



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI*  
SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

**BRUNO HENRIQUE ANDRADE GALVÃO**

**RECIFE/PE**

**2014**

**BRUNO HENRIQUE ANDRADE GALVÃO**



**TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM CAMUNDONGOS  
INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI*  
SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

**Orientadora** : Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Célia M. M. Barbosa de Castro

**RECIFE/PE**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G182t Galvão, Bruno Henrique Andrade.  
Translocação bacteriana em camundongos infectados com *schistosoma mansoni* submetidos à desnutrição neonatal / Bruno Henrique Andrade Galvão. – Recife: O autor, 2014.  
120 f.: il. tab.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Célia M. M. Barbosa de Castro.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.  
Inclui referências e anexos.

1. Esquistossomose. 2. Desnutrição. 3. Translocação bacteriana. I. Castro, Célia M. M. Barbosa de (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-122)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

## RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO

**BRUNO HENRIQUE ANDRADE GALVÃO**

No dia 25 de Fevereiro de 2014, às 09h00, na Sala de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE)** – Presidente da Banca, a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE)**, a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti (UFPB)**, a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Adenilda Queirós dos Santos Deiró (UFBA)** e o Prof. Dr. **Carlos Roberto Weber Sobrinho (UFPE)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o doutorando **BRUNO HENRIQUE ANDRADE GALVÃO** sobre a sua Tese intitulada “**TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Schistosoma mansoni* SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL**”, a qual foi orientada pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Célia Maria Machado Barbosa de Castro (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho**

APROVADO

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Maria Amélia Vieira Maciel**

Aprovado

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti**

APROVADO

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Adenilda Queirós dos Santos Deiró**

Aprovado

Prof. Dr. **Carlos Roberto Weber Sobrinho**

Aprovado

---

**Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho**

---

**Profa. Dra. Maria Amélia Vieira de Melo**

---

**Profa. Dra. Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti**

---

**Profa. Dra. Adenilda Queirós dos Santos Deiró**

---

**Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Souza Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

*Dedico este trabalho aos meus pais, Silvana Andrade e Zivonaldo Galvão. Devo a vocês todas as conquistas da minha vida. Sou eternamente grato pelos exemplos que tive para me tornar uma pessoa com bases nos princípios pregados pela unidade familiar de amor, carinho, dedicação, respeito, honestidade, compreensão, valores fundamentais na formação do meu caráter e personalidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ser a força presente em forma de fé, por se fazer presente em toda minha jornada e sempre amparando de situações diversas;

Aos meus pais, Zivonaldo e Silvana, por toda dedicação, carinho e investimento para que pudesse realizar meus sonhos e incentivar sempre ao próximo sonho, e a minha irmã, Thaíse Galvão, pelo incentivo;

A minha família, Avós, Tias e Primos (em especial Tia Cris e Ceíça) por acreditar e incentivar em busca de sonhos;

A minha orientadora, Célia Castro, pela oportunidade, ensinamentos e desafios;

Em especial e com muito carinho, a amiga e parceira, Danielly Cantarelli pelo apoio incondicional durante toda fase experimental e na vida, “Dani” não consegui achar uma única palavra para agradecer por tudo, pelos almoços, ligações, festas, conselhos e ensinamentos, enfim por tudo minha eterna AMIGA;

Ao professor Nicodemos Teles, por toda ajuda e paciência;

Ao amigo, André Aires por toda ajuda e companheirismo, principalmente na fase experimental, esse trabalho não seria realidade sem sua ajuda e o doutorado me presenteou com sua amizade;

A amiga Kedma Magalhães, por colaborar na ideia e ajuda desde a concepção e finalização desse trabalho, meu muitíssimo obrigado;

Aos Mestres que fazem o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, em especial a Prof<sup>a</sup> Rosangela Coelho, pela amizade, confiança, profissionalismo, respeito e empenho durante uma jornada longa de pós-graduação  
Stricto Senso;

Aos meus amigos e lutadores da turma de doutorado, André Aires, Carlos Weber, Daniela Aquino e Fabiana Letícia, por cada segundo de cumplicidade e amizade que vai além dos muros da universidade;

Ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA-UFPE), em especial ao Prof<sup>o</sup> José Luiz de Lima, pela ajuda durante difíceis momentos durante a jornada. A Prof<sup>a</sup> Mônica Camelo pela contribuição na infecção experimental. A todos funcionários, em especial a Ilma Santos por acreditar e a confiança depositada;

A todos do Setor de Microbiologia Clínica do LIKA, em especial a Kedma Magalhães, Natalia Gomes, Liliane Lemos, Carlos Miranda, Sandy Beatriz, Clarissa Ataíde e Fátima Diniz;

A setor de Patologia do LIKA, em especial Carmelita Cavalcanti e Marina Cartaxo pelo profissionalismo, carinho e apoio;

Ao biotério do LIKA, em especial a veterinária Maria Helena Madruga, por todo apoio, ensinamentos e dedicação durante a fase experimental, meus sinceros agradecimentos;

A todos funcionários e colegas da Pós-graduação em Medicina Tropical pelo convívio, apoio e aprendizado, agradeço a Walter Leite e Alice Fernanda;

As professoras e funcionários do Departamento de Medicina Tropical, Amélia Maciel, Ana Catariana, Cleide Miranda, Ivanize Aca, Vera Magalhães, Obrigado por acreditar em mim, além de incentivar e a farmacêutica Graça Antas (sou eternamente grato) e Dejanira pelo amor e preocupação. A Luzia Ribeiro e as "Sônias" pelo carinho e dedicação;

Aos amigos da FACIPE, em especial Kedma Magalhães, Karla Romana, Ivanacha Carneiro, Caroline Sanuzi, Ana Paula Sobral, Andrea Rosane, Odinson Brandão, Mariana Donato, Katia Botelho, Paula Pereira, Mariana Brayner, Carlos Eduardo, Patrícia Machado, André e Leo, pela torcida e preocupação;

Aos amigos da Faculdade SENAC, em especial a Suzane França, Sandra Marinho, Robson Lustosa, Mônica Panetta, Marcos Barros pelo incentivo e força durante a obtenção desse sonho;

Aos meus alunos que sempre acreditaram e incentivaram no meu potencial durante todos momentos, os quais me ensinam diariamente;

Aos meus amigos, Alexandre Carneiro, Felipe Sampaio, André Aires, Augusto Queiros, Wallace Nascimento, pelo companheirismo, confiança, amizade, atenção, incentivo e os momentos de diversão e alegria, sem vocês minha vida não seria tão intensa e feliz. Posso dizer que serão irmãos para toda vida; Muito obrigado!

A Profª Marília Cavalcanti pela grande incentivadora, pela amizade, ensinamentos e por sempre se fazer presente, Marília você foi outro presente de Deus durante esse doutorado;

As amigas e irmãs Wylla Tatiana e Sueli Sena, obrigado por tudo!

Aos amigos e irmãos Profª Conceição Lira, Bartolomeu Santos e Solange Cordeiro, pela confiança e companheirismo. Obrigado amigos!

As amigas que serão para toda vida, que me incentivaram e foram exemplo desde a graduação, Vanessa Leal e Michele Galindo;

Aos amigos de graduação, em especial Karla Melo que juntos passamos por grandes momentos de alegrias e dificuldades, ainda Amanda Marcelino e Alexandra Morais. Pessoas que serão amigas para eternidade!

Ao CNPq pela concessão da bolsa, que permitiu a viabilização da tese;

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização dessa tese.

*“Não busque feitos espetaculares.  
O que importa é a doação de si mesmo,  
O grau de amor que se coloca  
Em cada uma de suas ações”  
Madre Teresa de Calcutá*

## RESUMO

**Galvão, B. H. A.** Translocação bacteriana em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* submetidos à desnutrição. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco.

