorpos foram utilizados no estudo imunohistoquímico: anti-CYP1A1, anti-CYP2E1 e anti-CYP3A4 (Calbiochem).

Tabela 4 - Diluição dos anticorpos primários para imunohistoquímica em fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. A diluição foi feita com diluente de anticorpo (DakoCytomation).

Anticorpo primário	Diluição
anti-CYP1A1	1:250
anti-CYP2E1	1:1000
anti-CYP3A4	1:750

CYP = sistema citocromo P-450.

3.4.1 Protocolo de imunohistoquímica

Os cortes foram desparafinados e desidratados. A recuperação antigênica foi feita através da transferência das lâminas para a cuba com tampão citrato pH 6,0, pré-aquecido a 60°C. Observou-se a saturação do vapor e a partir deste momento, as cubas foram transferidas com as lâminas para a câmara a vapor (*steammer*) por 25 minutos. O resfriamento das lâminas foi feito à temperatura ambiente, por aproximadamente 20 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS, por

5 minutos e feito o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio. As lâminas foram colocadas em solução de 3.5% de H₂O₂ a 30 volumes em PBS (3,5mL de H₂O₂ e 96,5mL de PBS), por 30 minutos.

Após o bloqueio, as lâminas foram novamente lavadas em PBS, por 5 minutos e secadas ao redor dos cortes, lâmina por lâmina. A um dos cortes foi adicionado PBS (controle) e ao outro o anticorpo primário. As lâminas foram colocadas em câmara úmida a 4°C, por 16h. As diluições dos anticorpos estão especificadas na tabela 4.

As lâminas foram lavadas novamente em PBS, utilizando garrafa de esguichos e imersas em banho de tampão PBS por 5 minutos, por duas vezes. O excesso de tampão foi enxugado, lâmina por lâmina e adicionado o complexo EnVision AP (DakoCytomation) em cada um dos cortes. O complexo EnVision AP, denominado *multi-link*, atua como anticorpo secundário, já que é um complexo que se liga a qualquer anticorpo primário. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 min, a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS, utilizando garrafa de esguichos e imersas em 2 banhos também de tampão PBS durante 5 min cada.

Para a revelação, foram transferidos 3mL de substrato tampão para um tubo e adicionado 1 tablete de *Permanent Red* (DakoCytomation). O tablete foi dissolvido e misturado. A área em torno dos cortes foi secada e a solução de cromógeno, acima descrita, foi adicionada sobre os cortes. Toda a reação do cromógeno no tecido foi acompanhada, sendo que as lâminas permaneceram em

contato com a solução por 5 a 30 segundos. Após reação do tecido com o cromógeno, as lâminas foram imersas em água destilada para interromper a reação, lavadas em água corrente durante 2 minutos e contra-coradas com Hematoxilina de Harris diluída a 1:10 durante 2 minutos. O excesso de hematoxilina foi removido por meio de lavagem em água corrente durante 5 minutos. Os cortes foram desidratados e as lâminas montadas com lamínula, para exame.

3.4.2 Contagem das áreas marcadas pelos anticorpos

Para a contagem da área marcada pelos anticorpos, foi utilizado o *software* KS400, usado para contagem e análises morfométricas. Foi determinada a área marcada pelo anticorpo, em μm^2 , em 30 campos de cada lâmina. O resultado das contagens está demonstrado nos anexos 1, 2 e 3. Os campos foram capturados seguindo o esquema abaixo:

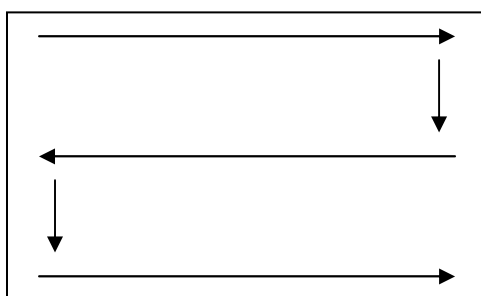


FIGURA 2 – Esquema de análise sequencial das lâminas. A área percorrida para captura dos campos e contagem da área marcada pelo anticorpo seguiu o sentido das setas.

A área marcada dos 30 campos capturados de cada lâmina foi calculada através da chamada imagem binária e anotada para posterior análise estatística (fig. 3).

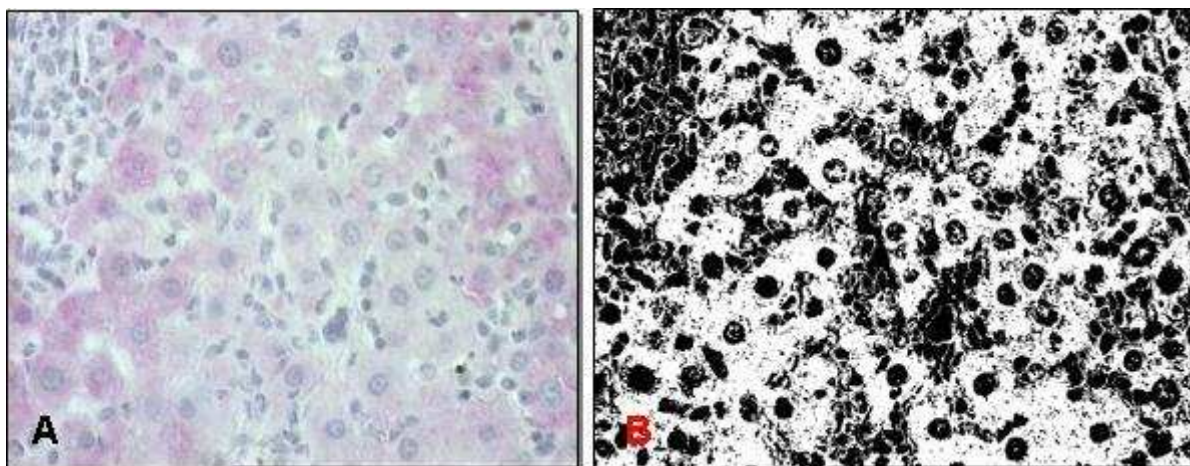


FIGURA 3 – Etapas para contagem da área marcada pelo anticorpo.

(A) Marcação imuno-histoquímica da enzima 2E1 de um animal com 50 dias de infecção. A cor rosa representa a marcação do anticorpo.

(B) Imagem binária do corte histológico ilustrado em A. A coloração em branco corresponde à marcação pelo anticorpo.

3.4.3 Análise Estatística

3.4.3.1 Avaliação da área marcada pelo anticorpo

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Prism 4.0. Foram utilizados dois testes diferentes: para análise da enzima CYP1A1, foi usado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn para múltiplas comparações. Para a análise das enzimas CYP2E1 e CYP3A4 foi usado o teste paramétrico ANOVA, seguido do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

Foram utilizados dois testes estatísticos distintos porque os valores da área marcada pelos anticorpos anti-CYP2E1 e anti-CYP3A4 apresentaram distribuição normal, diferindo daqueles obtidos pela marcação do anticorpo anti-CYP1A1, que apresentaram irregularidade no teste de normalidade.

RESULTADOS



2. RESULTADOS

4.1 Western blot

A figura 4 ilustra a expressão da isoenzima CYP1A1 na fração microsomal hepática. Conforme pode ser notado, essa isoforma não se alterou ao longo da infecção pelo *S. mansoni*, pois não houve diferença significativa na sua expressão nas fases aguda e crônica, nem após o tratamento com oxamniquine, em relação ao grupo controle.

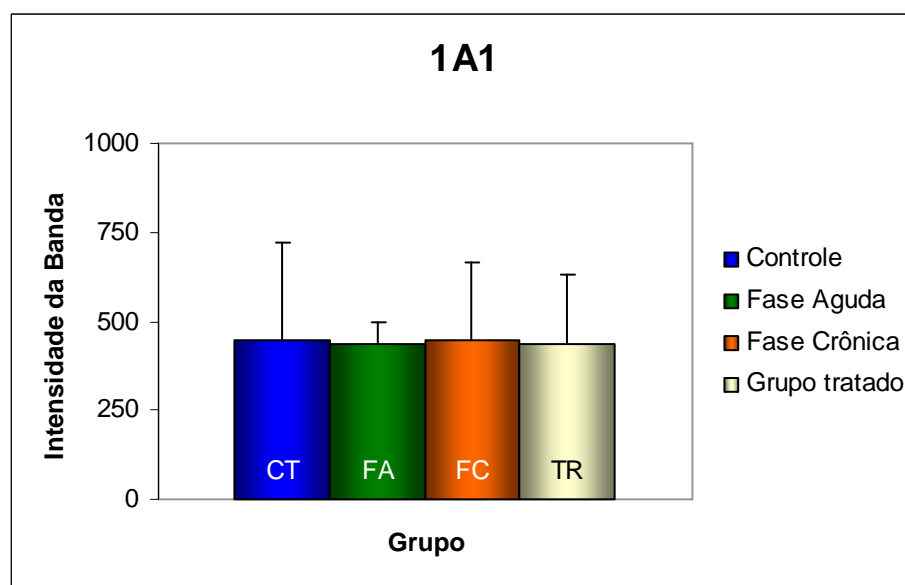


FIGURA 4 - Expressão dos níveis de CYP1A1 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

Não existe diferença entre os grupos ($p = 0,8798$).

A isoenzima CYP2E1 manteve o mesmo padrão de expressão nos grupos controle, fase aguda e fase crônica (fig. 5). Entretanto, no grupo tratado com oxamniquine, observa-se um aumento significativo da expressão desta isoenzima quando comparamos com os outros três grupos: controle, agudo e crônico (c = TR vs CT: $p < 0.001$; e = TR vs FA: $p < 0.05$; f = TR vs FC: $p < 0.05$).

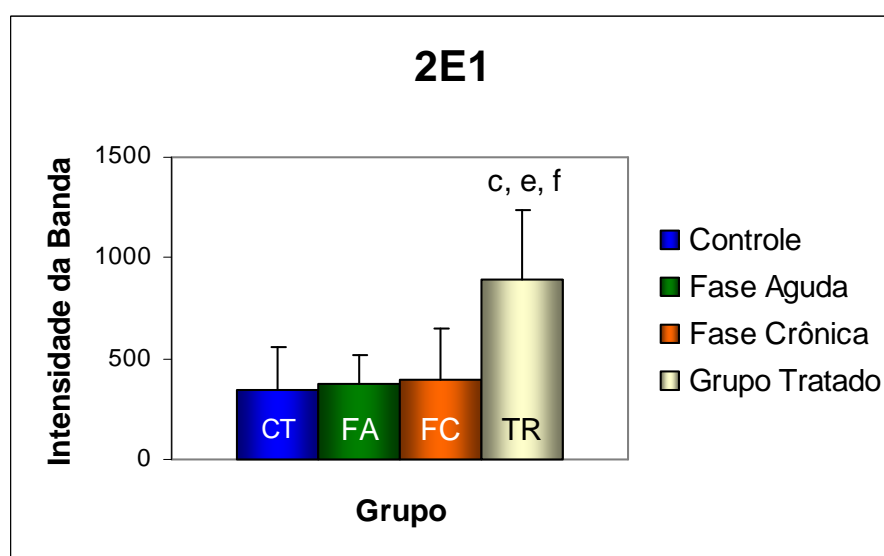


FIGURA 5 - Expressão dos níveis de CYP2E1 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

c = CT vs TR ($p < 0.001$); e = FA vs TR ($p < 0.05$); f = FC vs TR ($p < 0.05$).

O resultado da expressão da isoenzima CYP2A6 está resumido na figura 6. A comparação entre os grupos controle e tratado demonstrou que o tratamento aumentou a expressão da enzima ($p < 0.05$), enquanto nos das fases aguda e crônica da doença os valores não se alteraram.

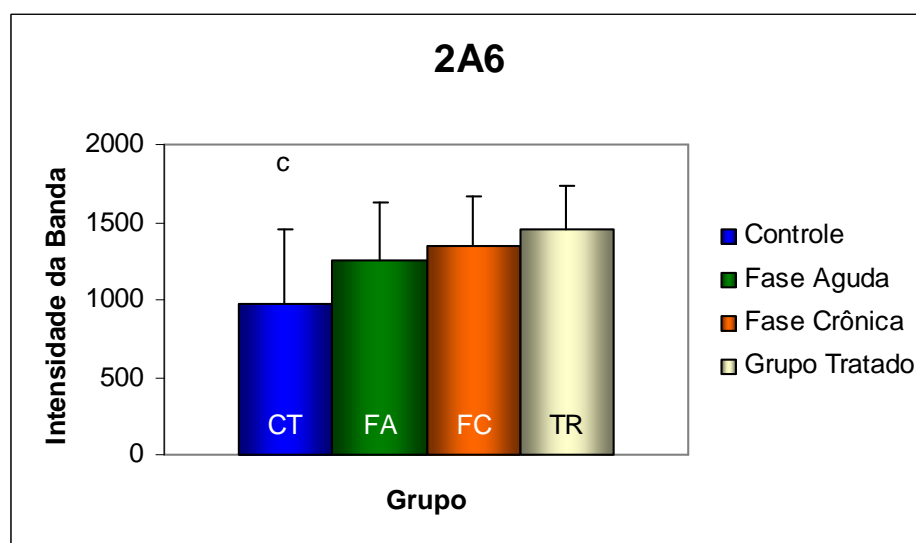


FIGURA 6 - Expressão dos níveis de CYP2A6 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

c = CT \neq TR ($p < 0.05$).

A enzima citocromo P-450 redutase apresentou nível de expressão aumentado nos camundongos infectados; após o tratamento houve uma redução da expressão desta enzima em relação ao grupo da fase aguda da infecção ($p < 0.05$) (fig. 7).

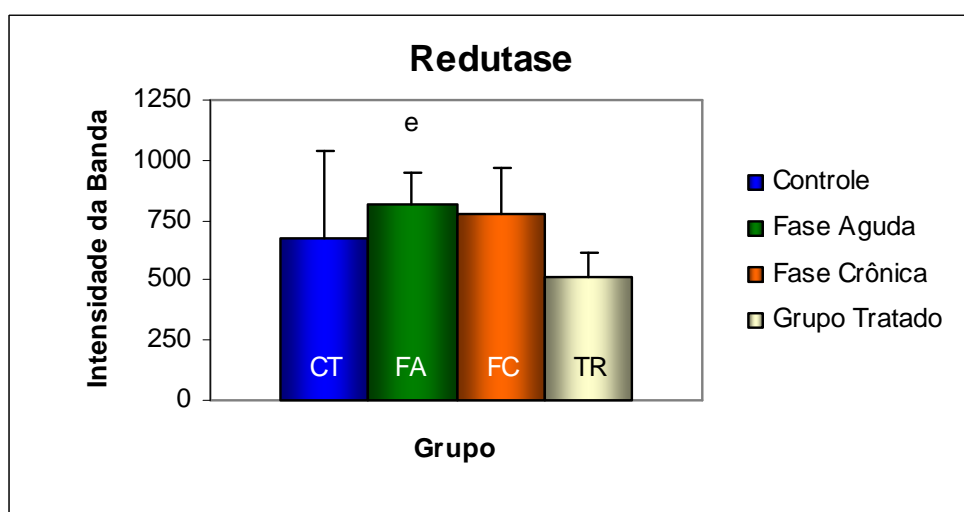


FIGURA 7 - Expressão dos níveis de redutase no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

e = FA \neq TR ($p < 0.05$).

O nível de expressão da isoenzima CYP2C11 está representado na fig. 8. O grupo da fase aguda apresentou menor nível de expressão desta isoenzima, diferindo significativamente dos grupos controle ($p < 0.001$), e da fase crônica ($p < 0.001$). Durante a fase crônica, o nível de expressão da isoenzima CYP2C11 se tornou semelhante aos níveis do grupo controle. O grupo tratado apresentou níveis significativamente menores de expressão quando comparado com os grupos controle ($p < 0.05$) e da fase crônica ($p < 0.05$).

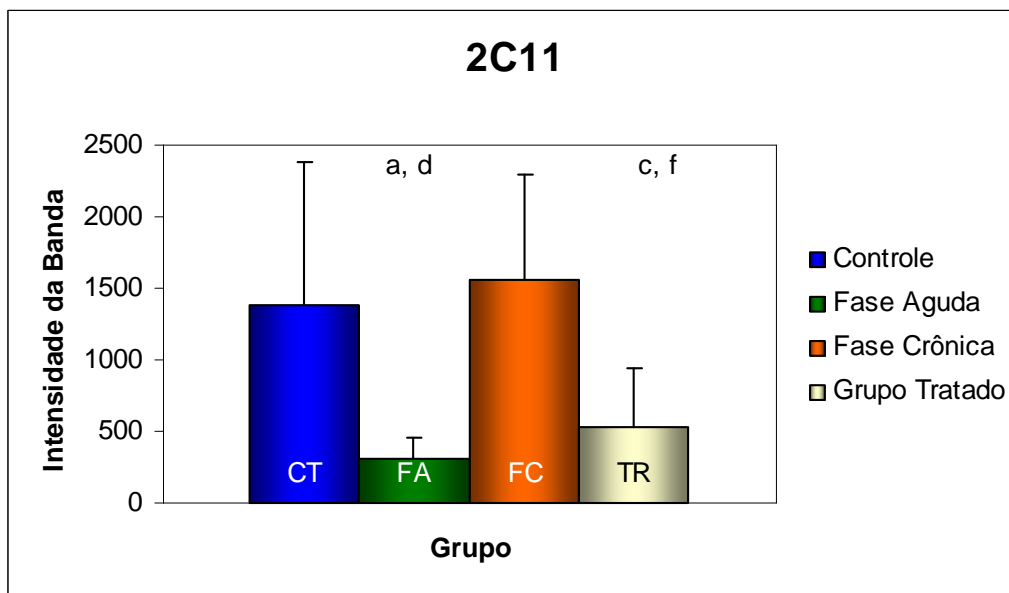


FIGURA 8 - Expressão dos níveis de 2C11 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

a = CT vs FA ($p < 0.001$); c = CT vs TR ($p < 0.05$); d = FA vs FC ($p < 0.001$); f = FC vs TR ($p < 0.05$).

A expressão da isoenzima CYP2B1 está ilustrada na figura 9. O gráfico mostra que a infecção pelo *S. mansoni* induz alterações diferentes durante o curso da infecção. Observa-se uma queda significativa nos níveis desta isoenzima durante a fase aguda da doença em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). Os níveis de expressão dessa enzima na fase crônica e após tratamento não foram significativos em relação ao grupo controle.

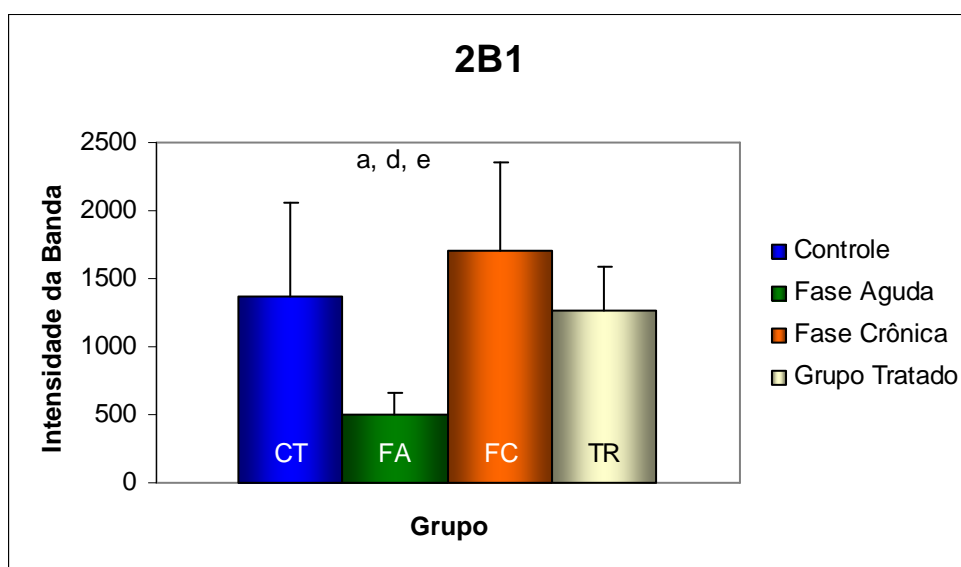


FIGURA 9 - Expressão dos níveis de 2B1 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

a = CT vs FA ($p < 0.01$); d = FA vs FC ($p < 0.001$); e = FA vs TR ($p < 0.05$).

A isoforma CYP3A2 apresentou maior nível de expressão durante a fase crônica da infecção quando comparada com os níveis dos grupos controle ($p < 0.01$) e da fase aguda ($p < 0.05$). Não houve diferença significativa entre o grupo tratado e os outros grupos estudados (fig. 10).