**Introdução:** Desnutrição e esquistossomose são problemas de saúde pública que ocorrem simultaneamente em regiões endêmicas do mundo. Nessas zonas o *Schistosoma mansoni*, observa-se, frequentemente, uma sobreposição de desnutrição e infecção parasitária. As lesões intestinais causadas pela infecção parasitária e o efeito de uma nutrição deficiente na resposta imunológica intestinal, como ocorre na desnutrição, podem predispor ao desenvolvimento do processo de translocação bacteriana. **Objetivo:** Observar se em camundongos adultos na fase crônica da esquistossomose, submetidos à desnutrição no período do aleitamento, há diferença na ocorrência de translocação bacteriana em relação ao sexo. **Métodos:** Camundongos fêmeas *Swiss webster* (n=60) foram divididos, no período de aleitamento, em 2 grupos: Nutrido (N) e Desnutrido (D) – amamentados por mães alimentadas com dieta contendo 17% e 8% de proteína à base de caseína, respectivamente. Aos 35-45 dias de vida, 15 animais de cada grupo foram infectados com, em média, 30 cercárias de *S. mansoni*, constituindo os grupos: Nutrido Infectado (NI), Nutrido Não Infectado (NNI), Desnutrido Infectado (DI) e Desnutrido Não Infectado (DNI). O peso corporal (PC) dos animais foi mensurado diariamente no período de aleitamento e semanalmente a partir do 22º dia. 45 dias após a exposição cercariana, foi realizada a confirmação da infecção pelo método de Kato-katz. Aos 161 dias de vida, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras biológicas para estudo da translocação bacteriana (TB), análises da microbiota e morfometria intestinal. Para estudo da TB, foram coletados sangue periférico e da veia porta, fragmentos de órgãos e linfonodos mesentéricos. Para a microbiota, as fezes foram coletadas da região média do intestino delgado. Segmentos desta região foram seccionados transversalmente e longitudinalmente para análise morfométrica. **Resultados:** Os animais do grupo D apresentaram um menor ganho de PC em relação ao grupo N a partir do 3º dia, diferença observada durante todo o período experimental. Verificou-se um maior índice de TB nos animais infectados, comparando-os aos não infectados. Entre os infectados, houve uma maior incidência de TB no grupo D comparado ao N, entretanto, a diferença não foi significativa quanto ao sexo. Observou-se um maior número de ovos e vermes recuperados no grupo N, entretanto não houve diferença na maturação de ovos na mucosa intestinal. Quanto a morfometria intestinal, houve diferença entre NI e NNI para altura e área da vilosidade, e apenas na altura para NI e DNI. Observamos uma maior diversidade de colônias nos grupos de animais desnutridos, controle e esquistossomóticos. **Conclusões:** A desnutrição modifica a resposta imune e pode favorecer translocação bacteriana em camundongos, em ambos os sexos e é mais intensa nos animais infectados por *S. mansoni*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esquistossomose. Desnutrição. Translocação bacteriana.

## ABSTRACT

**Galvão, B.H.A.** Bacterial translocation in mice infected with *Schistosoma mansoni* subjected to malnutrition 2014. Thesis (PhD), Federal University of Pernambuco. Center of Medical Sciences Health. Postgraduate Program in Tropical Medicine. Recife. Pernambuco.

**Introduction:** Malnutrition and schistosomiasis are worldwide public health problems that can occur simultaneously. On the endemic areas, people who suffer from malnourishment frequently have a *Schistosoma mansoni* infection. Intestinal injuries caused by parasites and the nocive effects of malnutrition on the intestinal immune defenses can promote bacterial translocation process. **Aim:** To evaluate if maternal low protein diet on the lactation period predispose the adult mice on chronic phase of *S. mansoni* infection to intestinal bacterial translocation. We also study if the malnutrition effects were sex-related. **Methods:** Sixty Swiss Webster female mice were bred, and in the lactation period they were divided in two groups: Nourished (N) that received a 17% casein based diet; and Malnourished (M) that received an 8% casein based diet. On the period of 35-45 days of life, 15 pups from each group were infected with 30 cercariae of *S. mansoni*, approximately. Then, the following groups were formed: Non Infected Nourished (NIN); Infected Nourished (IN); Non Infected Malnourished (NIM); and Infected Malnourished (IM). Offspring body weight (BW) was measured daily until weaning, and then weekly starting on the 22<sup>nd</sup> day of life. The infection was confirmed by Kato-katz method 45 days after cercariae exposure. On the 161st day of life the samples were collected to determine the intestinal bacterial translocation and the intestinal morphometry. Peripheral and portal blood, organs fragments and mesenteric lymph nodes were collected to determine the occurrence of intestinal bacterial translocation. Feces were collected from medium length of small intestine and used for bacterial profile identification. Additionally, transversal and longitudinal sections of the small intestine (medium length) were used for morphometric analysis. **Results:** Mice from M group presented lower body weight than mice from N group starting on the 3rd day of life until the end of the experiment. Infected mice presented higher bacterial translocation levels than non infected ones. Among infected groups, there were higher levels of bacterial translocation in M group when compared to the N group. However, these differences were not sex-related. Mice from N group showed a higher number of eggs and worms recovered, although there were no differences on the eggs maturation in the intestinal mucosa. Regarding intestinal morphometry, mice from IN group showed higher villosity height and area than NIN group. Still, mice from IN group presented lower villosity height than NIM group. On the intestinal bacterial profile analysis, only mice from the M group, non infected or infected, showed higher diversity when compared with N group. **Conclusions:** Early life malnutrition impairs the immune response and promotes the intestinal bacterial translocation in adult mice. These effects are not sex-related and are aggravated in the presence of *S. mansoni* infection.