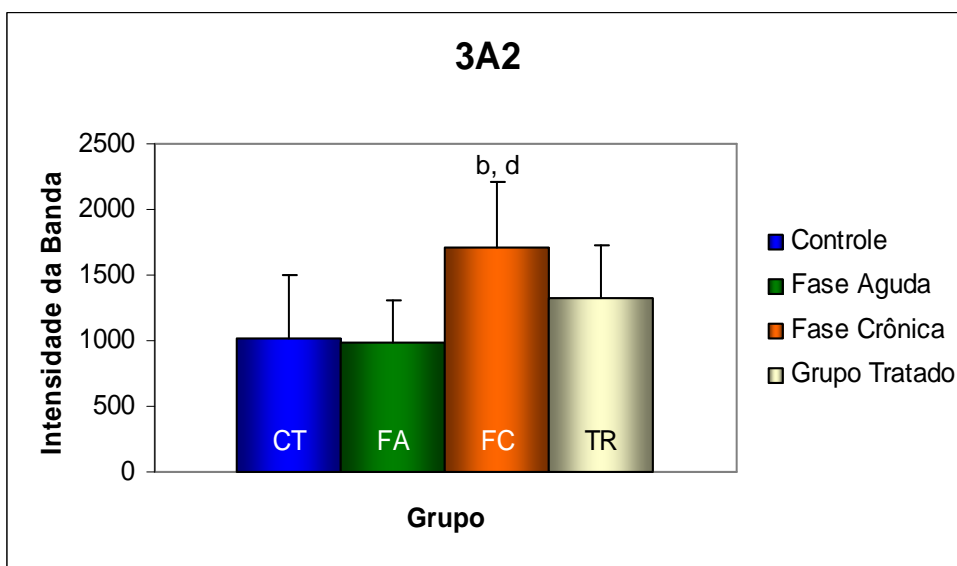


FIGURA 10 - Expressão dos níveis de 3A2 no sistema microsomal hepático. Os valores representam a média \pm DP nos grupos controle (CT), fase aguda (FA), fase crônica (FC) e grupo tratado (TR).

b = CT vs FC ($p < 0.01$); d = FA vs FC ($p < 0.05$).

4.2 Histologia convencional (HE)

A histologia do fígado do animal infectado por *S. mansoni*, com 30 dias de infecção (figura 11) apresentou-se bastante semelhante à histologia normal do fígado, vista em animais não infectados pelo parasito. A integridade do parênquima hepático está preservada sem indícios de aglomerado de células inflamatórias e de formação de granuloma esquistossomótico.

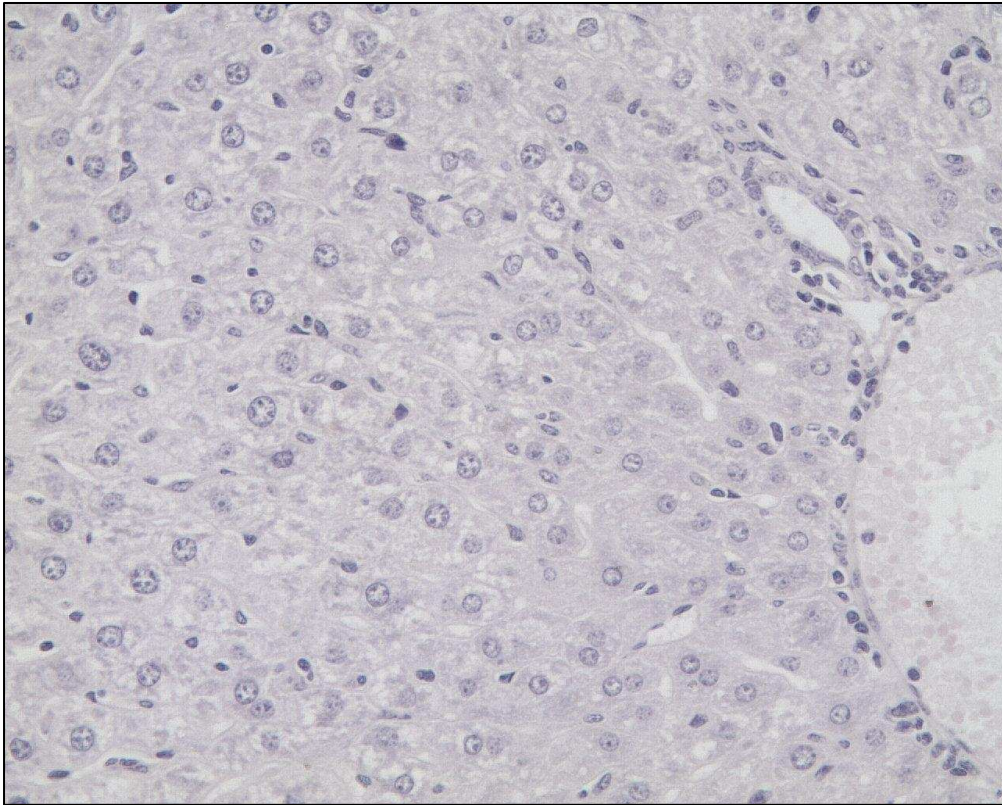


FIGURA 11 – Microscopia do fígado de animais com 30 dias de infecção. Notar a não ausência de aglomerado de células inflamatórias e de granulomas esquistossomóticos. Aumento: 400x. Coloração: hematoxilina-eosina (HE).

A figura 12 demonstra a histologia do fígado de um animal com 35 dias de infecção por *S. mansoni*. O corte permite visualizar o ovo do parasito (fig. 12A), demonstrando postura aos 35 dias de infecção. É também evidente a presença de grânulos castanho-escuros ou negros nas células de Kupffer, originados no tubo digestivo do *Schistosoma* a partir do sangue do hospedeiro e regurgitado pelo verme adulto (fig. 12B).

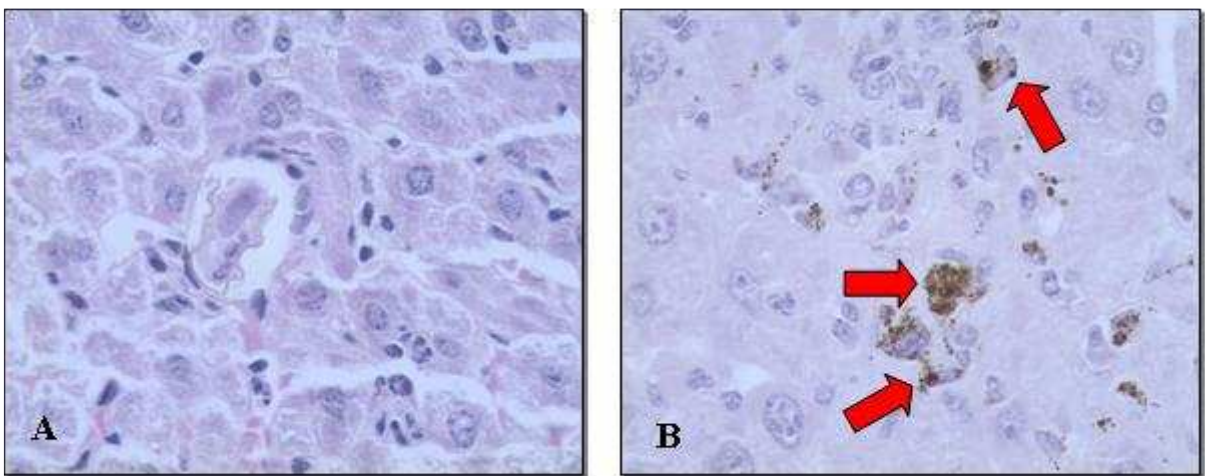


FIGURA 12 – Ovo e pigmento esquistossomótico em parênquima hepático. Animal com 35 dias de infecção por *S. mansoni*, demonstrando a postura dos ovos neste período de infecção (12A) e a presença de pigmentos esquistossomóticos nas células de Kupffer (12B). (Aumento: 1000x). Coloração: hematoxilina-eosina (HE).

A anatomia microscópica do fígado durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* caracteriza-se principalmente pelo granuloma esquistossomótico, com células inflamatórias presentes ao redor dos ovos do parasito (figura 13). Essa figura representa cortes histológicos de fígado de animais, apresentando granulomas em diferentes estágios evolutivos.

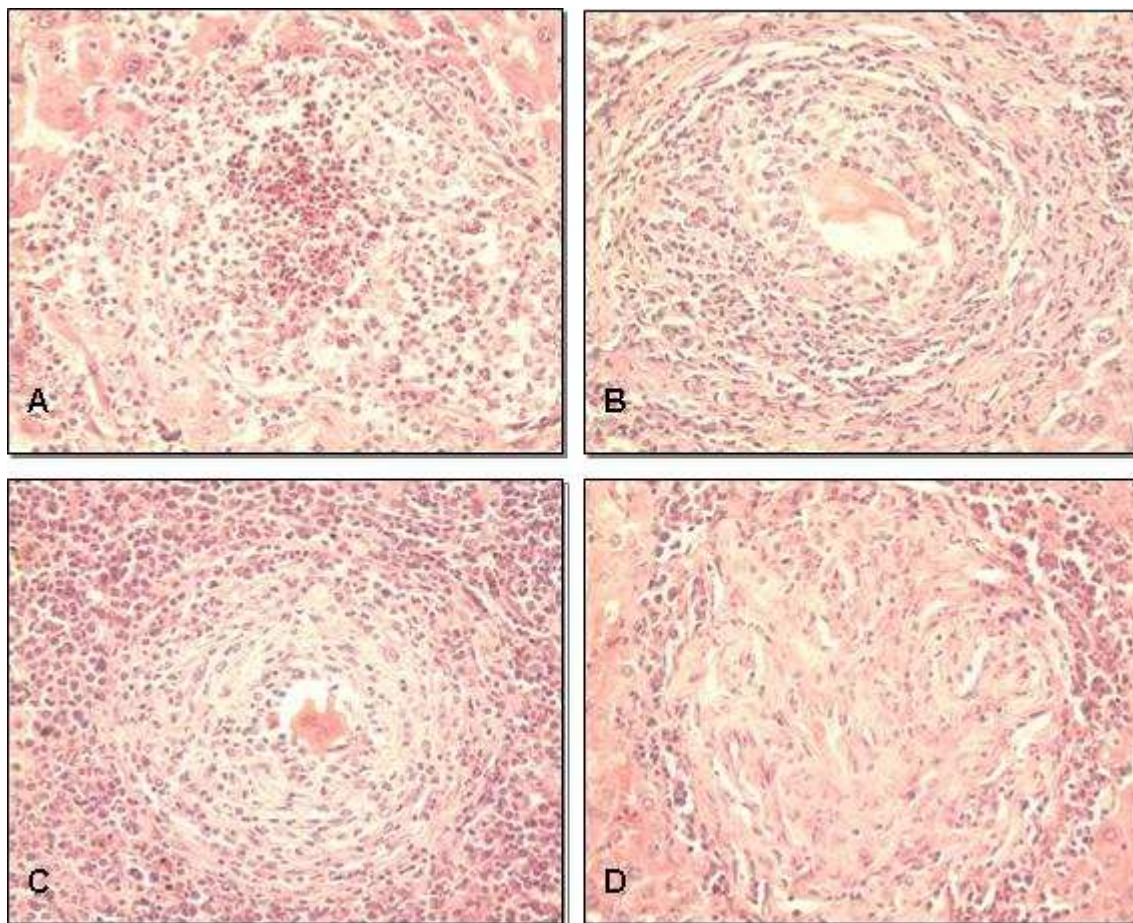


FIGURA 13 – Granulomas em fígado de camundongos infectados com 25 cercárias de *S. mansoni* em diferentes estágios evolutivos. Necrótico-exsudativo (A), exsudativo 1 (B), exsudativo 2, em processo de cicatrização por fibrose (D). A parte central corresponde ao ovo em torno do qual desenvolveu-se o granuloma. (Aumento: 400x). Coloração: hematoxilina-eosina (HE).

Observa-se na figura 14, em fígado de animal com 50 dias de infecção, a presença de um verme adulto do parasito localizado na luz de um vaso sanguíneo.

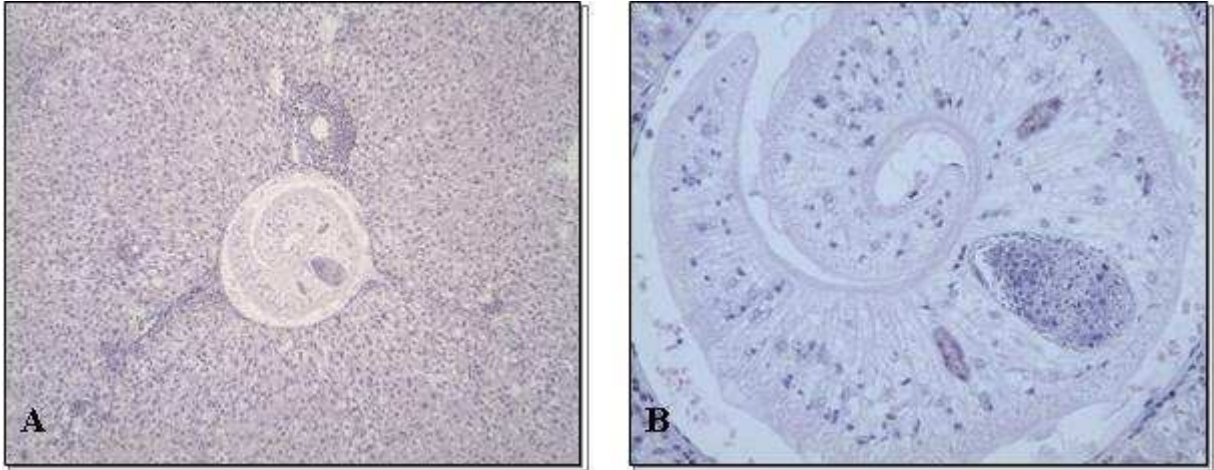


FIGURA 14 – Verme adulto de *S. mansoni* na luz de um vaso sanguíneo, em animal representante da fase aguda, com 50 dias de infecção. A reação inflamatória em torno do verme é bem mais discreta do que a desenvolvida em torno do ovo (A, aumento: 100x; B, aumento: 400x). Coloração: hematoxilina-eosina (HE).

4.3 Imuno-histoquímica

4.3.1 CYP1A1

As figuras 15 e 16 demonstram a marcação imuno-histoquímica da enzima CYP1A1 através da coloração rosa / vermelha no fígado de animais não infectados (controle), com 50 dias de infecção (fase aguda) e com 140 dias de infecção (fase crônica). Esta coloração se dá a partir da precipitação do cromógeno utilizado e permite quantificar a expressão da enzima estudada.

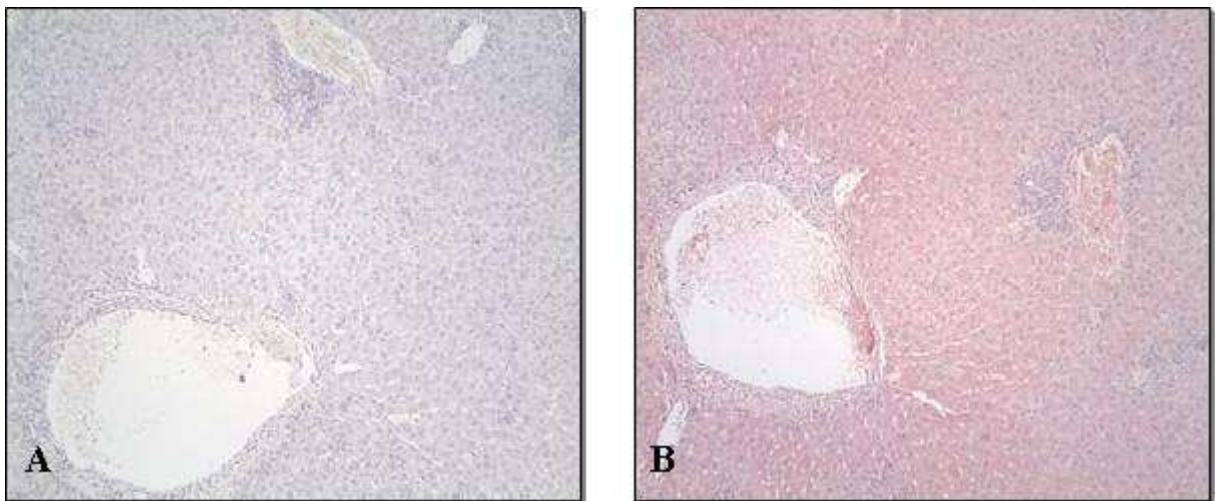


FIGURA 15 – Marcação imuno-histoquímica da enzima CYP1A1 e controle negativo. Controle negativo da reação (15A) e marcação da isoenzima 1A1 (15B), em animal com 50 dias de infecção por *S. mansoni* (A e B: aumento 100x).

A coloração rosa se dá pela precipitação do cromógeno *permanent red*. A foto ilustra um dos 30 campos analisados.

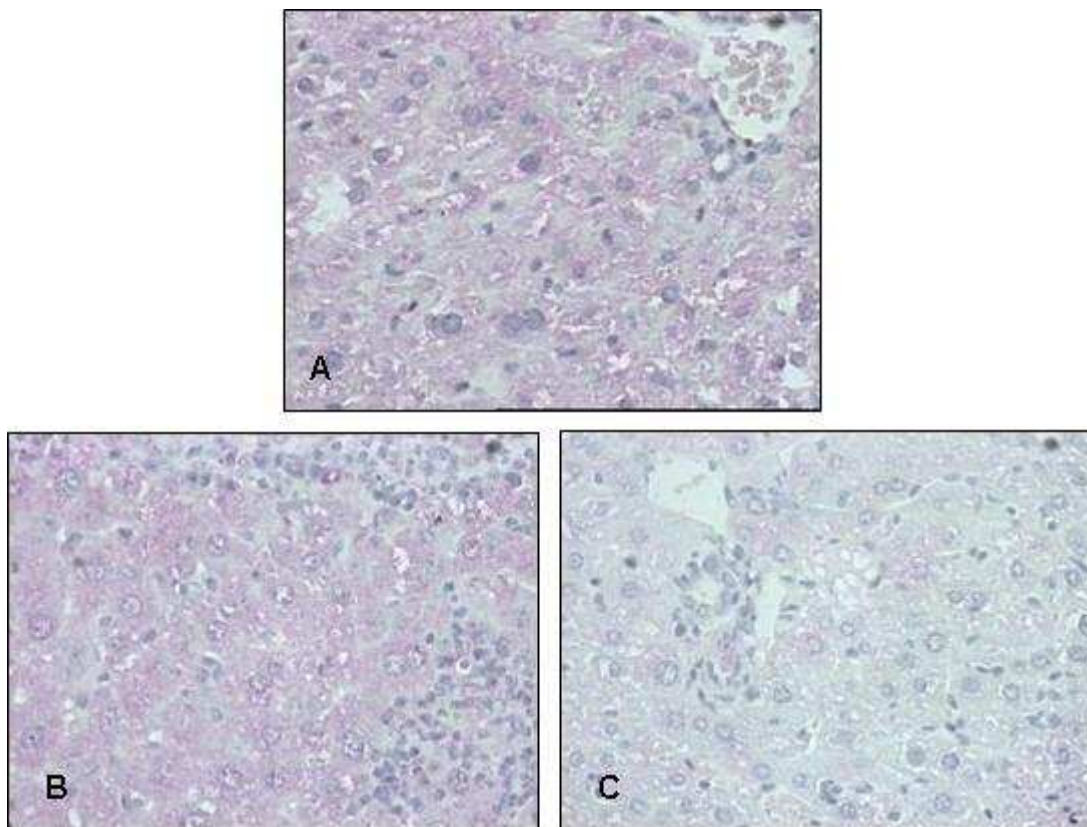


FIGURA 16 – Marcação imuno-histoquímica de CYP1A1 em parênquima hepático. Animal não infectado, grupo controle (A), animal na fase aguda (B) e animal na fase crônica da esquistossomose mansônica (C) (A, B e C, aumento: 400x).

As figuras acima não mostram o resultado final da estatística.

CYP1A1: sem diferença significativa entre as fases ($p = 0,5253$).

Na figura 17 estão apresentados os resultados das médias da área marcada pelo anticorpo anti-CYP1A1, nos diferentes dias de infecção por *S. mansoni*. Observa-se que a infecção não alterou a expressão da enzima CYP1A1 ($p = 0,8520$).

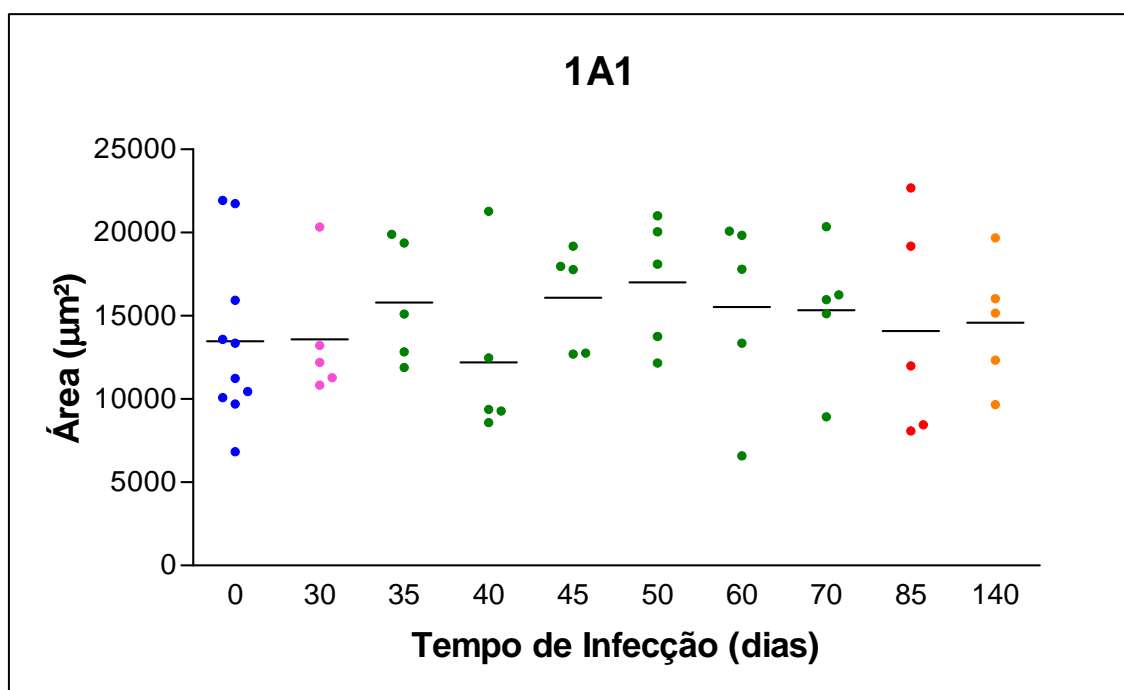


FIGURA 17 – Expressão dos níveis de CYP1A1 no sistema microssomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes dias de infecção por *S. mansoni*.

Os valores não diferem entre si ($p = 0,8520$). Os valores numéricos foram determinados a partir da média das áreas marcadas pelo anticorpo específico, informadas pela análise binária dos cortes histológicos.

Azul: grupo controle; **rosa:** 30 dias de infecção (pré-postural); **verde:** 35 a 70 dias de infecção (fase aguda); **vermelho:** 85 dias de infecção (intermediário); **laranja:** 140 dias de infecção (fase crônica).

4.3.2 CYP2E1

A figura 19 ilustra a marcação imuno-histoquímica da enzima CYP2E1 através da coloração rosa / vermelha. Esta coloração se dá a partir da precipitação do cromógeno utilizado e nos permite quantificar a expressão da enzima estudada.

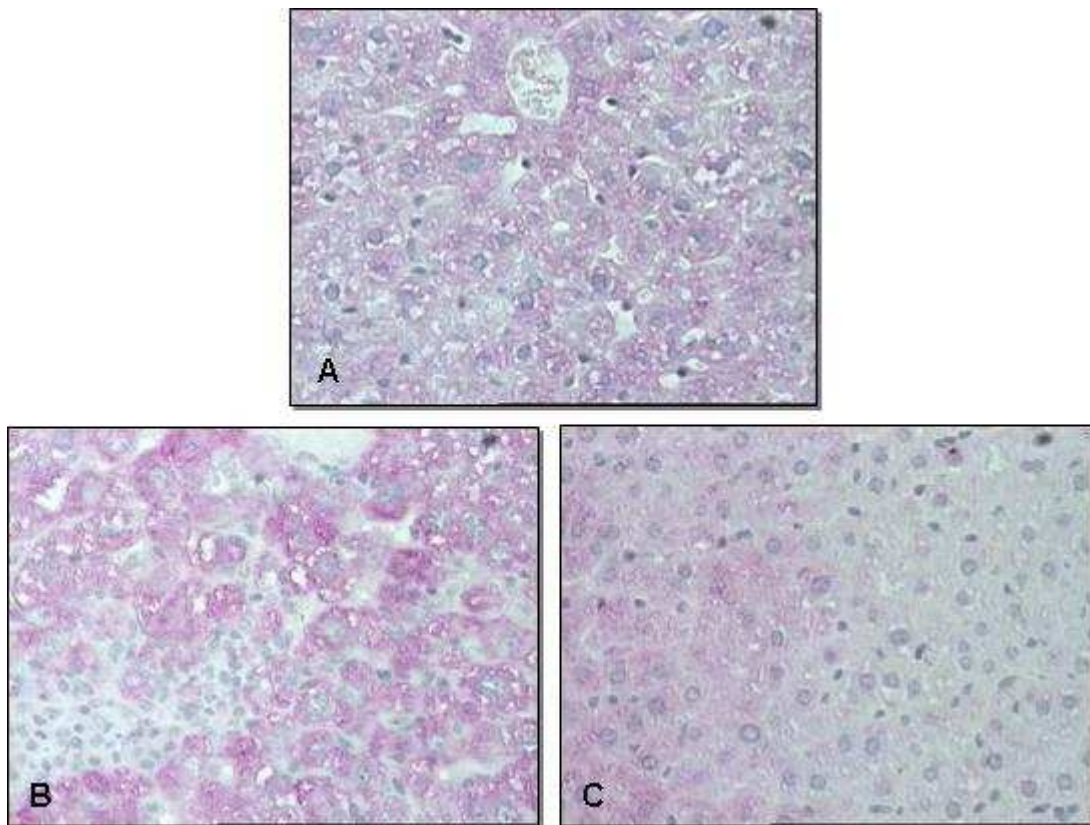


FIGURA 19 – Marcação imuno-histoquímica de CYP2E1 em parênquima hepático. Animal não infectado, grupo controle (A), animal na fase aguda (B) e animal na fase crônica da esquistossomose mansônica (C) (A, B e C, aumento: 400x).

As figuras acima não mostram o resultado final da estatística.

CYP2E1: fase pré-postural \neq grupo controle ($p = 0,0271$).

Na figura 20 estão resumidos os resultados da área marcada (μm^2) pelo anticorpo anti-CYP2E1, nos diferentes dias de infecção por *S. mansoni*. Nota-se que não houve diferença significativa entre os valores encontrados.

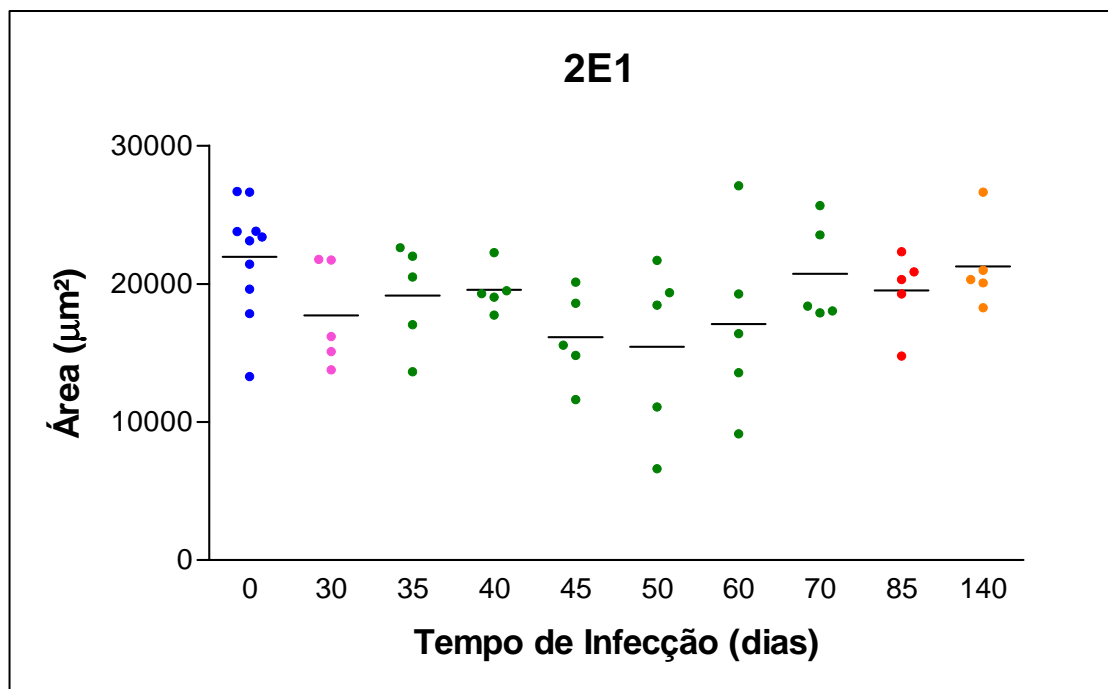


FIGURA 20 – Expressão dos níveis de CYP2E1 no sistema microssomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes dias de infecção por *S. mansoni*.

Os valores comparados foram semelhantes ($p = 0,1308$). Os valores numéricos foram determinados a partir da média das áreas marcadas pelo anticorpo específico, informadas pela análise binária dos cortes histológicos.

Azul: grupo controle; **rosa:** 30 dias de infecção (pré-postural); **verde:** 35 a 70 dias de infecção (fase aguda); **vermelho:** 85 dias de infecção (intermediário); **laranja:** 140 dias de infecção (fase crônica).

Na figura 21 encontra-se a comparação da expressão da enzima CYP2E1 nas 4 diferentes fases da infecção por *S. mansoni*. Nota-se que após a infecção por *S. mansoni*, houve uma diminuição significativa na expressão desta enzima quando comparados os grupos controle e fase aguda ($p = 0,0271$).

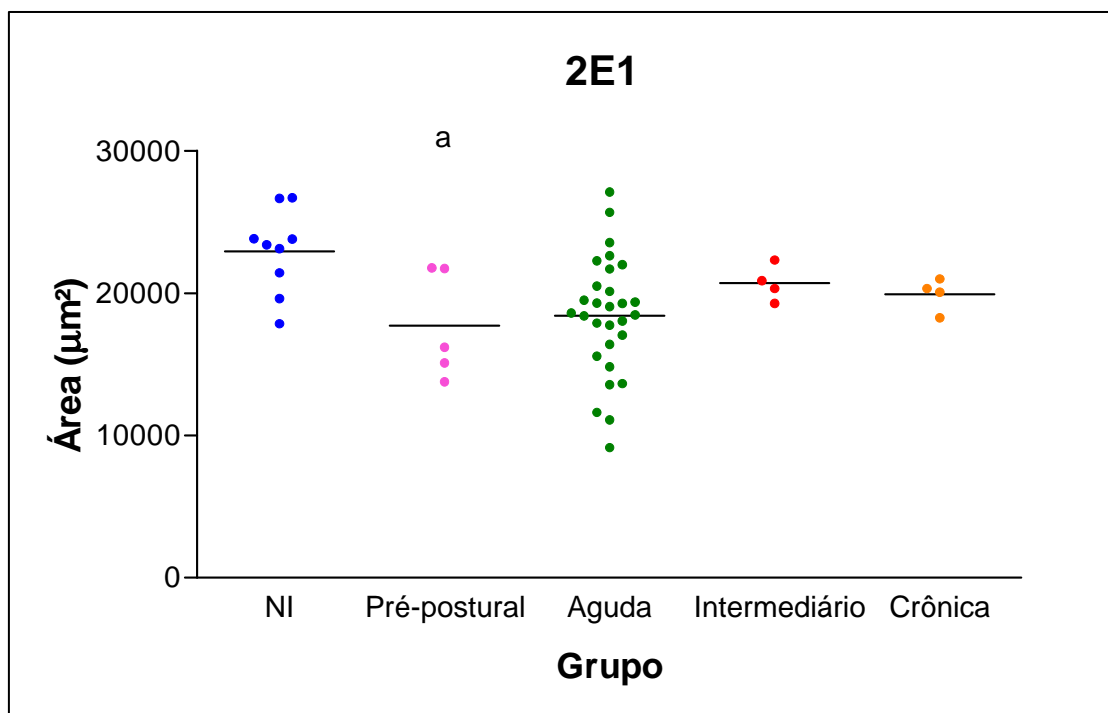


FIGURA 21 – Expressão dos níveis de CYP2E1 no sistema microsossomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em fases diferentes de infecção por *S. mansoni*.

a = significativamente diferente do grupo controle ($p = 0,0271$).

NI: grupo controle, não infectado; Pré-postural: 30 dias de infecção; Fase aguda: 35 a 70 dias de infecção; Intermediário: 85 dias de infecção; Fase crônica: 140 dias de infecção.

4.3.3 CYP3A4

A marcação imuno-histoquímica da enzima CYP3A4 através da coloração rosa / vermelha, em fígado de animal infectado pelo *S. mansoni* está ilustrada na figura 22.

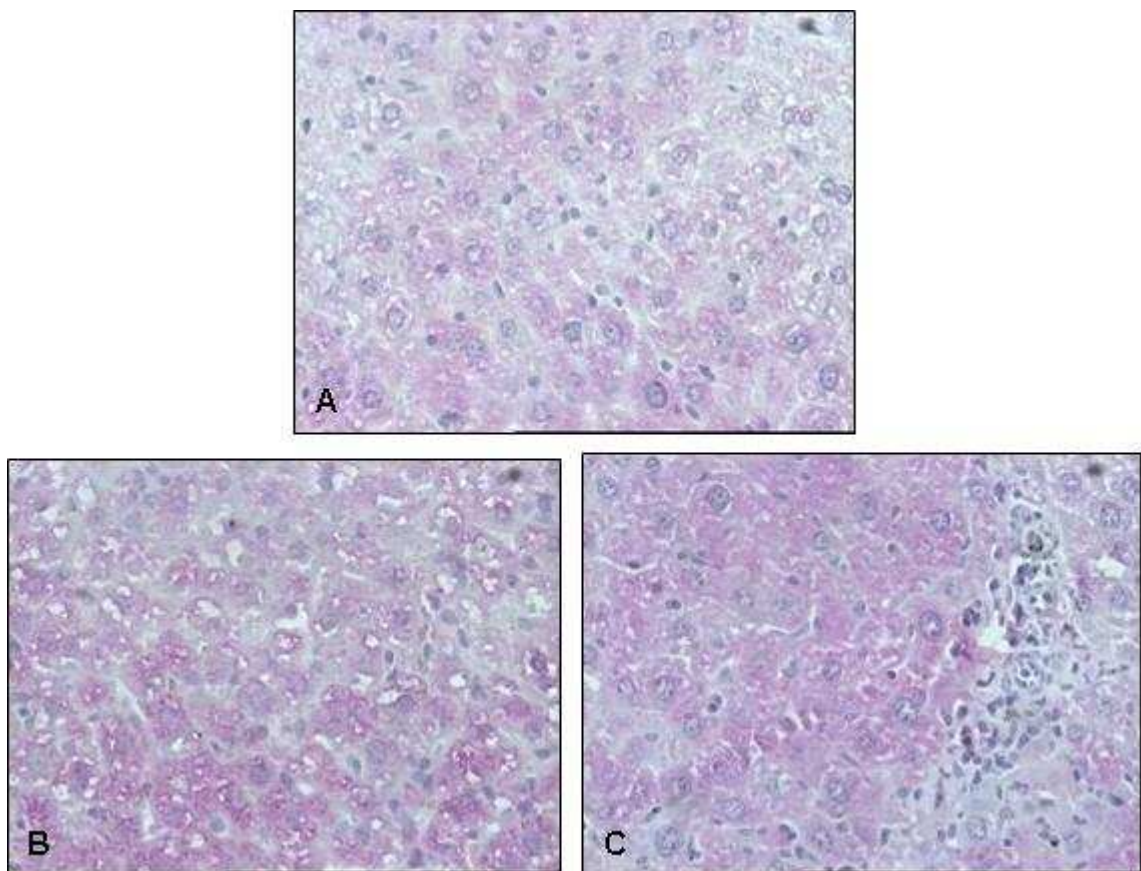


FIGURA 22 – Marcação imuno-histoquímica de CYP3A4 em parênquima hepático. Animal não infectado, grupo controle (A), animal na fase aguda (B) e animal na fase crônica da esquistossomose mansônica (C) (A, B e C, aumento: 400x).

As figuras acima não mostram o resultado final da estatística.
CYP3A4: fase pré-postural ≠ grupo intermediário ($p = 0,0301$).

Na figura 23 estão resumidos os resultados da área marcada (μm^2) pelo anticorpo anti-CYP3A4, nos diferentes dias de infecção por *S. mansoni*. Os valores não se apresentaram diferentes significativamente.

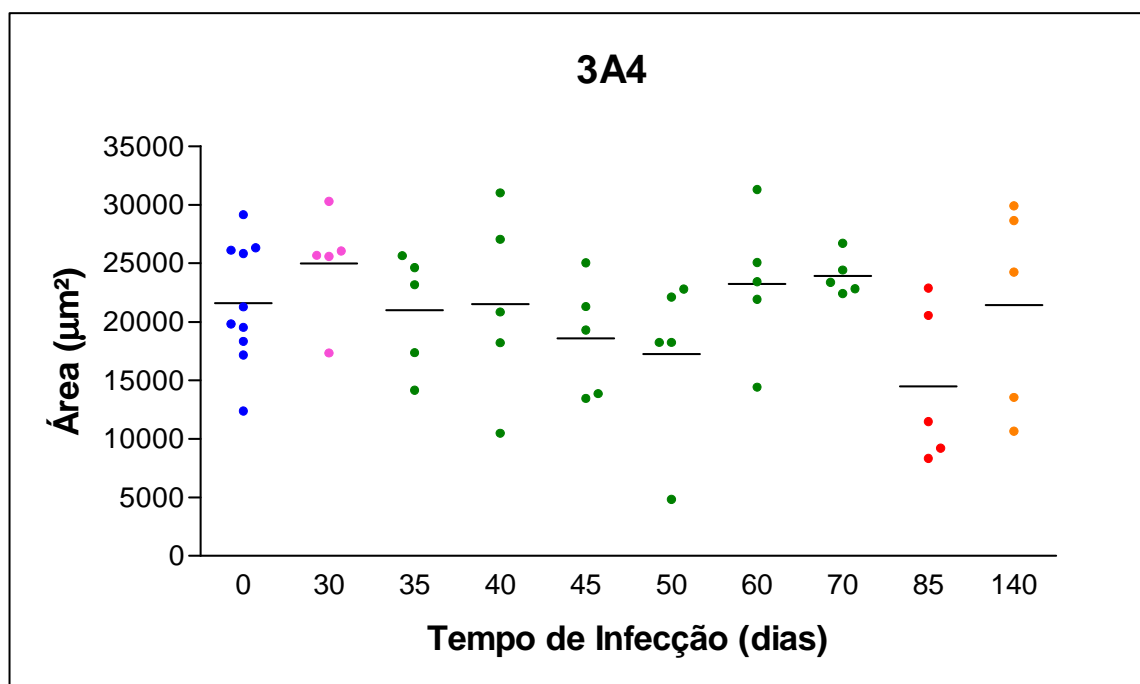


FIGURA 23 – Expressão dos níveis de CYP3A4 no sistema microssomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em diferentes dias de infecção por *S. mansoni*.

Os valores comparados apresentaram valor de $p = 0,2116$. Os valores numéricos foram determinados a partir da média das áreas marcadas pelo anticorpo específico, informadas pela análise binária dos cortes histológicos.

Azul: grupo controle; **rosa:** 30 dias de infecção (pré-postural); **verde:** 35 a 70 dias de infecção (fase aguda); **vermelho:** 85 dias de infecção (intermediário); **laranja:** 140 dias de infecção (fase crônica).

A comparação da expressão da enzima CYP3A4 entre as 4 diferentes fases da infecção por *S. mansoni* está representada na figura 24. Os valores foram significativamente diferentes entre os grupos de 30 dias e 85 dias de infecção ($p = 0,0301$).