**KEYWORDS:** Schistosomiasis. Malnutrition. Bacterial translocation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da distribuição da esquistossomose.	26
Figura 2	Representação esquemática das vias de translocação bacteriana intestinal.	36
Figura 3	Evolução da fome no mundo e na América Latina e Caribe de 1990/92-2011-13.	42
Figura 4	<b>A.</b> Camundongos <i>Swiss webster</i> . <b>B.</b> Gaiolas de camundongos, com cama de maravalha, ração Labina® e bebedouro, alojadas no Biotério do LIKA/UFPE.	52
Figura 5	Distribuição de grupos de camundongos que foram submetidos a estudos.	53
Figura 6	Moluscos da espécie <i>B. glabrata</i> infectados, em meio aquático e sob exposição à luz artificial.	56
Figura 7	<b>A.</b> Obtenção da suspensão cercariana. <b>B.</b> Cercária liberada pelo molusco e observada com auxílio da microscopia óptica (20X)	56
Figura 8	Camundongos anestesiados e expostos à suspensão cercariana, por via percutânea, e luz artificial.	56
Figura 9	Método de Kato-Katz. <b>A.</b> Helm-test®, <b>B.</b> Recolhimento das fezes que passam pela malha, <b>C.</b> Papel de celofane emergido em solução verde malaquita a 3%, <b>D.</b> Lâminas preparadas	57
Figura 10	Observação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> pelo método Kato-Katz.	58
Figura 11	Incisão mediana xifo pubiana para coleta de amostras biológicas.	59

## ARTIGO II

Figura 1	Aspectos histológicos da região media do intestino delgado por grupo experimental coradas pelo Tricrômico de Masson. (a) NNI- Nutrido Não Infectado, (b) NI- Nutrido Infectado, (c) DNI – Desnutrido Não Infectado; (d) DI – Desnutrido Infectado.	93
----------	--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição da dieta Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação dos animais	50
Tabela 2	Composição da dieta padrão Labina® (Purina do Brasil) utilizada na alimentação dos animais.	51

### ARTIGO I

Tabela 1	Composição (g/100g da mistura) das rações utilizadas na alimentação materna	67
Tabela 2	Frequência de translocação bacteriana em camundongos desnutridos e eutróficos, machos e fêmeas.	71
Tabela 3	Distribuição da frequência de bactérias por UFC (log <sub>10</sub> /g de fezes) isoladas de amostras entéricas camundongos machos desnutridos e nutridos.	72
Tabela 4	Distribuição da frequência de bactérias por UFC (log <sub>10</sub> /g de fezes) isoladas de amostras entéricas camundongos fêmeas desnutridas e nutridas.	72

### ARTIGO II

Tabela 1	Composição (g/100g da mistura) das rações utilizadas na alimentação materna.	84
Tabela 2	Número médio de vermes recuperados, ovos eliminados por g/fezes e estágio de maturação de ovos em camundongos esquistossomóticos nutridos e desnutridos. Média ± DP, *p<0,05.	88
Tabela 3	Distribuição da frequência relativa e absoluta de isolados bacterianos em amostras entéricas por grupo.	89
Tabela 4	Incidência de translocação bacteriana segundo os grupos de comparação. Dados como frequência absoluta e relativa – Fisher e Yates corrigido.	90