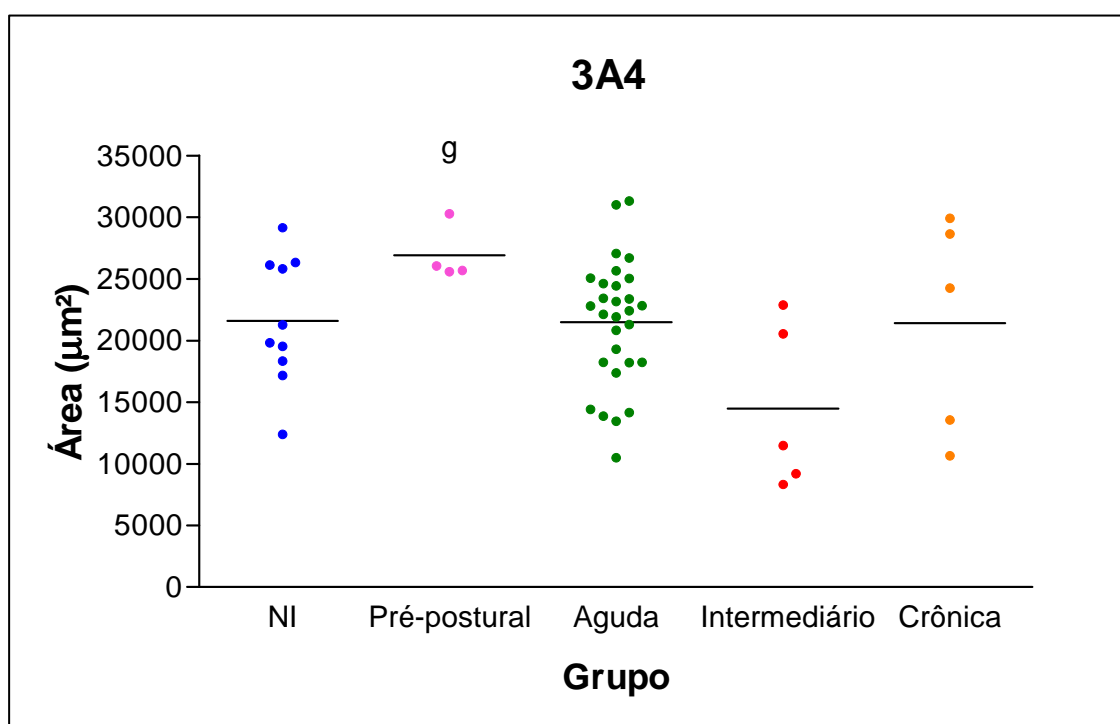


FIGURA 24 – Expressão dos níveis de CYP3A4 no sistema microssomal hepático. As barras transversais representam a média da área marcada em fases diferentes de infecção por *S. mansoni*.

g = significativamente diferente do grupo intermediário ($p = 0,0301$).

NI: grupo controle, não infectado; Pré-postural: 30 dias de infecção; Fase aguda: 35 a 70 dias de infecção; Intermediário: 85 dias de infecção; Fase crônica: 140 dias de infecção.

DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

O acometimento hepático na esquistossomose faz supor que possa ocorrer alteração das enzimas do sistema microssomal, incluindo as do sistema de citocromo P-450. Os experimentos preliminares sugeriram que várias dessas enzimas estão alteradas durante as fases aguda e crônica da infecção e que o tratamento da doença pode reverter, pelo menos em parte, esse quadro.

Vários estudos têm demonstrado que infecções por vírus, bactérias ou outros parasitas, bem como respostas inflamatórias, podem modificar os níveis e atividades de CYP em tecidos de mamíferos. Sabe-se que são vários os fatores que alteram a expressão de enzimas CYP, tais como a gravidade e o tempo da infecção, tipo de agente infeccioso ou inflamatório, sexo e a resposta do sistema por meio de indução ou inibição das enzimas (31, 62).

5.1 Metodologia

Alguns autores têm estudado alterações causadas pela esquistossomose mansônica, dependente da carga parasitária e de formas clínicas da infecção (aguda, crônica, intestinal, hepatoesplênica). O número de cercárias inoculadas utilizada no presente experimento foi de 25 cercárias/animal. Os estudos de expressão das enzimas CYP-450 em animais infectados com *Schistosoma*, em sua maioria, utilizam para infecção um número muito maior de cercárias (60, 120, 180,

300 e até mesmo 600 cercárias) (55, 56). Considerando que um camundongo pesa em média 25 gramas, a infecção com 25 cercárias corresponde, aproximadamente, a 1 cercária por grama de animal. Esse dado extrapolado, para um humano adulto de 70 kg, corresponderia a 70.000 cercárias, que constitui um número dificilmente encontrado na prática clínica. Por esse motivo, baseados na mortalidade decorrente da infecção e nos aspectos macro e microscópico do fígado dos animais infectados e no interesse do estudo da fase crônica da doença, preferiu-se não aumentar o número de cercárias inoculadas. Além disso, a ênfase deste trabalho foi o estudo das alterações causadas por *S. mansoni* no curso da doença, comparado ao grupo controle não-infectado e ao grupo tratado com oxamniquine e da cinética das possíveis alterações ocorridas ao longo do tempo. Esse enfoque o diferencia de outros trabalhos da literatura, nos quais as alterações enzimáticas em animais infectados com *S. mansoni* foram estudadas em fases mais avançadas da infecção sem a preocupação de verificar a evolução temporal das alterações (52, 53, 54, 59).

Para alguns autores, a fase aguda aparece em torno do 50º dia e dura até cerca de 120 dias após a penetração da cercária. No presente trabalho, a fase aguda foi considerada no período de 35 a 70 dias após a infecção e a fase crônica a partir do 140º dia de infecção. O período entre essas duas fases foi denominado fase de transição e foi caracterizado pelo estudo dos animais com 85 dias de infecção. O 30º dia de infecção foi retirado do grupo de fase aguda pelo fato de ainda não haver postura dos ovos nesta época, como demonstrado pela histologia convencional, embora não se possa ter certeza se alterações produzidas no organismo do hospedeiro pela presença dos vermes no sistema porta, possam já estar em curso.

Para a marcação imuno-histoquímica foi utilizado um kit, comercialmente disponível, no qual o anticorpo secundário se liga à enzima fosfatase alcalina e o cromógeno é o *permanent red*. Este kit apresenta a vantagem de evitar o *background* causado pela peroxidase e biotina endógenas, presentes em quantidade apreciável no tecido hepático, o que poderia comprometer a resolução dos achados microscópicos, dificultando a contagem da marcação imuno-histoquímica.

A metodologia utilizada na análise morfométrica, para contagem da área marcada pelos anticorpos, tem sido descrita em pesquisas relacionadas com imuno-histoquímica (63) e colorações de tricrômico de Gomori (64).

A técnica adotada no presente trabalho utilizou cortes de tecido, expressando a molécula alvo como controle negativo na ausência do anticorpo específico com a finalidade de controlar a reação imuno-histoquímica positiva nos cortes de fígado (65).

Ainda existem controvérsias em relação ao melhor marcador para cada enzima. Por exemplo, em ratos, as reações de PROD (pentoxiresorufina-O-despentilase) e BROD (benziloxiresorufina-O-desbenzilase) são catalisadas preferencialmente por isoformas CYP 2B1/2 em microssomos hepáticos induzidos por fenobarbital (66).

Em camundongos, entretanto, ainda não é totalmente claro que isoenzimas metabolizariam preferencialmente a pentoxiresorufina (PROD) e a

benziloxiresorufina (BROD). BROD seria um marcador melhor do que PROD para a atividade de isoformas da subfamília 2B em camundongos (67) que incluiria as isoenzimas CYP 2B9 e CYP 2B10. Mesmo com 83% de homologia entre si, tais isoformas apresentam grandes diferenças em sua regulação (68).

Várias reações têm sido utilizadas como marcadoras da isoenzima CYP 2E1, entre as quais a *N*-nitrosodimetilamina *N*-desmetilação (69), a anilina 4-hidroxilação (70) e a hidroxilação do *p*-nitrofenol (71). Esta última, além de ser de fácil execução, tem a vantagem de não envolver a manipulação de substância altamente genotóxica / carcinogênica (e.g. *N*-nitroso-dimetilamina) e não exigir grande quantidade de fração microsomal. Talvez por estas razões a hidroxilação do *p*-nitrofenol seja amplamente utilizada como marcadora da enzima CYP 2E1 (72).

5.2 Resultados

Tem sido descrito que, tanto em seres humanos como em animais de laboratório, infecções virais, bacterianas e parasitárias, e processos inflamatórios e vários tipos, alteram o metabolismo de fármacos e as atividades e níveis de expressão de várias isoformas de CYP no fígado, no rim e no cérebro (31, 73).

A isoenzima CYP 1A1 apresentou expressão muito semelhante nos dias de infecção estudados tanto em machos utilizados nos experimentos de *western blot* quanto em fêmeas, naqueles de imuno-histoquímica. A expressão de 1A1 foi reduzida em fêmeas, após um mês de infecção por *S. mansoni*, mas não nos

animais machos (59). A alteração observada por esses autores não tem uma explicação lógica se se considera que as alterações do sistema citocromo P-450 se devem à resposta inflamatória induzida pelo ovo presente no tecido hepático, o que só ocorre a partir do 35º dia de infecção (58). A ausência de alteração da isoforma 1A1, tanto em machos como em fêmeas no presente trabalho, parece indicar que essa enzima não é afetada pela infecção pelo *S. mansoni*, o que confirma apenas em parte os resultados de outros autores (59) e divergem dos constatados em outro trabalho (54) que, em camundongos machos, encontraram expressão inalterada da enzima 1A1 no 30º dia de infecção e a partir daí, com diminuição gradual, à medida que aumentava o tempo de infecção por *S. mansoni*. Essa diferença pode estar relacionada com a intensidade da infecção por *S. mansoni*, pois, estes autores infectaram os animais de estudo com 200 cercárias de *S. mansoni* e nos experimentos do presente trabalho o número de cercárias/camundongo foi de apenas 25, número 8 vezes menor do que o utilizado no trabalho referido.

A expressão da isoenzima CYP 2A6 demonstrou-se aumentada significativamente apenas no grupo tratado com oxamniquine. Porém, alguns autores têm visto que a expressão desta enzima foi aumentada na fase crônica da infecção esquistossomótica (59), o que não foi confirmado pelos nossos resultados.

A isoenzima 2B1 apresentou menor nível de expressão em animais da fase aguda da infecção e maior nível em animais da fase crônica e do grupo tratado. As diferenças observadas em relação a outros autores que estudaram a expressão dessa isoforma em camundongos com esquistossomose podem ser explicadas pela dificuldade técnica na marcação da enzima pelo anticorpo. Por exemplo, no mesmo

grupo de animais, a marcação por BROD (benzyloxy) demonstrou um aumento significativo em fêmeas com 30 dias de infecção, diferindo da marcação por PROD (pentoxyl), onde a expressão nos animais infectados foi semelhante à expressão do grupo controle (não-infectado) (59).

A expressão desta isoenzima aumentou em animais com 6 dias de infecção, seguida de redução de expressão aos 45 dias de infecção (54). Este resultado está de acordo com os dados do presente trabalho, pois verificou-se diminuição da expressão na fase aguda da doença. Fica difícil a análise em tempos inferiores a 30 dias de infecção, porquanto os animais só começaram a ser sacrificados após 30 dias de infecção. Além disso as dificuldades metodológicas acima apontadas podem ter contribuído para alguma divergência de dados quando confrontados com os da literatura.

A isoenzima CYP 2E1, nos machos, apresentou expressão semelhante nas fases aguda e crônica quando comparadas entre si e ao grupo controle. Contudo nos animais tratados com oxamniquine notou-se um aumento significativo dessa enzima ($p < 0,05$). Este resultado corresponde ao constatado por alguns autores, que demonstraram o aumento do conteúdo de CYP-450 causado pela administração de oxamniquine (41). É possível que o tratamento induza uma remodelação da fibrose observada nos animais infectados e esse fenômeno possa alterar a expressão das enzimas CYP-450.

Em fêmeas, a expressão da isoenzima 2E1 não foi alterada em dias diferentes de infecção. Este resultado está de acordo com a literatura, onde foi também encontrada semelhança na expressão dessa isoenzima, em animais fêmeas infectadas com 15 e 30 dias (59). Ao se agruparem os dados de acordo com as fases da infecção, a isoenzima 2E1 mostrou redução da expressão da enzima na fase aguda em relação ao grupo controle ($p = 0,0271$). Na fase crônica, antes e após o tratamento, os níveis dessa enzima voltaram aos valores controle.

A expressão de isoenzima 3A2, em machos, pelo *western blot* apresentou um aumento significativo na fase crônica da infecção, quando comparada com os grupos controle e fase aguda. Pela imuno-histoquímica a isoenzima 3A4, quando estudada em animais agrupados de acordo com as fases da infecção, em fêmeas, apresentou diferença entre a fase pré-postural no 30º dia após infecção e a fase de transição no 85º dia. Estes achados estão de acordo com resultados descritos por alguns autores, que demonstraram a diminuição na expressão da subfamília 3A, com o decorrer do tempo de infecção (53).

A expressão da P-450 redutase foi maior na fase aguda e menor no grupo tratado com oxamniquine ($p < 0,05$). Esse fato é inesperado, pois o conteúdo da enzima redutase é inversamente proporcional ao peso do fígado (52, 58) e este tende a diminuir com o tratamento. Como a infecção pelo *S. mansoni* produz hepatomegalia, o lógico seria encontrar níveis menores dessa enzima na fase aguda (maior peso do fígado) do que após o tratamento.

Grande parte dos estudos da expressão de CYP-450 no sistema microsomal hepático é feito de forma mais genérica. Ou os autores pesquisam tais enzimas a partir dos seus substratos (54, 59) ou a partir do conteúdo total de citocromo P-450, através de espectroscopia. (43). Esse fato dificulta a comparação de resultados utilizando diferentes métodos. Nenhum dos trabalhos encontrados usou a técnica de imuno-histoquímica e muito poucos a técnica de *western blot*.

A intensidade da imuno-marcação demonstrada nas fotografias (figuras 16, 19 e 22) não reflete, necessariamente, os resultados obtidos pela análise estatística. Isso é explicado pelo fato de terem sido capturados e analisados 30 campos da lâmina de cada animal, sendo que cada grupo constava de pelo menos 5 animais estudados. As figuras são somente para ilustração da marcação imuno-histoquímica dos anticorpos pesquisados e a análise subjetiva da intensidade de coloração pode não refletir o padrão demonstrado pela leitura das cores através de sensores do programa utilizado. Os valores numéricos das análises binárias encontram-se nos anexos.

Os mecanismos subjacentes à depressão ou indução da expressão das isoenzimas CYP-450, ainda não são bem conhecidos. A literatura sobre o assunto é vasta, mas dispersa pelo uso de inúmeros agentes infecciosos ou inflamatórios, em diferentes momentos de evolução da doença e pelo método de detecção variável das isoformas.

5.3 Perspectivas Futuras

O presente trabalho abre possibilidades de estudos mais elaborados com relação ao sistema citocromo P-450. Poder-se-á em uma próxima etapa, estudar a cinética das alterações da expressão das enzimas estudadas neste trabalho, pela técnica de *western blot*, para confirmar os dados obtidos pela imuno-histoquímica. Uma outra abordagem a ser desenvolvida é a determinação da atividade enzimática dessa família de enzima.

Em termos de aplicação clínica, podem ser conduzidos experimentos utilizando a mesma abordagem metodológica em fígados de receptores de transplantes hepáticos para caracterizar o comportamento do sistema CYP-450 nos diferentes tipos de afecções que levam a insuficiência hepática grave naqueles pacientes. Essas perspectivas ampliam a linha de investigação, com possibilidade de avanço do conhecimento na área e inserção de novos projetos de pesquisa para o seu desenvolvimento.

CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

- 1) A esquistossomose mansônica é capaz de alterar a expressão das enzimas do sistema citocromo P-450, em camundongos, no decorrer da infecção.
- 2) Animais na fase aguda da esquistossomose mansônica murina apresentaram inibição e, na fase crônica, aumento da expressão das isoenzimas CYP2B1 e CYP3A2, quando comparados com animais controle.

REFERÊNCIAS



7. REFERÊNCIAS

1. Davis A. Schistosomiasis. In: Cook GC, editor. Manson's Tropical Diseases. Saunders; 1996. 1413-56.
2. Prata, A. Esquistossomose Mansonii. In: Veronesi R, Focaccia R, editors. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 1997. 1354-72.
3. World Health Organization. Epidemiology and control of schistosomiasis. WHO. Technical Report Series, Geneve: TDR Communications, n. 830, 135p, 1993.
4. Faust EC. An inquiry into the ectopic lesions in schistosomiasis. Am J Trop Med Hyg 1948; 28:175-99.
5. Raso P, Bogliolo L. Patologia. In: Cunha AS, editor. Esquistossomose mansonii. São Paulo: Sarvier; 1970. p.77-130.
6. Bogliolo L. Inflamações granulomatosas. In: Bogliolo L, editor. Patologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1976. p.123-50.
7. Von Lichtenberg F. Consequences of infections with schistosomes. In: Rollinson D, Simpson AJG, editors. The biology of schistosomes; from genes to latrines. London: Academic Press; 1987. p.185-232.
8. Bogliolo L. Patologia da esquistossomose. Rev Bras Malariol Doenças Trop 1959;11:359-424.
9. Pessoa SB. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1954. 1026p.
10. Raso P, Bernardes RC, Tafuri WL, Bogliolo L, Neves J. As dimensões do granuloma causadas pelos ovos do Schistosoma mansonii no fígado humano. Rev Soc Bras Med Trop 1978;12:45-9.
11. El-Garem, AA. Schistosomiasis. Digestion 1998; 59:589-605.
12. Grimaud JA, Borojevic R. Chronic human schistosomiasis mansonii: pathology of the Disse's space. Lab Invest 1977 ;36:268-73.
13. Warren KS. The kinetics of hepatosplenic schistosomiasis. Semin Liver Dis 1984; 4:293-300.
14. Dunn MA, Kamel R. Hepatic schistosomiasis. Hepatology 1981; 1:653-61.
15. Warren KS. The relevance of schistosomiasis. N Engl J Med 1980; 303:203-6.
16. Andrade ZA, Santana Filho, Rebouças G. Patologia da esquistossomose avançada. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962; 4:170-9.

17. Andrade ZA. Hepatic schistosomiasis morphologic aspects. In: Popper H, Schanffner F, editors. USA: Reprint from Progress in Liver Diseases; 1964.
18. Rodriguez HF, Garcia-Palmieri MR, Rivera JV, Rodriguez-Molina R. A comparative study of portal and bilharzial cirrhosis. *Gastroenterology* 1955; 29:235-46.
19. Von Lichtenberg F. Portal hypertension and schistosomiasis. *Ann NY Acad Sci* 1970; 170:100-14.
20. Dias LB, De Paola D, Silva JA. Esquistossomose experimental no camundongo: histogênese do granuloma esquistossomótico. *Rev Inst Med Trop* 1962; 4:140-148.
21. Bogliolo L. Fígado e vias biliares. In: Bogliolo L, editor. *Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1972. p.166-71.
22. Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958; 75:376-386.
23. Garfinkle, D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 1958; 77:493-509.
24. Gonzalez, F. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev* 1988; 40:243-288.
25. Juchau, MR. Substrate Specificities and functions of the P450 cytochromes. *Life Sci* 1990; 47:2385-94.
26. Ryan DE, Levin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Ther* 1990; 45:153-239.
27. Ioannides C. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. New York: CRC Press; 1996.
28. Oinonen T, Lindros KO. Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *Biochem J* 1998; 329:17-35.
29. Werck-Reichhar D, Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 2000; 1:1-9.
30. Campbell WB, Halushka PV. Autacóides Derivados dos lipídios In: Goodman LG, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996. Cap 26. p.438-40.
31. Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 1997; 29:1129-88.

32. Halpert JR, Guengerich FP, Bend JR, Correia MA. Selective inhibitors of cytochromes P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 125:163-75.
33. Correia, MA. Biotransformação dos Medicamentos. In: Katzung, BG. *Farmacologia básica e clínica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994. Cap 4. p.37-45.
34. Elsheikh HA, Kheir WM, Abdullah AS. The effect of praziquantel on the hepatic activities of some drug-metabolizing enzymes in rabbits experimentally infected with *Schistosoma bovis*. *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20:411-4.
35. Ko J, Skhova N, Thacker D, Chen P, Flockhart DA. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos* 1997; 25:853-62.
36. Stanley LA, Adams DJ, Balkwill FR, Griffins D, Wolf CR. Differential effects of recombinant interferon α on constitutive and inducible cytochrome P450 isozymes in mouse liver. *Biochem Pharmacol* 1991; 42:311-20.
37. Carelli M, Porras MC, Rizzardini M, Cantoni L. Modulation of constitutive and inducible hepatic cytochrome(s) P-450 by interferon α in mice. *J Hepatol* 1996; 24:230-7.
38. Villard PH, Seree EM, Re JL, De Meo M, Barra Y, Attolini L, Dumenil G, Catalin J, Durand A, Lacarelle B. Effects of tobacco smoke on the Gene Expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e, and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 148:195-204.
39. Mostafa MH, El-Bassiouni EA, El-Sewedy SM, Akhnouk S, Tawfic T, Abdel-Rafee, A. Hepatic Microsomal Enzymes in *Schistosoma mansoni*-infected mice: I. Effect of duration of infection and lindane administration on dimethylnitrosamine demethylases. *Environ Res* 1984; 35:154-9.
40. El-Bassiouni EA, Mostafa MH, El-Sewedy SM, El-Meligy S, Abdel-Aziz T e Abdel-Rafee A. Hepatic microsomal enzymes in *S. mansoni* infected mice: II. Effect of duration of infection and lindane administration on aminopyrine demethylase and aniline hydroxylase. *J Environ Sci Health B* 1984; 19:193-207.
41. Mostafa MH, Swelen SM & Farag HF. Modification of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome c reductase and aryl hydrocarbon hydroxylase activities by schistosomicidal drugs. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:251-5.
42. Sewer MB, Koop DR, Morgan ET. Endotoxemia in rats is associated with induction of the P4504A subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* 1996; 24:401-7.
43. Omura T & Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964; 239:2370-8.

44. Nebert, DW & Russel DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002; 360:1155-62.
45. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. 904p.
46. Gonzalez FJ, Kimura S. Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutat Res* 2001; 477:79-87.
47. Kirby GM, Batist G, Alpert L, Lamoureux E, Cameron RG, Alaoui-Jamali MA. Overexpression of cytochrome P-450 isoforms involved in aflatoxin B1 bioactivation in human liver with cirrhosis and hepatitis. *Toxicol Pathol* 1996; 24:458-67.
48. Pasanen M, Rannala Z, Tooming A, Sotaniemi EA, Pelkonen O, Rautio A. Hepatitis A impairs the function of human hepatic CYP2A6 in vivo. *Toxicology* 1997; 123:177-84.
49. Farrell GC, Cooksley WGE, Powell LW. Drug metabolism in liver disease: activity of hepatic microsomal metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 26: 483-92.
50. Piken E & Hepner GW. Decreased hepatic microsomal reserve in patients with cirrhosis: studies using aminopyrine as model drug. *J Lab Clin Med* 1979; 94:947-54.
51. Tekwani BL, Shukla OP e Ghatak S. Altered drug metabolism in parasitic diseases. *Parasitology Today* 1988; 4:4-10.
52. Cha Y e Edwards. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on the hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 199:432-40.
53. El-Mouelhi M, Black M, Phillips SM. Hepatic cytochrome P-450 system in experimental hepatosplenic schistosomiasis: presence of an artifact in spectrophotometric analysis. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:2621-6.
54. Sheweita SA, Mubark J, Doenhofe MJ, Mostafa MH, Margison GP, O'Connor PJ, Elder RH. Changes the expression of cytochrome P450 isozymes and related carcinogen metabolizing enzyme activities in *Schistosoma-mansoni* infected mice. *J Helminthol* 2002; 76:71-8.
55. Sheweita SA, Mangoura SA e El-Shemi AG. Different levels of *S. mansoni* infection induce changes in drug-metabolizing enzymes. *J Helminthol* 1998; 72:71-7.
56. 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; 163:213-8.
57. Cha, YN. Inducibility of the hepatic drug-metabolizing capacity of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27:1181-7.

58. Cha YN, Bryam JE, Heine HS & Bueding E. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on hepatic drug-metabolizing capacity of athymic nude mice. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:234-8.
59. Manhães-Rocha DA, Conte FP, Fidalgo-Neto AA, De-Oliveira AC, Ribeiro-Pinto LF, Paumgarten FJ. Alterations of hepatic microsomal enzymes in the early phase of murine schistosomiasis. *Acta Trop* 2005; 95:58-66.
60. De-Oliveira ACAX, Fidalgo-Neto AA, Paumgarten FJR. In vitro inhibition of liver monooxygenases by α -ionone, 1,8-cineole, (-)-menthol and terpinol. *Toxicology* 1999; 135:33-41.
61. Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
62. Renton, KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Ther* 2001; 92:147-63.
63. Caliari MV, do Pilar Machado R, de Lana M, Caja RA, Carneiro CM, Bahia MT, dos Santos CA, Magalhaes GA, Sampaio IB, Tafuri WL. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44:273-8.
64. Caliari MV, de Lana M, Cajá RAF, Carneiro CM, Bahia MT, Santos CAB, et al. Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Virchows Arch* 2002; 441:69-76.
65. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and Quantification of Immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1204-7.
66. Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT. Cytochrome P450 Specificities of Alkoxyresorufin-O-dealkylation in Human and Rat Liver. *Biochem Pharmacol* 1994; 48:923-36.
67. Nerukar PV, Park SS, Thomas PE, Nims RW, Lubet RA. Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochem Pharmacol* 1993; 46:933-43.
68. Honkakoski P, Kojo A, Lang MA. Regulation of the mouse liver cytochrome P450 2B subfamily by sex hormones and phenobarbital. *Biochem J* 1992; 285:979-83.
69. Yang CS, Patten CJ, Ishizaki H, Yoo JS. Induction, purification and characterization of Cytochrome P450 IIE. *Methods Enzymol* 1991; 206:595-603.
70. Funae Y, Imaoka S. Cytochrome P450 in rodents. In: Schenkman JB & Greim H, editors. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag: Heidelberg; 1993.

71. Reinke LA, Moyer MJ. p-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol. *Drug Metab Dispos* 1985; 13:548-52.

72. Allis JW, Robinson BL. A Kinetic Assay for p-Nitrophenol Hydroxylase in Rat Liver Microsomes. *Anal Biochem* 1994; 219:49-52.

73. Renton KW. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicology* 2000; 142:173-8.

ANEXOS



ANEXO 1 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 1A1 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Campo 04	Campo 05	Campo 06	Campo 07	Campo 08	Campo 09	Campo 10	Campo 11	Campo 12	Campo 13
F/01/30/F	14023,10	14876,80	8936,31	13655,60	13597,60	11439,80	10944,30	17347,70	10772,90	10267,10	4372,07	12439,80	12538,30
F/02/30/F	15518,50	3329,41	17065,10	9592,93	10195,70	8675,40	6860,81	21022,50	5755,45	28412,30	28476,20	8055,53	5159,29
F/03/30/F	13983,20	25651,80	13200,80	15332,70	13291,80	14928,40	12675,20	14452,60	17167,90	22542,60	16509,70	13038,30	8843,31
F/04/30/F	6044,14	5763,17	7826,46	8239,71	11420,00	11593,40	14469,10	16614,80	16407,00	16148,60	16391,00	15843,30	12155,00
F/05/30/F	4935,15	3537,72	6364,52	11522,40	14011,60	4896,83	4486,67	12404,60	19123,90	17896,70	13292,20	4323,11	10780,20
F/06/35/F	14291,80	17914,30	14779,30	20940,60	20888,90	22233,70	23128,00	21868,20	16451,90	20339,30	21599,70	18644,00	15182,90
F/07/35/F	3558,06	4316,52	6326,65	8307,88	9379,30	10764,60	12422,70	12294,80	13167,00	10201,00	12654,40	14673,50	14387,10
F/08/35/F	9581,71	6867,97	16425,10	12096,70	13523,60	18323,20	22246,60	18862,80	14751,70	12384,10	21495,50	8565,56	13181,30
F/09/35/F	6229,16	5381,34	4803,27	7938,26	12630,40	18016,40	19043,50	14530,30	10026,50	8847,94	11751,90	14190,40	15256,60
F/10/35/F	24382,70	27325,80	22675,30	21560,10	27096,90	27216,00	20975,50	21822,50	21864,70	11468,00	16485,00	20539,20	15920,80
F/11/40/F	2317,47	2433,34	3444,01	3970,18	4316,80	5611,67	5895,30	6882,69	6328,05	6112,03	8475,37	8332,71	8817,64
F/12/40/F	3318,19	4658,93	5665,11	6051,29	13489,00	13961,80	13387,40	6952,83	8080,50	12094,40	13462,70	11690,90	10725,90
F/13/40/F	9825,23	11657,20	11245,50	12165,80	13492,30	14784,30	13325,30	15339,30	15558,20	15089,60	13499,60	13803,30	12692,40
F/14/40/F	4074,97	15763,00	16512,40	14073,00	13366,70	14827,00	15573,20	12136,90	4305,02	6013,56	5967,55	5512,08	5006,25
F/15/40/F	15142,60	18231,30	18579,90	18163,10	19239,30	18535,00	20227,80	20098,30	19538,20	19489,10	21176,60	22180,20	22003,10
F/16/45/F	21383,00	16127,00	22577,00	20530,30	15438,70	14264,30	18257,10	18540,50	18119,50	14820,20	20429,80	19726,90	20844,30
F/17/45/F	8437,21	8679,33	9972,37	10226,00	10670,70	11528,70	11948,00	11746,30	14240,90	15653,90	14085,90	12342,30	11577,70
F/18/45/F	11085,90	14993,40	15918,90	16172,40	13286,60	12788,50	12009,70	12040,30	15022,40	11331,10	8915,41	8646,78	15930,10
F/19/45/F	7791,39	8769,80	13531,80	14596,10	15883,50	16108,40	14672,70	17016,00	15622,30	17469,20	17590,50	17860,70	19196,00
F/20/45/F	21770,80	18426,30	22123,80	21159,50	23565,10	24209,80	18869,40	18549,20	15278,00	15753,80	18397,90	19399,50	20635,20
F/21/50/F	8921,02	10404,60	10323,80	11175,80	17646,20	12423,80	11674,20	11379,50	7668,37	11710,80	17494,70	11785,60	20461,80
F/22/50/F	5122,25	6168,98	10448,20	9997,20	12605,20	9846,13	11172,70	12547,40	11924,40	11099,30	12696,10	13182,30	9757,47
F/23/50/F	13921,80	11220,30	13708,00	14721,10	17040,40	16275,50	16030,40	14073,40	18686,60	19096,10	20662,00	20902,40	23465,80
F/24/50/F	8751,71	12291,10	17122,40	18299,50	20792,30	21893,70	14522,30	15098,70	8697,70	26139,30	23940,20	21318,90	16367,20
F/25/50/F	19601,50	10866,60	15870,10	29311,40	27319,20	22052,10	28857,20	18064,10	19437,00	19021,60	26863,10	19443,10	18598,80
F/26/60/F	18380,70	14748,40	10213,90	18744,10	18193,70	17359,60	14774,00	15293,80	11631,40	15028,80	10757,10	10538,10	11854,20
F/27/60/F	16515,20	10920,80	20622,10	22582,70	16749,40	18561,20	20587,90	20307,20	22633,90	20636,00	7683,66	16256,00	20752,00

ANEXO 1 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 1A1 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20	Campo 21	Campo 22	Campo 23	Campo 24	Campo 25	Campo 26
F/01/30/F	8211,51	9307,33	10895,70	9897,05	6970,65	12225,90	12463,40	10076,70	12484,80	14445,90	12210,00	9866,05	9439,19
F/02/30/F	4508,69	3662,28	9206,48	5774,39	5769,20	21925,70	11575,00	20242,60	20469,80	11844,20	17402,10	14189,40	5546,72
F/03/30/F	16757,00	17452,50	19575,50	20778,10	15788,00	18841,40	27106,60	27483,60	27915,70	25893,40	28050,20	28087,20	29378,60
F/04/30/F	11331,20	12717,80	9994,54	11629,60	12660,60	10926,70	12591,00	14344,90	13476,70	15360,30	16101,70	16181,60	16250,20
F/05/30/F	10091,50	11248,60	7757,16	13364,30	22788,10	20070,40	11061,30	8193,98	328,52	13262,80	8990,74	10471,50	12104,10
F/06/35/F	19724,10	22860,90	19340,20	15010,00	22179,60	22159,30	18141,20	15735,30	22698,10	21335,80	20316,10	23108,60	21305,00
F/07/35/F	13615,70	14086,90	12750,50	12542,90	13106,10	11049,00	10723,00	12471,10	13207,50	15309,00	14744,90	15099,00	14545,20
F/08/35/F	13221,80	15185,10	17150,10	20188,30	20137,90	16466,20	13701,80	10306,20	14459,90	14991,40	17878,40	9452,52	9030,85
F/09/35/F	18951,30	24167,60	20829,70	16847,50	13084,10	10906,20	10898,70	8641,90	8090,74	8848,22	11579,50	12387,50	19064,80
F/10/35/F	22549,60	22837,90	22403,10	11888,20	19939,30	18579,30	24214,60	17676,80	17186,40	23100,60	20919,10	15150,70	13461,00
F/11/40/F	9166,50	9447,61	11506,00	9843,18	10458,30	10245,80	11274,40	11748,00	11324,20	11535,20	13751,50	15239,10	13073,00
F/12/40/F	10799,20	7781,57	9391,92	7300,99	6137,70	4259,99	7059,16	7355,98	11506,30	9388,41	10334,60	9857,63	10161,50
F/13/40/F	12336,70	13113,80	13359,70	12818,10	12679,80	10965,10	11703,80	11450,00	10999,70	11407,40	10877,00	11953,90	11772,80
F/14/40/F	6154,11	13052,70	7593,46	7245,16	7143,46	6680,84	7149,08	7618,99	6219,76	6692,90	6747,05	6479,83	6918,75
F/15/40/F	21658,30	22890,40	22757,20	24677,00	23931,20	22208,80	24457,70	20870,10	22602,50	22693,40	22258,30	23890,40	23281,50
F/16/45/F	18266,20	16548,90	19129,20	19778,40	18583,90	20266,70	17070,20	14951,30	15383,00	15193,10	17265,90	16554,30	19468,10
F/17/45/F	12793,30	13061,40	12830,20	13001,30	12359,80	14317,20	12741,20	13447,70	13199,10	12004,40	13800,60	14564,80	14236,30
F/18/45/F	11716,80	16857,50	14208,70	15288,90	9191,75	13303,20	10639,80	12515,70	12883,90	15430,40	15124,20	14092,90	14555,80
F/19/45/F	18718,30	18821,90	18424,20	18661,70	18730,30	19806,00	20222,50	15887,50	17843,90	21055,60	20334,70	21894,40	21191,80
F/20/45/F	17568,50	19358,70	19122,90	18586,10	19073,60	21355,30	18351,00	22608,30	17270,70	15261,00	17522,40	17598,10	21036,10
F/21/50/F	18731,00	17552,50	10247,50	9511,29	12309,30	14304,50	7103,21	13494,20	13474,60	15270,70	13663,30	17845,00	18266,60
F/22/50/F	12747,40	12961,60	15046,00	15245,60	14424,10	13925,90	13377,00	11671,90	10705,40	13105,10	13841,00	14800,50	14275,80
F/23/50/F	23334,20	25547,20	23369,70	21847,70	21853,70	20814,00	16395,00	17533,00	24417,10	23549,10	22050,70	17967,90	24041,20
F/24/50/F	21271,50	19481,30	20859,30	19872,90	14585,90	13502,90	12793,00	17675,80	19478,80	16744,00	16264,90	21558,00	21051,80
F/25/50/F	18794,80	11480,90	18896,20	20402,00	22742,50	24852,70	26023,70	20461,40	24968,70	21809,60	19185,90	24652,60	21709,50
F/26/60/F	12493,90	12037,90	12444,60	11686,00	10205,10	14914,80	12184,60	18084,00	9996,36	13721,30	8796,32	13455,20	12391,00
F/27/60/F	23986,80	21556,50	12330,70	9465,42	25668,50	24077,60	22844,20	22026,30	18095,40	21536,30	25312,20	21240,70	20672,40

ANEXO 1 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 1A1 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 27	Campo 28	Campo 29	Campo 30
F/01/30/F	9659,28	9620,01	12160,10	13401,10
F/02/30/F	8675,40	12653,70	11518,20	12644,00
F/03/30/F	26095,50	24753,20	28427,60	25946,10
F/04/30/F	15851,70	14166,00	13035,00	21032,20
F/05/30/F	8990,74	13195,60	13517,70	11809,00
F/06/35/F	16977,50	18518,40	15988,00	17174,50
F/07/35/F	13460,60	11819,80	10735,00	14850,40
F/08/35/F	11804,60	20282,80	20036,30	20424,80
F/09/35/F	19848,40	11934,10	7613,66	12200,60
F/10/35/F	8713,55	18824,90	18535,00	21015,70
F/11/40/F	14509,00	14900,90	14512,80	13224,90
F/12/40/F	10780,20	11890,20	11744,50	11528,40
F/13/40/F	11243,40	11330,80	11855,00	11806,70
F/14/40/F	7576,63	6908,22	6633,71	7199,85
F/15/40/F	21268,80	20999,80	22847,30	22343,40
F/16/45/F	18446,80	15901,20	17537,10	17920,30
F/17/45/F	13763,40	13501,30	15603,50	16305,20
F/18/45/F	8130,85	10769,70	5862,90	12456,90
F/19/45/F	21896,90	21914,20	23004,80	18652,50
F/20/45/F	16521,10	18446,30	19055,00	18309,20
F/21/50/F	19719,70	12959,00	16413,90	18808,50
F/22/50/F	13463,80	12969,60	12795,70	12788,40
F/23/50/F	25217,10	26745,40	21922,80	24991,00
F/24/50/F	20591,80	18999,00	20491,10	22069,10
F/25/50/F	17092,40	23708,90	15063,60	23047,10
F/26/60/F	12359,70	12569,00	13476,10	11902,70
F/27/60/F	23626,50	19936,90	23398,90	23932,20

ANEXO 1 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 1A1 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Campo 04	Campo 05	Campo 06	Campo 07	Campo 08	Campo 09	Campo 10	Campo 11	Campo 12	Campo 13
F/28/60/F	10151,50	9222,75	7956,21	7800,93	6390,61	4316,38	5891,10	6696,97	6800,35	9537,95	8562,06	9643,29	7298,89
F/29/60/F	13586,10	12761,60	18306,20	19926,40	20236,10	19178,40	15207,80	19155,30	9403,56	12785,60	14425,40	16552,80	16252,30
F/30/60/F	17108,80	18375,60	19828,30	19954,40	20440,10	19489,40	21091,10	21049,10	21320,60	18312,80	18900,00	20035,50	21906,10
F/31/70/F	6537,06	8348,14	12126,40	12662,00	16199,10	16336,10	15600,90	14978,20	17173,60	15215,30	14742,70	16448,10	18988,40
F/32/70/F	2348,89	12280,90	13752,30	10970,80	14034,90	12042,40	12359,40	22124,00	21752,90	16705,40	15342,90	17186,00	14072,90
F/33/70/F	8302,97	5730,06	10013,20	12165,30	4692,17	6208,40	8144,60	10534,70	6603,27	3877,74	6078,64	3936,23	5108,51
F/34/70/F	7809,35	17388,00	19685,80	18337,60	23277,20	21076,50	19247,00	15167,70	19538,50	18581,10	18469,10	20763,40	24768,20
F/35/70/F	5221,15	7060,98	8532,32	9885,97	12269,50	12150,80	17606,40	14011,70	16357,80	17293,70	18440,20	15808,10	16427,10
F/36/N/F	16526,80	17603,40	12090,20	11030,60	10379,90	7706,10	9405,39	10371,70	7684,78	8921,02	16157,90	16688,80	8331,87
F/37/N/F	3385,94	3725,68	4065,01	4390,72	6500,03	11027,40	11665,20	12124,20	11562,50	9551,27	11170,30	9977,14	9426,57
F/38/N/F	3775,90	4916,75	6215,41	7424,71	8805,29	10424,80	11528,90	11317,50	11260,40	13475,00	14961,80	13347,20	11940,40
F/39/N/F	22980,40	21769,40	20963,60	24353,60	24013,10	23354,50	21105,80	22219,60	22756,40	21823,00	24344,20	23852,60	23688,00
F/40/N/F	7790,69	8916,25	8422,91	13383,70	15534,80	13450,80	13465,90	14405,00	15687,00	15572,80	15789,40	16397,50	16540,90
F/41/N/F	3962,61	3698,05	3928,94	3827,24	5338,84	6118,76	7708,21	3632,54	3174,97	6906,82	5085,08	6951,29	11255,60
F/42/N/F	22182,50	20492,00	20385,10	20840,00	25199,80	25536,50	23155,50	21150,80	23767,60	25758,00	26037,30	16711,80	22406,40
F/43/N/F	7340,69	10941,80	6138,68	8861,12	9884,00	8369,88	10008,80	15571,10	12546,10	10587,90	12510,20	9795,63	9956,66
F/44/N/F	14481,60	15098,40	14187,50	13624,60	13364,20	13206,50	13325,60	13861,20	13989,10	14199,50	12791,70	14174,90	13504,20
F/45/N/F	5600,87	4681,65	4432,10	9377,61	9304,25	14036,10	6288,21	9139,85	14180,50	11848,50	14235,00	9351,80	12270,20
F/46/85/F	1972,54	2875,20	3969,34	2847,57	8057,07	9955,26	7400,31	7345,60	7390,91	7060,00	7550,54	12412,40	18585,50
F/47/85/F	26819,20	27872,90	23258,90	27424,90	24228,20	24107,80	23289,30	23344,20	24480,80	16118,10	23478,40	24375,30	22861,20
F/48/85/F	5812,96	9214,61	12323,80	6096,32	8361,47	12346,00	10392,50	8361,19	11159,70	8660,81	9412,68	15296,10	19177,20
F/49/85/F	8877,82	11873,40	12089,50	11219,70	10391,70	8455,31	20043,60	23407,40	25394,50	28013,90	14976,80	18925,20	20713,20
F/50/85/F	2920,51	4393,39	4213,00	7179,66	6552,07	5108,65	5536,62	6149,06	7400,59	10797,20	8100,56	10181,80	8293,01
F/51/140/F	13688,90	8113,18	7361,03	11029,20	12473,00	9340,58	12389,90	10656,50	8458,68	8182,48	14245,80	13915,10	12790,20
F/52/140/F	21538,80	19366,00	7722,38	22310,10	8078,95	11030,60	21049,70	17686,10	19082,80	24269,80	12510,90	26231,80	21535,50
F/53/140/F	16536,50	19284,10	13975,20	16223,80	16417,30	17600,80	18711,30	13906,50	14443,10	13950,30	17380,80	11894,00	15978,20
F/54/140/F	4169,23	4379,36	5023,08	4163,90	5377,55	6466,92	5621,21	5472,80	6481,51	5061,80	7267,33	7755,48	8374,93
F/55/140/F	9951,05	11505,20	7050,18	7119,76	10855,40	15833,70	12049,00	10997,90	11000,70	8476,35	11785,70	14217,80	19666,40