Tabela 5	Frequência de translocação bacteriana por tecido.	90
Tabela 6	Comparação da morfometria da mucosa duodenal e do fígado entre os grupos: NI- Nutrido Infectado, NNI- Nutrido Não Infectado, DI – Desnutrido Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Média $\pm$ DP – One-way ANOVA.	93

## LISTA DE GRÁFICOS

### ARTIGO I

Gráfico 1	Curva ponderal de camundongos machos nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Média ± EPM – Two-Way ANOVA, *p<0,05.	69
Gráfico 2	Curva ponderal de camundongos fêmeas nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Média ± EPM - Two-Way ANOVA, *p<0,05.	69
Gráfico 3	Curva ponderal de camundongos machos do 35º até o 161º dia de vida. D- Desnutrido, N – Nutrido. Dados como média ± EPM - Two-Way ANOVA. *p<0,05.	70
Gráfico 4	Curva ponderal de camundongos fêmeas do 35º até o 161º dia de vida. D- Desnutrido, N – Nutrido. Dados como média ± EPM - Two-Way ANOVA. *p<0,05.	70

### ARTIGO II

Gráfico 1	Curval ponderal de camundongos nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Média ± EPM - Two-way ANOVA, *p<0,05.	87
Gráfico 2	Curva ponderal de camundongos do 35º até o 161º dia de vida. NI- Nutrido Infectado, NNI- Nutrido Não Infectado, DI – Desnutrido Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Média ± EPM – Two-way ANOVA.	88

## SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
<b>2.1 Esquistossomose mansônica</b> .....	26
2.1.1 Aspectos epidemiológicos.....	26
2.1.2 Transmissão.....	29
2.1.3 A doença.....	31
<b>2.2 Translocação microbiana via TGI</b> .....	33
2.2.1 Generalidades.....	34
2.2.2 Translocação bacteriana na esquistossomose.....	39
<b>2.3 Esquistossomose e desnutrição</b> .....	41
3. HIPÓTESES.....	47
4. OBJETIVOS.....	48
5. METODOLOGIA.....	49
<b>5.1. Desenho do estudo</b> .....	49
<b>5.2 Animais e dietas</b> .....	49
<b>5.3 Formação dos grupos de estudo</b> .....	52
<b>5.4 Categorização das variáveis</b> .....	54
<b>5.5 Padronização das técnicas</b> .....	55
<b>5.5.1 Avaliação do peso corporal</b> .....	55
<b>5.5.2 Obtenção das cercárias e infecção dos camundongos</b> .....	55
<b>5.5.3 Contagem de ovos</b> .....	57
<b>5.5.4 Coleta de amostras</b> .....	58
<b>5.5.5 Perfusão do sistema porta-hepático</b> .....	59
<b>5.5.6 Estudo da translocação bacteriana</b> .....	59
<b>5.5.7 Avaliação da Microbiota Intestinal</b> .....	60
<b>5.5.8 Análise morfométrica da mucosa intestinal</b> .....	61
5.6 Análise estatística.....	62
6. RESULTADOS.....	63
<b>6.1 -Artigo Original</b> .....	63
<b>6.2 -Artigo original</b> .....	80
7- CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXO – Aprovação Comitê de Ética.....	120

## **1. INTRODUÇÃO**

---

Desnutrição e esquistossomose são problemas de saúde pública que ocorrem simultaneamente em muitas regiões endêmicas do Brasil e do mundo. É frequente a associação da esquistossomose e a desnutrição, uma vez que a deficiência nutricional é capaz de interferir na formação de processos essenciais para a defesa do hospedeiro. (PORDEUS et al., 2008) Na desnutrição, a maioria dos mecanismos de defesa do organismo está prejudicada. Além disso, as infecções são as maiores causas de morbidade e mortalidade em indivíduos severamente desnutridos (MELO et al., 2007).

Dados epidemiológicos têm mostrado efeitos prejudiciais de desnutrição e infecção no estado de saúde, cognição e comportamento em crianças afetadas com morbidades concorrentes (STEPHENSON et al., 2000, CROMPTON & NESHEIM, 2002; MUNIZ et al., 2002; HUGHES & KELLY, 2006; CASAPÍA et al., 2007; JARDIM-BOTELHO et al., 2008). Estudos anteriores no Nordeste do Brasil têm demonstrado que a esquistossomose mansônica e desnutrição muitas vezes se sobrepõem (COUTINHO et al., 1997) e a infecção exerce um efeito negativo sobre o desenvolvimento de crianças em idade escolar (PARRAGA et al., 1996, ASSIS et al., 1998).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que a desnutrição intra-uterina está intimamente associada com adversidades na idade adulta (GODFREY & BARKER, 2000, VICKERS et al., 2001). Entre as crianças, a desnutrição energético-protéica é o distúrbio nutricional mais prevalente e muitas vezes, ocorre durante a gestação (DESAI et al., 2000). De fato, dados experimentais relataram que a desnutrição materna durante o período crítico da lactação pode ter efeitos deletérios durante a vida adulta da prole, mesmo que os animais tenham feito reposição nutricional (PASSOS et al., 2000, 2004; VICENTE et al., 2004; FAGUNDES et al., 2007; MOURA et al., 2007; LISBOA et al., 2008).

As doenças infecciosas e parasitárias têm efeitos desfavoráveis sobre o estado de nutrição (SCRIMSHAW et al., 1997), embora a influência do parasitismo intestinal ainda gere controvérsias. Modelos experimentais de infecção pelo *S.*

*mansoni* tem contribuído notavelmente para o melhor conhecimento da patologia e da patogênese da esquistossomose mansônica (CHEEVER et al., 2000). Esta patologia, nas regiões endêmicas, assume papel importante, restringindo a utilização biológica dos alimentos, especialmente pelas lesões hepáticas e intestinais que são provocadas nos indivíduos infectados (BATISTA FILHO & BARBOSA, 1985).

As lesões intestinais causadas pela infecção parasitária e o efeito de uma nutrição deficiente na resposta imunológica intestinal, como ocorre na desnutrição, podem predispor ao desenvolvimento do processo de translocação bacteriana. Esse processo pode ocorrer por falha na barreira intestinal e está caracterizado pela absorção prejudicada de nutrientes, comprometimento da resposta imunológica intestinal e aumento da permeabilidade do intestino. (DE-SOUZA e NETO, 2005)

A translocação está associada ao risco aumentado de sepse, supondo o intestino, como o causador da mesma. Esta hipótese propõe que a bactéria, que normalmente reside dentro do lúmen intestinal, possa translocar através das células do epitélio intestinal e atuar como propagadora da sepse em sítios distantes (WIEST & RATH, 2003).

Acredita-se que para ocorrer à passagem de micro-organismos e endotoxinas da luz intestinal para a corrente sanguínea há necessidade da existência isolada ou conjunta de danos na imunidade do paciente, alteração da microbiota e quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal (DWINELL et al., 2003; WIEST & RATH, 2003). Na literatura pesquisada, não foram encontrados estudos que esclareçam as dúvidas a respeito da associação de translocação bacteriana, desnutrição e esquistossomose mansônica, mesmo sabendo que o último provoca, além de alterações no sistema imunológico, dano ao intestino, sistema porta e Linfonodos Mesentéricos (LM).

Em indivíduos esquistossomóticos pode ocorrer drenagem prejudicada por ação mecânica, traumática, irritativa e espoliativa dos parasitos adultos que se alimentam de sangue e obstruem os vasos. A ação traumática dos vasos mesentéricos deve-se também aos ovos espiculados que os atravessam pelo

intestino e são expelidos nas fezes (KATZ & ALMEIDA, 2003). Além disso, sabe-se que ocorre baixa resposta imune celular na fase crônica da doença (CARVALHO et al., 1994). Demonstrou-se recentemente que há predomínio de resposta de linfócitos T auxiliares 2 (Th2) na forma hepatoesplênica da esquistossomose (PEARCE et al., 1991; WILLIAMS et al., 1994). A resposta Th2 predominante inibe, por sua vez, a resposta Th1, fato que poderia provocar imunodeficiência relativa.