ANEXO 1 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 1A1 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20	Campo 21	Campo 22	Campo 23	Campo 24	Campo 25	Campo 26
F/28/60/F	4125,04	2188,14	5061,37	4769,32	7320,07	5893,62	7948,78	6356,95	5245,27	3635,63	5659,92	3839,59	6178,38
F/29/60/F	16079,80	18359,90	20775,90	19988,90	20682,20	18062,00	21131,70	20844,30	19959,80	21226,90	20717,40	19153,70	16629,20
F/30/60/F	22169,40	15112,00	20825,40	21311,60	14879,00	21175,90	24469,00	25077,10	22780,40	15005,10	21837,20	21246,20	21703,80
F/31/70/F	13818,40	17904,50	19641,30	15018,30	17633,90	19466,10	17091,30	18752,70	18361,10	18109,40	16808,60	19479,20	20262,20
F/32/70/F	15434,10	11470,90	14998,40	17461,50	15115,80	12483,10	13237,10	11209,70	11481,00	26851,40	22707,50	21294,20	13769,30
F/33/70/F	8217,97	11365,30	12921,20	4465,21	6983,69	10780,10	11253,20	5777,90	11281,40	8628,83	15666,50	16519,70	10712,00
F/34/70/F	24032,50	23761,00	20720,20	21257,00	14264,90	16869,20	21098,90	17655,20	20618,50	22924,00	24062,50	23804,70	23148,10
F/35/70/F	21729,00	19219,80	14788,30	18123,60	16893,20	14248,10	14845,50	15004,20	15372,20	18365,50	18807,00	20025,70	20327,00
F/36/N/F	8189,77	9104,22	9215,60	8134,92	7831,93	7063,65	7114,29	7974,87	8649,17	8140,95	7599,92	8809,50	8387,84
F/37/N/F	9578,91	8622,24	8463,30	7529,36	7240,96	8059,74	9753,97	11513,40	13896,80	12371,20	14389,90	14685,30	15.797,4
F/38/N/F	12473,20	8982,18	7905,15	7070,38	5336,03	7346,44	8400,88	10221,60	10780,10	13096,00	18112,20	18470,70	19569,80
F/39/N/F	21970,90	20552,30	21187,40	21434,90	20458,90	20189,80	20212,70	23490,30	21407,10	21969,50	19749,80	21534,90	21072,00
F/40/N/F	16386,10	16098,10	16531,70	18084,00	17179,90	14663,40	18244,30	18181,20	17277,40	18634,20	17659,70	19724,50	19300,30
F/41/N/F	9184,59	6781,98	6266,05	6088,60	7044,01	10037,00	11190,40	8830,82	6120,87	7736,82	5686,30	3422,13	5315,27
F/42/N/F	19070,80	18347,70	18656,50	21063,70	25339,60	22086,00	14710,10	15953,70	17213,60	22319,60	25905,60	28450,40	27156,90
F/43/N/F	17055,00	16718,40	17714,00	17146,70	14981,80	15640,60	13203,70	13715,60	16301,50	16947,10	18790,20	20548,90	15817,30
F/44/N/F	14402,70	12622,00	14280,20	13304,00	14055,80	13545,90	12997,70	13003,60	10791,20	12392,20	12010,40	12040,40	11241,90
F/45/N/F	7602,72	4466,19	3201,48	11683,70	3094,17	10044,10	10532,20	14930,10	13747,40	9214,61	14545,70	14533,70	16518,60
F/46/85/F	10262,60	9463,46	9084,72	10022,20	11390,80	9517,33	11747,10	6835,84	7551,94	5244,85	5872,44	7418,12	6046,94
F/47/85/F	23175,80	23657,90	24509,60	23116,20	21498,70	22849,10	22809,90	19016,40	19612,60	20950,40	21340,10	18512,00	20500,70
F/48/85/F	12137,20	12661,30	15132,40	17919,20	10320,80	11216,30	12023,90	9881,76	13887,70	13316,90	7042,89	15118,30	11566,00
F/49/85/F	13168,10	23962,90	20846,60	23357,90	19137,10	19142,70	26483,40	18715,20	23459,70	20879,50	12783,80	18582,50	24686,30
F/50/85/F	5924,20	4384,27	6512,37	10504,60	10727,50	11244,10	10381,40	11277,80	11257,60	9559,27	9329,36	10306,50	9220,65
F/51/140/F	7130,14	14519,40	16148,50	14476,20	14076,90	9201,71	9872,50	15033,90	16580,00	13219,60	12310,50	12233,50	14111,70
F/52/140/F	22948,30	15308,50	23816,70	18777,40	22467,00	14559,80	23210,60	19319,50	23465,40	23800,60	22845,60	19758,70	18943,30
F/53/140/F	11868,00	17388,70	9469,07	12943,10	14597,10	14298,00	21256,30	24333,80	13321,00	17568,80	10915,40	14052,40	12354,70
F/54/140/F	11001,10	11290,10	11767,20	10959,90	9675,27	7617,17	9839,11	10449,70	9107,86	13895,00	16440,60	13269,20	16330,40
F/55/140/F	9198,48	19161,60	9004,76	19311,60	18799,60	20035,20	14049,90	21153,10	18987,40	25481,80	14209,10	18974,30	14199,00

ANEXO 1 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 1A1 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 27	Campo 28	Campo 29	Campo 30
F/28/60/F	6042,87	8728,14	6813,40	7309,55
F/29/60/F	16460,60	15713,80	19049,90	21517,60
F/30/60/F	19565,90	19574,80	19043,90	18801,20
F/31/70/F	14724,20	18760,00	21678,30	15056,80
F/32/70/F	7242,92	18110,80	19629,40	15698,50
F/33/70/F	8558,97	11131,00	7532,16	14430,60
F/34/70/F	22782,10	23005,10	23077,10	23241,20
F/35/70/F	18667,40	20072,50	18517,20	22815,20
F/36/N/F	7811,87	8537,23	8178,83	7247,97
F/37/N/F	16925,20	13094,60	13951,40	13721,30
F/38/N/F	17842,30	16538,90	13001,60	12545,70
F/39/N/F	22361,70	20015,30	21302,00	21788,10
F/40/N/F	19858,60	17970,80	18182,50	18282,50
F/41/N/F	8845,55	10149,00	8898,15	11681,50
F/42/N/F	24868,20	20367,00	19117,80	17880,90
F/43/N/F	12080,00	14715,70	16478,60	16688,80
F/44/N/F	14151,00	13531,00	13530,90	12339,50
F/45/N/F	14796,50	15983,70	12277,40	11599,10
F/46/85/F	8966,89	12624,00	12163,70	11969,30
F/47/85/F	22219,00	22108,30	24022,50	18886,40
F/48/85/F	12378,20	16570,30	15750,30	16278,70
F/49/85/F	25657,70	18962,50	25512,00	25541,30
F/50/85/F	6835,84	8901,38	8081,34	10792,10
F/51/140/F	13786,00	14365,90	16297,50	13825,40
F/52/140/F	27152,70	25068,50	15367,30	21190,00
F/53/140/F	11387,30	15844,40	24483,50	28464,00
F/54/140/F	15070,60	15619,50	15606,30	16064,10
F/55/140/F	19039,60	14355,10	22197,40	26175,30

ANEXO 2 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 2E1 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Campo 04	Campo 05	Campo 06	Campo 07	Campo 08	Campo 09	Campo 10	Campo 11	Campo 12	Campo 13
F/01/30/F	10.644,00	25.855,60	22.834,50	15.723,30	26.780,90	18.097,60	15.579,60	18.261,00	23.386,40	22.107,50	22.731,90	19.012,60	18.338,90
F/02/30/F	9.459,81	10.363,50	13.827,30	10.923,90	1.496,73	11.697,70	20.610,60	19.851,00	16.767,30	12.767,60	17.651,30	15.231,30	13.691,50
F/03/30/F	10.291,20	23.788,80	20.331,30	21.931,70	25.122,10	22.572,40	21.383,50	22.043,30	16.753,40	23.001,00	21.421,80	22.240,10	20.411,00
F/04/30/F	11.541,10	19.120,40	10.692,70	14.105,30	10.582,00	17.951,50	19.757,20	8.558,55	10.946,90	13.794,00	9.281,38	14.526,10	18.191,60
F/05/30/F	10.856,90	13.110,70	11.513,70	17.329,30	22.566,30	6.317,39	10.848,20	17.814,80	23.315,30	15.774,00	14.903,60	13.394,40	21.301,20
F/06/35/F	26.358,20	15.949,70	21.234,20	16.079,50	18.520,70	26.246,30	22.913,90	16.689,50	11.615,40	2.567,58	21.269,10	19.125,10	23.363,20
F/07/35/F	23.087,00	19.870,80	25.683,50	26.894,60	25.424,40	19.740,10	23.384,60	24.923,60	24.707,30	24.656,10	25.522,80	23.890,80	22.436,90
F/08/35/F	27.886,00	25.915,00	22.064,40	23.161,70	20.572,80	26.725,70	19.437,80	22.620,20	17.242,20	20.049,10	22.035,00	20.131,30	17.357,50
F/09/35/F	7.370,01	10.808,70	8.950,20	10.436,40	10.710,40	12.029,90	11.294,70	13.037,90	13.948,90	13.679,00	10.761,80	13.331,00	19.389,80
F/10/35/F	17.871,80	24.709,70	22.737,90	15.613,80	22.717,60	18.540,90	16.830,00	18.734,50	21.025,80	18.255,10	21.317,60	24.893,80	23.096,90
F/11/40/F	19.467,10	11.679,90	8.359,64	8.178,41	11.216,70	7.322,17	21.486,40	23.180,50	23.594,00	17.556,40	22.478,10	24.946,50	14.004,10
F/12/40/F	17.300,70	15.252,20	22.651,90	22.810,80	22.161,50	16.744,50	23.244,30	23.551,90	17.346,30	15.057,60	18.902,20	24.469,90	15.251,00
F/13/40/F	16.470,00	19.897,60	20.773,20	22.009,60	22.379,50	22.801,40	20.636,70	19.170,40	18.888,90	20.763,70	19.642,20	22.746,20	15.376,90
F/14/40/F	29.439,80	30.319,70	29.012,90	28.670,20	27.383,60	26.910,60	24.910,90	24.716,30	26.459,50	26.790,70	28.786,80	28.058,60	23.824,60
F/15/40/F	16.552,80	16.962,20	18.453,60	19.596,00	18.106,30	21.410,90	20.191,40	19.556,50	19.016,10	21.048,40	19.180,50	22.408,50	21.139,20
F/16/45/F	13.557,20	3.446,96	18.298,10	24.150,70	19.506,80	19.350,80	24.359,60	18.499,20	16.173,90	15.111,20	7.950,74	22.566,80	20.017,00
F/17/45/F	13.113,70	14.083,40	16.224,00	18.046,40	11.560,70	8.103,64	15.319,20	12.943,80	19.092,60	15.762,30	16.278,50	19.067,80	15.821,10
F/18/45/F	16.661,40	16.637,50	17.586,60	17.858,60	20.230,60	19.319,00	18.515,10	17.011,30	20.577,90	20.662,00	19.465,60	17.388,80	21.363,10
F/19/45/F	24.309,40	20.391,10	20.412,60	23.182,30	21.880,50	22.604,50	19.951,50	19.613,00	15.862,30	21.105,50	22.397,60	19.294,20	20.532,60
F/20/45/F	8.217,54	11.123,90	8.534,70	9.980,93	14.243,40	13.365,90	14.387,80	15.791,70	11.062,00	12.424,50	10.111,00	9.503,30	12.780,10
F/21/50/F	9.055,82	15.309,20	6.762,48	7.088,62	3.724,70	9.356,57	7.313,90	3.193,62	9.316,03	12.552,40	12.503,80	11.997,90	10.830,60
F/22/50/F	9.659,14	10.155,30	8.875,29	7.256,10	8.114,58	9.446,21	8.482,94	6.181,60	7.521,50	7.426,26	5.860,10	6.866,42	6.207,56
F/23/50/F	20.504,30	7.018,20	6.325,53	20.168,20	22.480,60	18.791,10	11.387,50	14.166,70	22.944,80	28.493,30	25.480,00	27.996,80	23.270,10
F/24/50/F	16.639,60	18.832,50	24.309,40	20.436,40	15.504,10	19.428,00	20.051,60	23.863,30	12.145,90	17.097,70	21.893,90	21.054,30	10.864,90
F/25/50/F	16.294,00	17.733,20	16.944,00	13.956,00	14.978,60	15.951,30	15.626,80	17.808,70	14.675,10	16.787,20	20.090,60	18.648,60	20.554,80
F/26/60/F	8.907,83	14.349,60	15.830,60	14.458,30	14.044,70	8.459,66	17.493,90	17.892,70	12.631,70	17.495,00	16.362,80	15.238,50	17.403,10
F/27/60/F	27.841,30	25.593,20	31.671,70	25.963,60	29.510,20	28.116,70	28.386,00	25.292,10	23.783,80	22.956,00	24.987,50	32.183,50	29.145,10

ANEXO 2 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 2E1 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20	Campo 21	Campo 22	Campo 23	Campo 24	Campo 25	Campo 26
F/01/30/F	22.123,60	23.877,80	18.322,30	21.521,30	27.234,10	23.629,80	19.648,10	24.566,90	20.850,80	22.779,60	25.154,50	25.536,60	26.151,00
F/02/30/F	20.733,70	7.820,15	15.985,50	17.839,10	16.255,00	14.782,70	20.498,30	14.310,10	17.101,50	14.871,30	14.897,70	11.424,90	7.055,51
F/03/30/F	22.530,00	18.514,40	24.025,60	23.777,30	20.673,30	24.482,90	24.185,20	20.527,20	24.403,50	23.915,50	23.772,00	25.480,30	14.645,30
F/04/30/F	18.597,00	10.102,10	20.595,20	12.792,30	21.993,30	22.163,00	20.196,30	21.099,30	24.600,30	21.045,10	20.727,60	22.594,50	11.636,40
F/05/30/F	12.307,40	8.380,26	9.093,42	12.346,00	23.838,50	25.039,80	19.493,80	27.072,10	24.332,00	15.424,40	9.708,80	24.600,70	6.137,28
F/06/35/F	21.892,50	25.494,00	24.080,70	12.203,90	15.628,80	24.099,70	22.472,50	4.678,71	9.167,06	6.756,87	19.165,40	8.255,42	18.318,00
F/07/35/F	27.494,20	23.583,70	24.648,60	22.100,30	22.689,20	24.424,40	25.113,90	23.427,60	24.188,60	22.761,20	15.920,60	15.327,30	20.364,00
F/08/35/F	17.093,30	21.503,20	22.597,60	24.054,50	23.671,70	22.439,50	21.724,00	16.806,70	20.420,10	25.758,70	23.396,20	21.439,10	17.443,90
F/09/35/F	13.605,60	10.404,40	10.206,80	11.592,00	10.343,70	13.197,70	14.400,10	22.103,90	12.370,40	18.622,90	18.529,40	11.373,60	12.443,60
F/10/35/F	20.028,10	13.195,00	21.126,60	14.176,50	13.832,40	23.786,30	19.811,60	22.674,80	22.321,10	24.794,00	24.752,90	23.369,80	23.568,00
F/11/40/F	12.829,80	18.140,80	14.863,70	20.321,40	15.647,40	20.728,90	19.403,70	19.562,20	16.274,60	20.275,20	11.823,30	18.484,10	20.647,70
F/12/40/F	17.698,00	19.258,20	19.464,60	18.908,80	17.552,40	23.398,30	23.848,70	20.779,50	18.093,00	19.782,00	18.312,80	13.257,30	23.087,30
F/13/40/F	22.148,60	20.962,90	20.770,70	20.988,70	20.774,80	18.509,30	20.588,30	17.026,20	17.545,50	11.950,10	20.085,70	19.149,50	15.783,70
F/14/40/F	29.391,20	26.157,90	26.235,30	24.643,50	24.637,20	27.021,60	24.621,60	26.751,10	26.785,10	7.052,15	11.525,40	10.453,70	10.225,90
F/15/40/F	17.570,90	20.800,30	20.306,20	17.264,10	19.802,70	18.050,90	20.987,40	20.379,20	17.154,70	15.785,50	17.710,30	17.104,60	17.389,70
F/16/45/F	24.521,50	27.704,20	24.017,10	21.109,30	20.990,40	23.336,20	16.376,60	11.354,50	7.180,22	15.130,40	670,37	3.541,08	16.475,30
F/17/45/F	14.270,70	12.910,10	16.088,60	16.823,60	16.861,00	10.398,00	14.685,00	18.820,50	12.904,10	18.533,30	12.789,40	17.688,90	11.548,60
F/18/45/F	20.314,20	21.185,30	20.800,30	12.204,60	14.907,90	13.954,90	19.272,70	16.778,50	21.508,20	20.908,70	20.354,90	16.823,40	24.225,50
F/19/45/F	20.011,20	22.035,80	16.935,20	21.043,00	20.194,60	21.713,50	17.962,40	17.947,40	14.742,10	20.285,10	20.563,60	20.583,00	18.841,40
F/20/45/F	15.151,90	13.600,70	12.859,50	10.515,20	11.571,20	9.833,08	11.350,60	11.548,60	8.422,48	11.403,30	11.039,30	10.917,80	11.849,80
F/21/50/F	3.830,33	9.734,05	9.422,36	11.636,20	15.959,00	13.003,00	17.530,10	6.591,77	6.369,57	13.617,70	18.115,20	13.595,00	14.001,10
F/22/50/F	6.058,16	7.841,61	4.733,13	6.735,97	5.726,13	6.328,05	3.855,30	7.061,97	4.698,20	5.078,21	5.185,10	5.839,34	4.254,94
F/23/50/F	23.279,30	23.926,00	29.634,60	25.064,90	20.808,00	26.299,60	25.713,70	24.773,10	10.321,90	19.675,40	27.390,40	25.142,20	22.795,10
F/24/50/F	16.278,70	19.017,50	15.463,10	21.206,70	24.845,50	22.745,90	19.919,90	22.374,00	19.677,90	12.421,70	19.471,60	16.690,00	23.361,40
F/25/50/F	21.089,00	19.244,60	20.201,60	18.246,00	19.761,30	19.926,00	20.467,30	17.693,30	20.540,10	20.269,30	17.769,50	17.982,90	19.506,40
F/26/60/F	15.436,80	16.737,00	9.614,54	14.851,00	14.445,90	17.473,10	8.433,43	15.765,10	8.053,42	13.552,90	16.123,00	16.704,70	15.865,90
F/27/60/F	16.672,00	28.118,00	32.507,10	22.400,40	25.752,50	33.245,70	26.838,00	28.335,40	28.280,40	24.391,90	28.567,80	20.585,10	32.563,00

ANEXO 2 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 2E1 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 27	Campo 28	Campo 29	Campo 30
F/01/30/F	21.850,80	24.565,80	22.537,70	23.278,80
F/02/30/F	15.282,60	10.956,40	14.260,80	4.572,24
F/03/30/F	21.886,00	26.271,70	19.464,20	21.876,00
F/04/30/F	12.090,00	18.315,60	12.680,50	15.245,10
F/05/30/F	6.045,40	11.432,10	7.408,72	11.188,80
F/06/35/F	18.160,60	9.411,70	6.657,13	22.762,00
F/07/35/F	17.995,10	17.813,40	21.643,80	19.020,90
F/08/35/F	25.685,20	24.434,60	19.270,50	26.488,00
F/09/35/F	17.246,00	21.493,10	20.935,40	14.159,40
F/10/35/F	23.987,90	19.480,00	13.717,80	23.334,60
F/11/40/F	23.383,70	24.666,10	22.853,10	18.563,90
F/12/40/F	19.738,50	15.851,30	15.291,60	19.559,70
F/13/40/F	18.138,00	17.273,40	22.804,20	18.873,90
F/14/40/F	9.488,43	9.226,54	8.508,19	9.830,42
F/15/40/F	19.185,40	17.451,50	19.390,70	21.197,50
F/16/45/F	13.216,90	4.179,47	6.353,16	7.510,42
F/17/45/F	12.757,10	12.098,80	17.618,40	12.465,30
F/18/45/F	19.744,00	15.075,10	18.867,00	17.427,80
F/19/45/F	17.534,80	21.918,00	21.162,60	18.512,10
F/20/45/F	10.855,50	12.528,30	11.623,50	11.986,70
F/21/50/F	12.283,40	17.796,60	17.379,70	13.043,50
F/22/50/F	5.680,97	5.572,39	5.257,06	6.523,87
F/23/50/F	29.782,50	20.852,50	21.766,50	24.134,90
F/24/50/F	23.186,10	22.017,40	21.740,80	18.551,10
F/25/50/F	21.225,00	22.104,30	17.107,30	20.539,50
F/26/60/F	10.003,80	8.636,26	10.714,10	4.141,04
F/27/60/F	26.467,90	26.544,20	30.191,50	26.099,70

ANEXO 2 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 2E1 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Campo 04	Campo 05	Campo 06	Campo 07	Campo 08	Campo 09	Campo 10	Campo 11	Campo 12	Campo 13
F/28/60/F	10.910,10	8.364,83	9.646,94	18.342,40	17.095,60	10.656,10	19.210,00	22.302,90	8.346,46	9.691,83	15.117,40	18.790,90	23.145,50
F/29/60/F	23.694,00	21.069,00	26.267,90	21.608,40	26.769,10	24.185,80	14.647,70	21.957,50	20.702,70	12.054,90	18.279,80	22.026,1	19.928,50
F/30/60/F	11.443,70	6.398,75	13.613,10	7.523,89	5.104,58	7.689,97	18.432,20	4.143,42	17.188,50	9.061,01	3.459,02	11.469,00	12.419,30
F/31/70/F	19.766,70	14.135,30	9.512,14	17.776,40	19.656,90	21.060,10	14.042,70	19.965,80	9.280,40	16.925,90	18.480,40	19.773,30	19.340,40
F/32/70/F	24.130,10	14.653,50	19.538,40	16.576,10	21.572,50	18.168,20	17.264,10	20.657,20	16.012,40	15.564,50	15.973,90	17.957,10	14.928,70
F/33/70/F	23.898,70	20.193,30	18.436,80	12.112,30	26.139,30	15.562,30	17.596,00	17.700,20	29.266,10	19.588,90	16.840,80	13.437,40	23.554,80
F/34/70/F	24.698,50	30.211,10	26.396,00	29.377,10	27.110,10	17.979,40	22.859,50	12.927,00	11.617,10	23.380,90	22.827,90	28.978,50	29.238,20
F/35/70/F	27.613,30	31.237,10	31.402,50	29.084,30	34.846,80	31.707,00	21.520,60	27.414,50	25.649,60	32.152,00	24.176,00	14.164,60	23.158,00
F/36/N/F	6.971,63	26.379,40	22.273,30	21.485,90	26.361,00	24.318,90	27.828,40	19.441,00	26.070,50	25.217,90	24.609,30	26.176,00	13.289,00
F/37/N/F	18.187,50	20.404,30	21.263,20	19.010,90	21.721,90	20.585,20	18.925,40	17.526,60	21.126,40	13.688,80	18.171,30	20.854,80	18.443,80
F/38/N/F	17.819,20	19.531,60	19.991,60	12.299,00	13.851,90	17.640,60	20.029,90	25.983,10	26.590,50	24.566,80	25.644,20	27.374,00	27.554,60
F/39/N/F	15.107,10	10.176,10	9.375,79	14.699,50	14.369,30	8.979,65	10.748,70	16.547,90	11.961,50	11.606,80	14.089,00	15.480,10	12.778,70
F/40/N/F	18.787,20	16.917,10	17.347,90	18.355,60	18.740,90	18.591,80	20.540,90	17.799,50	20.072,00	20.408,50	18.558,60	18.050,30	20.078,00
F/41/N/F	22.939,70	25.712,50	18.746,40	23.433,10	24.669,20	20.372,00	26.597,00	26.934,20	25.177,50	20.630,30	21.102,30	15.536,50	21.888,10
F/42/N/F	23.748,00	26.238,30	27.284,20	25.553,90	23.008,80	20.795,20	27.286,80	25.727,00	27.918,60	29.273,30	26.741,00	27.439,30	26.046,10
F/43/N/F	27.239,30	24.361,40	23.885,20	20.534,20	20.725,20	21.919,70	22.026,70	24.941,60	20.856,50	23.589,90	19.942,20	22.206,30	26.029,80
F/44/N/F	18.642,40	19.273,40	21.737,30	24.049,70	21.149,30	21.200,50	26.853,80	25.627,50	29.407,90	26.965,20	26.489,00	25.607,10	25.672,70
F/45/N/F	16.627,10	29.436,40	28.931,70	23.157,90	21.041,30	21.788,90	21.538,70	28.898,90	20.846,70	27.367,50	30.866,10	25.907,20	30.396,00
F/46/85/F	20.635,30	16.069,30	21.692,40	11.470,20	16.862,40	23.315,30	21.820,20	23.555,30	11.525,20	26.880,90	24.858,30	25.318,90	22.231,90
F/47/85/F	26.872,20	24.677,00	11.418,90	20.623,70	14.207,10	24.482,20	26.683,50	29.719,90	25.296,40	24.450,50	26.304,20	25.116,00	14.079,00
F/48/85/F	26.035,70	24.520,80	21.905,40	19.009,80	18.991,40	20.017,30	18.635,30	18.293,20	23.539,70	25.559,90	21.207,20	18.305,60	20.307,20
F/49/85/F	14.999,50	15.381,90	13.919,30	14.451,20	17.750,00	13.166,70	16.117,60	16.326,40	15.443,80	16.834,90	15.708,60	14.335,00	14.482,80
F/50/85/F	18.781,50	20.797,10	26.062,00	21.955,30	20.609,90	22.282,00	13.892,10	10.610,60	8.789,72	9.501,19	11.500,40	19.748,50	22.407,30
F/51/140/F	28.298,50	31.847,40	25.649,40	22.189,60	19.629,40	19.178,00	18.462,90	19.759,00	17.833,10	17.139,80	22.065,00	21.532,40	24.445,00
F/52/140/F	15.101,20	13.977,60	6.694,17	17.005,90	20.039,90	18.227,50	18.902,90	19.216,90	20.771,90	19.831,80	18.332,30	23.171,10	19.459,30
F/53/140/F	25.414,70	21.189,50	22.472,20	24.289,90	20.869,00	23.708,40	23.576,30	25.337,20	22.994,60	24.087,30	23.392,50	24.710,30	17.778,10
F/54/140/F	15.672,40	4.785,88	7.971,22	17.788,50	12.894,40	27.491,40	16.327,40	14.241,40	22.012,00	10.484,40	12.965,70	12.848,00	10.582,70
F/55/140/F	14.288,90	13.014,40	17.140,40	35.042,70	33.297,30	30.153,80	31.807,20	33.183,50	26.171,00	32.788,30	20.942,10	25.876,80	22.243,00

ANEXO 2 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 2E1 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20	Campo 21	Campo 22	Campo 23	Campo 24	Campo 25	Campo 26
F/28/60/F	22.928,70	27.599,00	27.702,50	19.149,40	14.705,80	23.990,00	23.766,40	29.411,90	19.928,90	24.535,20	13.802,80	27.217,10	21.745,20
F/29/60/F	13.583,60	16.489,50	20.146,30	20.075,30	16.804,00	21.939,20	12.018,60	10.223,60	9.599,81	14.129,80	17.599,90	3.080,56	11.021,90
F/30/60/F	6.434,24	5.226,62	3.494,23	18.099,60	3.063,59	3.896,54	10.512,40	6.317,67	12.393,80	15.519,50	12.377,20	2.904,80	6.403,66
F/31/70/F	17.897,70	16.515,70	8.998,59	22.431,70	18.730,70	16.768,70	16.561,60	20.117,40	21.097,10	18.919,90	24.957,00	24.776,90	23.735,90
F/32/70/F	16.746,60	14.086,30	11.562,70	19.769,00	17.353,70	16.435,50	17.418,40	20.433,50	13.968,40	20.366,00	18.889,90	20.721,90	20.308,20
F/33/70/F	15.678,20	22.776,20	16.437,10	17.011,10	19.694,80	22.755,80	24.733,70	15.705,70	15.519,80	10.156,80	16.028,20	13.680,00	17.405,50
F/34/70/F	29.752,90	28.788,30	24.333,90	21.758,10	17.123,00	24.948,80	20.407,70	24.287,20	28.252,60	18.167,50	15.092,80	25.723,50	16.434,50
F/35/70/F	20.943,80	33.673,90	28.389,10	20.173,30	23.571,10	28.044,70	32.221,00	33.144,60	15.580,40	19.847,10	24.077,60	20.763,70	23.232,90
F/36/N/F	23.814,80	26.261,00	21.495,90	26.051,60	24.514,90	26.945,10	22.463,50	26.986,20	22.389,70	24.695,60	22.170,90	20.703,40	25.886,60
F/37/N/F	10.202,40	18.137,30	19.500,60	14.874,00	18.779,20	19.779,60	14.982,70	20.090,60	9.048,53	19.048,00	17.557,10	19.241,10	7.488,26
F/38/N/F	28.153,50	28.707,80	25.545,10	17.874,20	23.534,50	26.425,00	27.517,70	19.039,30	27.609,30	26.593,00	27.824,10	27.813,60	26.580,10
F/39/N/F	13.982,30	13.112,60	7.802,05	18.368,10	15.843,60	12.114,60	12.764,00	15.243,70	14.316,10	15.361,00	10.762,10	15.015,40	9.597,14
F/40/N/F	21.762,00	19.389,40	19.355,50	19.397,50	16.694,90	16.987,90	20.752,70	19.129,60	22.103,70	22.261,40	19.796,90	20.590,90	21.278,80
F/41/N/F	19.583,70	23.024,30	23.556,20	21.627,80	23.933,00	16.524,70	15.399,60	23.590,80	18.567,70	20.953,30	22.421,40	21.607,60	22.100,60
F/42/N/F	29.346,60	28.713,40	28.081,20	24.786,50	29.325,30	26.249,20	31.328,70	27.168,60	26.693,20	27.438,50	28.156,30	26.807,50	28.806,30
F/43/N/F	25.328,20	21.882,40	22.277,70	26.147,30	15.746,90	24.425,00	25.994,40	24.047,10	25.266,60	26.597,10	22.492,10	21.605,30	25.941,80
F/44/N/F	25.287,20	29.509,80	25.681,70	31.794,60	28.539,20	31.788,40	31.335,90	25.439,00	24.418,40	29.182,50	27.380,40	30.068,10	29.726,90
F/45/N/F	27.829,70	28.232,20	28.473,80	10.741,20	27.409,60	24.965,70	24.313,90	26.218,80	23.347,80	27.062,30	9.552,25	15.753,10	24.268,30
F/46/85/F	23.739,90	19.300,60	20.751,60	21.292,40	22.985,10	21.068,20	20.647,40	14.278,80	10.357,80	21.679,70	14.835,00	25.333,20	20.958,10
F/47/85/F	22.956,30	28.146,20	27.244,30	19.838,10	29.658,20	10.442,40	23.082,70	23.590,20	17.156,40	31.189,10	22.729,10	21.619,80	10.282,20
F/48/85/F	23.621,30	18.609,10	17.400,00	19.502,30	19.108,90	16.813,50	21.187,70	21.976,10	18.898,30	18.584,80	19.038,60	23.790,20	23.107,90
F/49/85/F	13.242,30	16.514,10	14.157,00	8.051,18	18.322,80	13.473,90	18.025,00	14.442,80	13.580,90	16.234,60	14.127,70	17.142,20	15.517,40
F/50/85/F	16.635,40	24.208,90	22.707,00	23.408,80	15.103,90	22.027,30	23.950,30	18.795,10	14.513,10	24.496,90	24.044,70	20.317,00	23.643,20
F/51/140/F	12.829,90	14.867,10	13.628,90	17.017,50	16.054,70	11.326,40	12.607,30	18.893,80	15.786,60	14.821,20	16.670,00	15.659,20	12.372,20
F/52/140/F	27.097,90	27.578,60	29.093,70	21.060,20	23.917,90	26.026,50	12.139,30	25.061,40	20.358,30	19.974,10	23.114,10	14.218,30	17.127,30
F/53/140/F	23.562,40	22.546,10	23.814,40	14.960,80	18.889,20	24.292,50	20.743,10	20.771,40	23.057,70	21.594,80	10.508,80	15.188,60	21.299,70
F/54/140/F	16.588,00	21.686,80	13.914,50	28.659,10	20.355,50	27.128,10	24.525,70	18.428,20	36.410,60	35.542,10	20.665,30	22.159,30	22.410,50
F/55/140/F	23.360,00	15.487,80	16.903,90	15.962,80	38.269,20	25.893,90	30.042,70	23.999,90	30.443,60	34.984,10	34.067,70	26.447,00	29.990,30

ANEXO 2 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 2E1 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 27	Campo 28	Campo 29	Campo 30
F/28/60/F	27.296,00	18.270,20	24.806,10	19.100,20
F/29/60/F	4.660,05	10.364,40	9.618,32	13.063,60
F/30/60/F	15.599,50	4.613,90	6.027,72	13.436,60
F/31/70/F	10.312,30	15.614,50	19.123,40	20.325,00
F/32/70/F	25.341,20	19.493,30	14.933,90	20.629,10
F/33/70/F	19.606,40	14.949,40	19.541,50	15.578,70
F/34/70/F	24.137,10	30.446,50	25.749,20	23.170,90
F/35/70/F	25.379,30	18.757,70	23.511,10	24.599,50
F/36/N/F	17.409,00	23.132,30	24.118,20	24.009,50
F/37/N/F	21.387,20	18.189,50	20.604,00	15.991,10
F/38/N/F	26.871,80	23.347,80	23.291,00	28.813,60
F/39/N/F	17.720,30	12.850,90	16.008,80	11.988,40
F/40/N/F	18.780,80	22.630,00	23.615,90	19.797,60
F/41/N/F	16.653,20	21.169,90	16.356,30	21.263,90
F/42/N/F	21.414,00	27.901,80	22.993,00	28.277,20
F/43/N/F	24.012,30	20.350,10	25.640,70	25.738,20
F/44/N/F	30.136,70	27.751,40	32.287,30	26.252,20
F/45/N/F	29.606,10	10.533,20	27.279,80	20.872,90
F/46/85/F	18.626,70	23.204,00	25.215,10	18.828,60
F/47/85/F	22.232,10	21.607,60	18.655,90	24.857,70
F/48/85/F	22.094,90	23.825,00	23.495,10	18.615,90
F/49/85/F	10.165,70	17.233,00	10.438,20	13.052,00
F/50/85/F	22.040,30	19.421,40	18.194,00	17.434,30
F/51/140/F	9.616,22	17.051,30	20.791,90	19.756,50
F/52/140/F	14.072,60	25.776,10	21.400,40	30.807,30
F/53/140/F	15.224,40	18.479,90	17.219,80	17.525,60
F/54/140/F	29.497,10	27.141,70	19.544,80	31.419,20
F/55/140/F	30.047,60	33.113,40	30.583,30	23.640,80

ANEXO 3 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 3A4 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Campo 04	Campo 05	Campo 06	Campo 07	Campo 08	Campo 09	Campo 10	Campo 11	Campo 12	Campo 13
F/01/30/F	8948,51	12618,90	11450,90	19209,90	22219,40	19408,50	19959,50	22194,00	20744,90	11258,10	4738,46	11167,50	12883,60
F/02/30/F	26294,50	28743,70	23570,30	26663,50	26483,10	25411,80	23190,80	27552,70	24040,10	30024,30	29807,00	22543,50	27396,80
F/03/30/F	27378,00	28043,60	28163,00	26920,70	28668,50	28621,10	25330,70	20053,90	24617,10	12988,00	28877,00	28005,30	22692,40
F/04/30/F	15270,80	25717,00	24682,80	23514,20	26113,40	25024,50	28428,00	29066,90	23801,20	23573,10	26833,50	23778,50	28703,30
F/05/30/F	12993,50	26934,90	30535,00	33144,30	34291,70	34883,30	33555,70	33885,50	34193,90	24785,50	35024,60	31650,50	33403,90
F/06/35/F	16180,90	26898,70	27126,50	25724,60	25225,10	24577,00	22597,50	18143,80	18858,50	15487,50	19857,80	25412,20	26838,90
F/07/35/F	24878,50	24963,60	25435,80	27488,80	27520,70	26682,10	27275,30	28279,00	28311,70	26525,70	24921,80	26806,40	23416,00
F/08/35/F	24962,60	26350,40	26374,20	24003,60	24542,80	23929,20	20492,40	26748,60	27802,60	27272,50	25502,60	25160,10	25771,70
F/09/35/F	17828,90	17295,00	7716,63	10638,70	16094,50	9655,21	18984,00	17633,50	13485,80	6649,84	14611,10	15049,00	15323,10
F/10/35/F	11236,70	17984,30	20059,60	19539,40	17350,20	19359,70	16913,30	13146,20	11660,90	16530,50	20550,30	22392,80	19307,50
F/11/40/F	25843,00	28968,20	27722,70	25863,80	24763,40	25815,90	26787,20	23487,70	21724,50	21519,00	19308,90	24860,20	27973,30
F/12/40/F	17575,90	27955,00	28596,70	24832,20	24999,40	23491,70	24245,00	30484,10	30432,60	23587,70	24743,00	23260,00	29381,70
F/13/40/F	25285,00	26076,60	22813,80	33429,70	32509,80	29513,30	34308,30	35016,90	34713,40	34562,70	33107,40	32852,20	33044,50
F/14/40/F	18292,00	17559,70	19399,50	18429,50	18217,80	17691,00	17212,60	17098,00	16709,60	17630,40	16465,40	20206,40	18766,60
F/15/40/F	7163,52	5136,42	9441,30	10710,20	9326,13	8641,17	7576,49	6939,51	7651,96	11534,00	17988,90	11748,40	8987,93
F/16/45/F	21205,40	28006,30	27986,20	29310,70	28788,10	27931,00	26869,70	10215,60	27579,30	27112,30	17055,90	19533,50	26989,50
F/17/45/F	15292,10	16222,40	14197,00	12101,30	15328,30	15211,70	16344,90	14111,20	15349,50	14178,50	11913,30	16752,40	9168,46
F/18/45/F	17242,80	19649,90	19409,70	20256,40	20583,40	19729,60	15494,80	19125,80	17523,50	19106,20	15252,20	17818,10	15581,80
F/19/45/F	23175,40	18802,20	10620,00	16456,70	23946,20	24871,70	23186,50	19709,10	12279,00	22771,40	22108,90	23850,10	20377,10
F/20/45/F	9403,14	9662,79	10276,20	10136,60	9741,06	9114,32	13151,50	12285,40	11536,60	13741,50	13676,70	14018,90	15791,50
F/21/50/F	7145,29	8467,23	7013,43	5265,33	3970,74	2939,59	3491,85	3891,49	4471,52	2807,73	2208,76	2295,73	2865,10
F/22/50/F	22608,70	23960,50	19730,60	19815,00	18971,40	21742,10	22243,30	18182,30	19783,20	21036,80	17519,00	19184,50	13606,00
F/23/50/F	20131,30	25023,10	24997,60	2114,10	23933,30	25131,90	23803,40	22815,60	26961,80	22947,30	21703,90	25056,80	23771,10
F/24/50/F	23288,60	22310,20	26959,40	22901,00	20456,20	16907,10	24062,10	19582,30	21995,80	24202,90	12999,90	22266,00	22598,00
F/25/50/F	22608,70	23960,50	19730,60	19815,00	18971,40	21742,10	22243,30	18182,30	19783,20	21036,80	17519,00	19184,50	13606,00
F/26/60/F	20131,30	25023,10	24997,60	21114,10	23933,30	25131,90	23803,40	22815,60	26961,80	22947,30	21703,90	25056,80	23771,10
F/27/60/F	18793,50	13566,30	16848,60	14007,60	15635,00	15819,70	15526,10	16024,10	17238,40	11797,90	15247,90	16507,60	11944,10