A esquistossomose, como agente facilitador de doenças bacterianas, encontra-se bem documentada na associação com bactérias Gram-negativas (TEIXERA, BINA & BARRETO, 1976). Já foi descrita a interação da esquistossomose com bactérias Gram-positivas (LABERTUCCI et al., 1990). Estudos experimentais mostraram maior ocorrência de abscesso hepático estafilocócico em camundongos portadores de esquistossomose quando comparados aos controles sem a doença (TEXEIRA et al., 1995). No caso das bactérias aeróbicas Gram-negativas, a translocação pode ocorrer com certa facilidade, até mesmo em indivíduos não injuriados, com enterócitos intactos. Bactérias anaeróbicas, translocam apenas em situações em que o intestino se encontra estruturalmente danificado. Estudos mostram que bactéria intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos sem outras condições associadas. Isto leva a crer que disfunção imune promove primariamente translocação bacteriana (TB) (WIEST & RATH, 2003).

A TB envolvendo a barreira da mucosa intestinal tem sido estudada como causa de sepse em pacientes susceptíveis, incluindo aqueles com cirrose e hipertensão porta (STRAUSS & CALY, 2003; MATTOS et al., 2003). Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que investiguem bacteremia em esquistossomóticos como consequência da TB. NISHIOKA et al (1992) relatou um caso de associação de bacteremia por *Serratia marcescens* e esquistossomose mansônica, mas não cogita a possibilidade de translocação. Em 1993, FERRAZ et al., estudando modelo de peritonite experimental em camundongos com esquistossomose, reforçaram as pesquisas clínicas que diagnosticaram maior susceptibilidade às infecções. Em estudo de série de

casos, FERRAZ et al (2005) evidenciaram a prevalência de bactérias aeróbias em LM de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e conclui que a presença destas bactérias, como conseqüência da TB, pode desempenhar um papel no desenvolvimento de complicações infecciosas pós-operatória no grupo de pacientes estudados.

Ainda há muito o que esclarecer sobre a associação entre organismos adultos submetidos à desnutrição perinatal, seguida de recuperação nutricional e as doenças parasitárias como esquistossomose, e os componentes da defesa imunitária. Além da contribuição científica, estes estudos experimentais podem auxiliar em planejamento de estratégias em saúde pública voltadas para aquelas populações acometidas de desnutrição no passado e com infecções parasitárias no indivíduo adulto.

Diante da existência de lacunas na compreensão de determinadas respostas imunológicas no processo de TB e esquistossomose, considerando que o estado nutricional do hospedeiro é tido como um dos prováveis fatores coadjuvantes no agravamento da infecção parasitária (SILVA, 2008), o presente estudo se contribuirá com conhecimentos a cerca dos aspectos imunológicos envolvidos na associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana, avaliando-os em camundongos submetidos ou não à desnutrição neonatal. Nenhum estudo até o momento explorou, os efeitos conjuntos da desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional, da esquistossomose na sua fase crônica e da translocação bacteriana. Portanto, é bastante relevante determinar se a desnutrição durante o período de lactação pode ocasionar no organismo adulto, sequelas nas suas defesas frente a uma infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

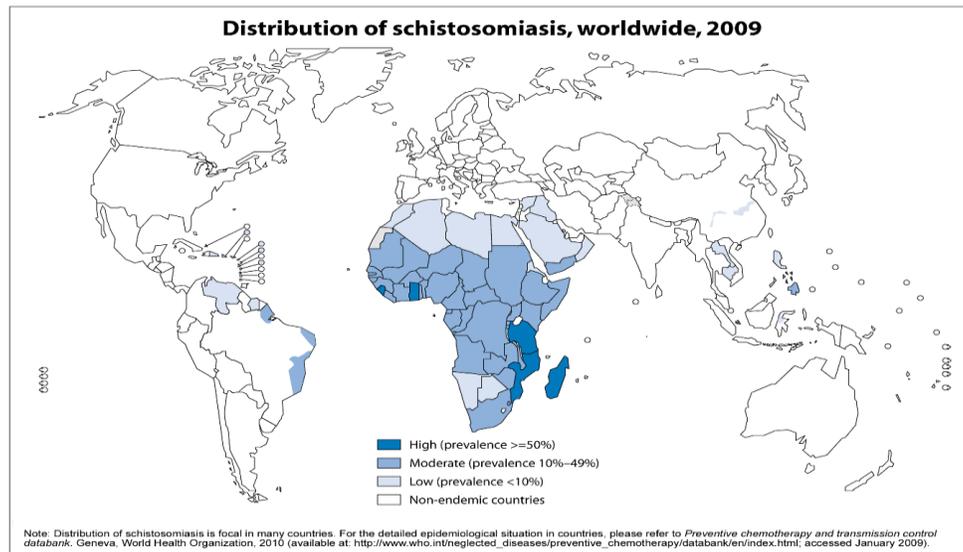
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Esquistossomose mansônica