ANEXO 3 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 3A4 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20	Campo 21	Campo 22	Campo 23	Campo 24	Campo 25	Campo 26
F/01/30/F	15422,20	19619,30	21100,30	17555,20	19716,80	23402,10	24537,70	17421,20	9260,62	9372,70	18102,10	22206,50	16682,30
F/02/30/F	27419,00	25828,70	26329,20	27980,50	25575,50	29399,90	23882,50	25232,00	11518,90	29136,90	18881,50	22805,20	22951,40
F/03/30/F	27507,80	23835,40	23654,40	27539,50	27252,10	24131,00	25630,90	27800,50	25571,70	26782,60	24800,60	29569,70	28178,40
F/04/30/F	28830,30	24083,50	17989,00	24164,20	22960,40	29021,30	27485,60	24588,80	23992,60	29892,00	29577,40	30565,50	31182,40
F/05/30/F	34866,70	34175,60	32817,90	31726,70	31141,20	26735,30	31732,40	31345,10	25864,00	32668,50	32800,30	30483,70	34001,60
F/06/35/F	28645,30	19132,80	6259,18	17285,40	27119,80	26573,30	27221,50	25670,90	27762,80	25500,20	22441,60	18644,70	21602,70
F/07/35/F	26678,80	16314,70	27513,80	19843,80	23454,00	22186,30	25416,00	25416,00	23819,80	23975,10	26361,30	27309,30	27471,00
F/08/35/F	26919,50	22647,60	22773,50	24760,20	23585,40	23688,40	24268,10	26942,50	25825,60	25312,20	24431,80	24067,00	23624,60
F/09/35/F	18242,10	18452,90	20184,30	24338,40	21785,10	15710,40	16888,00	8838,26	5255,79	6516,58	9450,27	12636,70	12114,20
F/10/35/F	18482,70	22062,90	17640,60	11279,70	17375,80	12181,40	10027,10	15456,10	15341,20	21128,20	18245,20	21684,90	15034,20
F/11/40/F	28078,40	22876,60	19422,90	18499,90	15413,90	22169,90	13366,60	15194,10	19212,50	20462,10	20317,70	17158,80	13470,80
F/12/40/F	21864,50	30492,40	28823,00	32204,70	30538,30	29497,00	30604,70	27334,10	27685,10	26452,40	26515,10	25077,20	30883,50
F/13/40/F	29572,30	32590,20	32997,80	23863,70	32985,30	33434,80	34002,20	28759,40	32337,60	18953,00	26742,60	34339,10	31809,30
F/14/40/F	19074,80	19632,60	19989,90	20026,50	18029,70	19915,30	18842,90	18162,60	16031,80	16237,70	18328,70	19879,70	17858,70
F/15/40/F	9216,58	8913,16	9116,84	8564,58	9381,82	11384,10	10983,80	14761,50	13247,50	14658,90	14751,10	12103,60	8481,40
F/16/45/F	22151,10	30729,00	18992,70	23718,10	25777,90	26200,00	26544,80	25188,20	23440,10	23379,80	27182,10	24816,20	23308,10
F/17/45/F	17715,40	11479,50	14600,30	17405,20	11159,50	12503,90	16910,10	12552,20	17606,70	9846,13	11982,50	14097,80	12753,00
F/18/45/F	11185,30	17629,50	15349,40	19893,50	20254,20	21444,70	20923,40	23411,10	23294,80	21705,80	22272,90	20203,80	17973,10
F/19/45/F	17793,90	21946,00	24214,40	18679,10	22570,80	23235,20	24622,20	25610,80	22655,50	22849,10	23291,80	16718,20	23417,00
F/20/45/F	12743,20	13645,20	13785,20	12973,00	11796,50	16736,40	13424,70	15362,80	17191,60	18049,60	14581,60	16771,30	15561,20
F/21/50/F	4350,89	5289,74	3780,25	3728,91	10216,30	12359,40	5433,38	6856,18	6602,01	6855,06	5687,98	3058,54	2521,01
F/22/50/F	19316,60	18226,70	19174,60	19437,00	17223,90	17553,10	14469,70	14781,30	15140,50	17652,40	19008,30	15023,90	16898,60
F/23/50/F	21013,40	22954,30	20978,40	18379,70	19276,10	23534,90	18490,40	26295,20	23482,90	25855,30	20825,00	28732,50	23518,50
F/24/50/F	23484,10	22970,50	20508,10	24961,00	20880,00	24104,20	22162,80	20686,00	22490,70	22852,10	23244,80	23174,80	23665,00
F/25/50/F	19316,60	18226,70	19174,60	19437,00	17223,90	17553,10	14469,70	14781,30	15140,50	17652,40	19008,30	15023,90	16898,60
F/26/60/F	21013,40	22954,30	20978,40	18379,70	19276,10	23534,90	18490,40	26295,20	23482,90	25855,30	20825,00	28732,50	23518,50
F/27/60/F	15498,50	15719,40	12464,20	14034,20	14337,00	13387,50	15420,20	9542,86	13890,00	13296,60	12661,00	14146,20	14774,20

ANEXO 3 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 3A4 (animais 1 a 27).

Continua...

	Campo 27	Campo 28	Campo 29	Campo 30
F/01/30/F	22040,20	22967,20	23059,40	20985,30
F/02/30/F	29887,50	21150,70	27695,60	30579,80
F/03/30/F	23274,30	24605,50	25550,10	23999,90
F/04/30/F	29955,10	27351,90	28319,10	27305,60
F/05/30/F	16918,30	28060,50	20617,60	33240,80
F/06/35/F	25441,00	26686,20	28965,20	27160,60
F/07/35/F	26970,10	29416,90	27230,90	27884,10
F/08/35/F	23477,60	23007,60	22358,00	21952,20
F/09/35/F	16444,80	16677,60	14997,80	5282,31
F/10/35/F	20602,10	20998,90	19133,40	18284,90
F/11/40/F	13881,40	14110,50	12450,20	14099,80
F/12/40/F	23711,40	27170,40	30089,00	29407,40
F/13/40/F	34361,60	33074,80	32496,20	30943,80
F/14/40/F	17453,50	17843,20	18037,00	17483,10
F/15/40/F	8014,43	12643,50	14033,50	11566,20
F/16/45/F	27930,10	27676,80	26424,90	28737,80
F/17/45/F	9876,29	13563,50	11545,60	14036,70
F/18/45/F	22216,60	21998,80	21012,90	21069,90
F/19/45/F	22748,00	21367,40	21551,00	24146,50
F/20/45/F	17678,20	17308,20	13820,20	9638,66
F/21/50/F	2421,41	2233,73	3288,45	3632,68
F/22/50/F	18880,90	17329,50	13018,70	16220,60
F/23/50/F	24553,30	25579,30	25651,70	26113,70
F/24/50/F	19504,10	22285,90	23344,70	22669,30
F/25/50/F	18880,90	17329,50	13018,70	16220,60
F/26/60/F	24553,30	25579,30	25651,70	26113,70
F/27/60/F	12152,50	15189,50	13634,10	13623,90

ANEXO 3 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 3A4 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 01	Campo 02	Campo 03	Campo 04	Campo 05	Campo 06	Campo 07	Campo 08	Campo 09	Campo 10	Campo 11	Campo 12	Campo 13
F/28/60/F	33450,50	33443,30	31149,70	34099,40	30286,00	31854,20	29196,80	31450,90	24666,00	32997,80	26917,10	32813,20	28584,20
F/29/60/F	20187,60	26246,80	30551,20	27534,30	21604,90	23550,40	25922,50	23747,30	23490,30	24815,50	25630,50	23514,70	25605,70
F/30/60/F	22088,80	25182,20	21716,60	19976,30	23211,60	27107,70	13497,90	17111,20	29881,40	26199,60	28608,10	30891,00	25745,90
F/31/70/F	29919,10	9878,95	17547,90	27431,50	27634,00	19061,60	28967,50	28119,90	17354,40	21878,90	24768,80	24708,60	17913,20
F/32/70/F	21982,10	23427,20	26897,20	25217,40	27647,60	21690,50	24987,30	23702,70	22457,20	16881,30	16107,40	23583,90	24073,70
F/33/70/F	21017,60	21148,70	27509,00	8590,53	29922,30	13307,80	17060,20	15195,30	28659,60	21048,30	23616,70	26620,40	21442,50
F/34/70/F	23473,10	23012,70	24363,50	29673,70	28576,00	25328,90	23938,90	18245,20	18623,40	26077,80	30370,90	27319,70	20315,50
F/35/70/F	12603,20	19545,90	18588,40	19044,20	23266,20	21896,40	20367,80	25819,40	25378,40	23637,90	13119,00	19748,20	26125,80
F/36/N/F	10195,70	19485,60	19463,60	28975,90	24304,20	25105,70	20780,50	28038,70	30383,10	33480,40	33825,20	34216,10	33199,70
F/37/N/F	11256,20	11317,70	11980,30	17358,50	20260,10	15861,60	15614,80	20258,40	13172,40	14295,90	19656,60	14053,00	21566,90
F/38/N/F	19830,10	22342,00	25631,20	22709,60	22403,50	27949,50	24913,70	25276,90	27610,90	22096,80	28781,70	29521,10	27396,80
F/39/N/F	29265,60	25944,00	29215,30	27067,70	25030,10	25791,00	28925,40	24377,10	27204,60	27276,90	22209,50	24272,10	25881,40
F/40/N/F	23127,60	24746,90	22629,70	26435,40	26548,60	26049,80	29187,70	26785,20	24407,60	20711,80	22346,20	17900,00	24263,10
F/41/N/F	10956,10	15890,80	11626,90	5013,96	10803,50	14662,20	9587,46	7136,45	11469,80	13939,80	11187,10	10584,50	14004,70
F/42/N/F	16109,80	19943,60	21687,70	21706,00	21711,80	19134,20	19961,40	20479,60	17632,70	20003,20	19625,60	19554,10	20638,30
F/43/N/F	23080,20	25783,50	20644,30	19742,90	25825,70	22432,10	27691,50	24301,40	24716,30	23851,90	22863,40	20639,70	21157,30
F/44/N/F	7424,29	8547,47	12000,70	12013,60	15221,30	11622,60	11743,90	12861,20	15643,90	13978,70	15403,50	13921,10	16568,10
F/45/N/F	10806,00	20551,70	15413,90	14415,40	23609,40	12537,10	6993,93	11628,60	15855,60	30690,20	27404,50	20854,40	23438,00
F/46/85/F	2358,71	3026,14	8026,21	12467,20	8101,40	13783,30	15486,30	11528,40	8577,91	10215,80	14050,00	14059,30	11862,70
F/47/85/F	23529,20	20811,60	25458,40	17244,10	6682,24	20246,10	20993,40	11837,60	27971,80	24916,90	19830,80	25476,00	18308,60
F/48/85/F	8480,42	5509,69	4617,83	6094,49	6801,90	7395,26	5202,49	6280,22	9184,03	12582,50	8304,94	10756,90	8930,42
F/49/85/F	6110,49	7442,67	7719,71	5631,59	7801,91	7652,10	6424,98	8591,94	10251,70	6147,27	8026,21	8776,68	5416,69
F/50/85/F	22765,40	24188,50	22934,10	13442,30	17940,20	17891,10	20229,60	19793,40	28345,80	20039,70	20314,40	20534,60	13334,90
F/51/140/F	24590,90	27197,90	22543,90	17115,30	24198,40	30823,90	19559,00	24940,20	20780,50	30087,70	32909,50	30955,40	30238,80
F/52/140/F	13472,80	10931,30	22521,30	13577,30	22933,00	15702,90	23650,40	14412,20	7184,85	11102,30	10605,40	20466,70	18768,70
F/53/140/F	14611,20	7932,51	5423,98	1110,41	2593,25	9201,15	11726,20	11778,80	8288,66	15655,70	13126,40	10901,60	4812,81
F/54/140/F	18322,90	18071,00	23145,90	26243,90	26027,90	26217,10	26279,80	27946,10	25667,80	22162,30	24668,50	17781,20	15405,10
F/55/140/F	30494,90	26464,70	29533,20	29162,70	29625,20	32589,90	34819,80	33237,10	32745,90	28633,20	29131,00	29340,00	29128,80

ANEXO 3 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 3A4 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 14	Campo 15	Campo 16	Campo 17	Campo 18	Campo 19	Campo 20	Campo 21	Campo 22	Campo 23	Campo 24	Campo 25	Campo 26
F/28/60/F	29550,00	34359,60	35780,40	31129,00	32711,10	31977,30	33602,40	31402,50	28950,50	30544,40	30207,10	29959,60	29334,10
F/29/60/F	12241,30	11891,20	11456,90	7147,11	27210,00	23677,20	24655,30	26224,10	25838,00	22684,30	24415,30	12612,30	19317,60
F/30/60/F	19429,00	15885,60	26046,80	27081,80	24914,20	28604,20	30142,40	28337,10	26413,80	29561,50	27722,00	24025,70	29709,50
F/31/70/F	22032,00	20012,40	14892,50	32043,50	30377,90	17176,40	22978,90	18827,60	23752,90	22956,70	28189,40	28757,80	24289,00
F/32/70/F	22704,10	15693,70	16264,70	21363,60	19897,50	25309,50	30945,50	25858,40	7012,31	17529,10	22834,10	25736,40	26969,70
F/33/70/F	16772,00	23118,70	24739,90	26370,20	29811,80	32038,80	32430,80	30786,50	30447,40	27584,40	26135,90	23789,90	28127,10
F/34/70/F	23695,70	18300,30	28666,90	24919,60	30866,60	31408,90	26739,90	29637,80	27850,20	29198,20	29499,10	30911,20	30445,00
F/35/70/F	27890,00	16273,50	23580,40	24234,90	18341,10	23053,10	20894,00	30300,90	24579,80	26982,90	28464,00	21638,10	26748,60
F/36/N/F	30741,10	26737,40	29016,30	19870,50	28152,80	32977,80	32774,80	31540,90	33648,00	29947,10	33772,60	35133,20	31074,20
F/37/N/F	17277,90	21775,20	24478,70	23212,20	21513,20	24162,90	19048,00	23525,00	16389,40	20595,20	11295,70	20422,20	14788,80
F/38/N/F	28434,60	28042,20	29142,50	30276,50	26628,70	24059,30	27236,90	29813,90	26640,70	27315,90	27842,90	30068,30	30686,70
F/39/N/F	25821,70	22940,40	26710,60	23735,20	25269,30	27450,50	20963,10	24667,50	22072,10	25415,30	29002,40	27285,20	29020,40
F/40/N/F	13221,10	29103,30	32083,20	28669,10	31262,20	29760,30	19616,50	27551,40	26408,00	29734,60	29547,90	30089,10	28954,10
F/41/N/F	9259,92	12979,40	10588,00	17092,80	17277,30	16178,00	18111,60	14242,50	12272,60	10996,70	3809,01	15779,20	14837,40
F/42/N/F	20925,10	22822,20	20056,70	22657,10	18527,30	21889,70	18711,90	21746,40	15267,70	12989,70	19324,30	18267,20	20478,80
F/43/N/F	16920,20	16464,40	21908,90	20077,90	22831,90	22554,80	19437,20	21190,20	17124,80	20260,40	23079,20	14695,70	18009,70
F/44/N/F	15448,30	17736,30	19611,70	17697,10	20398,10	22858,80	24035,00	21731,30	19236,90	19315,20	18565,20	20487,90	23561,30
F/45/N/F	21324,20	14319,20	13563,30	23861,80	19726,90	30571,80	21298,00	10232,00	11140,60	14867,10	26352,90	25941,50	31534,10
F/46/85/F	19676,50	16388,90	13747,30	11783,50	7000,24	7566,95	8372,27	9397,67	8380,82	4828,38	9653,53	12290,30	20619,60
F/47/85/F	24264,20	24669,60	26520,70	15350,30	20895,70	21310,70	16921,10	22289,60	21747,70	13273,40	21763,70	20619,90	27234,70
F/48/85/F	6950,87	8768,40	7185,27	8030,42	8556,17	9178,84	8581,98	6859,41	7528,38	10131,60	11583,00	10141,50	6840,33
F/49/85/F	9587,88	6996,74	6920,15	11017,70	7483,35	7535,11	8063,38	10118,70	8212,63	12123,60	11134,00	11124,30	13824,90
F/50/85/F	18740,80	25021,00	25183,00	26642,70	26582,70	29600,40	27333,10	30426,00	28484,90	23138,00	24709,20	18312,50	18596,30
F/51/140/F	27698,50	35537,10	33477,30	33105,40	29276,90	30547,20	27547,10	31191,80	32240,90	33696,10	31490,30	28391,90	29082,90
F/52/140/F	10780,20	21749,80	12226,60	17080,80	10301,00	5683,07	15125,90	15330,40	8926,63	5458,21	13847,50	8422,91	15751,40
F/53/140/F	3316,64	5198,70	6021,13	14413,60	21833,80	20899,70	5989,85	15155,20	20040,70	8210,39	11395,60	10727,20	9743,73
F/54/140/F	22867,90	26834,50	24056,90	25418,70	27819,20	27256,30	25658,80	26640,20	25599,30	26514,60	19160,30	19596,30	17933,20
F/55/140/F	22664,70	33371,80	31254,40	35335,50	29752,20	36877,80	34540,60	32339,80	30024,30	28544,30	29825,20	18781,60	27325,40

ANEXO 3 – Contagem da área marcada pelo anticorpo 3A4 (animais 28 a 55).

Continua...

	Campo 27	Campo 28	Campo 29	Campo 30
F/28/60/F	32963,00	28925,20	32951,80	33696,00
F/29/60/F	25323,10	14187,50	23332,70	23200,40
F/30/60/F	26283,60	29818,10	17622,90	29586,90
F/31/70/F	25532,90	27221,50	22212,30	24567,60
F/32/70/F	30602,40	27228,50	22707,60	27417,20
F/33/70/F	27380,30	27547,30	30422,80	20028,90
F/34/70/F	28991,00	30527,20	32476,30	27608,40
F/35/70/F	20303,20	25588,00	26098,90	18202,00
F/36/N/F	35443,50	35942,30	34052,10	31921,20
F/37/N/F	20469,50	20333,30	24367,50	19200,00
F/38/N/F	31185,10	30932,80	20977,40	14033,50
F/39/N/F	29544,70	24658,70	29335,40	27205,20
F/40/N/F	27570,80	26169,10	20826,80	29477,80
F/41/N/F	12211,00	11537,70	13750,00	13572,70
F/42/N/F	23036,50	20526,20	16068,00	22691,30
F/43/N/F	20305,50	18973,40	19625,10	22337,30
F/44/N/F	22061,60	22683,90	22361,30	20174,70
F/45/N/F	17935,90	23633,40	20526,70	24807,10
F/46/85/F	19695,80	12757,00	15498,90	12829,50
F/47/85/F	27083,40	13927,30	10627,70	24633,40
F/48/85/F	10809,10	11383,40	8964,64	8216,84
F/49/85/F	14234,70	13810,40	12851,90	14750,30
F/50/85/F	22221,30	23169,40	28809,50	28044,50
F/51/140/F	33108,50	29429,80	26779,00	31090,70
F/52/140/F	7359,63	11904,40	8948,23	12605,90
F/53/140/F	17287,70	10275,20	5532,42	16757,00
F/54/140/F	26874,70	29096,00	29701,10	28756,40
F/55/140/F	24191,30	29936,60	27787,10	30175,10