#### 2.1.1 Aspectos epidemiológicos

Dentre as doenças parasitárias, a esquistossomose é um problema de saúde pública mundial e se destaca como uma das infecções que mais afetam as populações humanas. O número de países considerados endêmicos para esquistossomose aumentou de 77 em 2010 para 78 em 2011, refletindo a independência do Sudão do Sul em 2011 (WHO, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2011, a distribuição da doença está representada na figura 1 (WHO, 2010).

Figura 1 - Mapa da distribuição da esquistossomose.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (CNTD)  
World Health Organization



Fonte: World Health Organization (2010).

Estima-se que aproximadamente 25 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença, e que 2,5 a 6 milhões se encontram infectadas (WHO, 2010). As áreas endêmicas e focais abrangem 19 estados no Brasil. A esquistossomose ocorre de forma endêmica nos estados de Sergipe, Maranhão, Bahia, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas, Espírito Santo, Minas Gerais e Pernambuco. No Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (BRASIL, 2011).

O percentual de positividade no período de 1990 a 2010 aponta uma prevalência média de 8%. Mesmo nas unidades da Federação consideradas endêmicas, a distribuição espacial da esquistossomose não é homogênea. As áreas mais afetadas são caracterizadas por condições precárias ou inexistentes de saneamento básico, pobreza, baixos níveis de escolaridade e água tratada (BRASIL, 2011).

As sugestões atuais da OMS preconizam que o controle da esquistossomose deve ser realizado de forma que haja uma integração de diferentes ações: tratamento dos infectados, promoção da educação em saúde, implementação de saneamento básico e fornecimento de água tratada (WHO, 2008).

O panorama mundial mostra que a esquistossomose foi eliminada do Japão e da Tunísia e está próxima da eliminação no Marrocos e em algumas ilhas do Caribe. Progressos substanciais foram realizados para o controle da infecção no Brasil, China e Egito (ZHOU et al., 2008). Por outro lado, a esquistossomose tem sido identificada em áreas não endêmicas, o que aumenta a preocupação de que a migração descontrolada, o turismo rural, o desenvolvimento de novas represas e sistemas de irrigação, o desmatamento e o aquecimento global possam acelerar a transmissão (ENK et al., 2010a; FENWICK, 2006; STEINMANN et al., 2006; ZHOU et al., 2008;).

A esquistossomose, segundo o Ministério da Saúde, continua sendo uma parasitose relevante no Brasil, embora a Política de Vigilância Epidemiológica esteja em atividade a mais de uma década. Ressalta-se ainda que a morbidade e

a mortalidade da doença estejam relacionadas às manifestações clínicas decorrentes da fase crônica da doença (FERREIRA e SILVA, 2007; BRASIL, 2011).

No estado de Pernambuco, a esquistossomose é endêmica na região rural, acometendo pessoas de baixa renda e apresentando-se comumente na forma crônica. O principal hospedeiro intermediário de ocorrência no estado é o molusco *Biomphalaria straminea*. Entretanto, em razão das migrações de trabalhadores rurais, bem como o crescimento dos espaços urbanos, a doença migrou em direção ao litoral, veiculada por um novo caramujo, *Biomphalaria glabrata*, e atingindo populações de maior renda, assumindo nesse contexto, um caráter de infecção aguda. Apenas no ano de 2011, mais de 300 casos foram registrados em todo o estado de Pernambuco (COUTINHO et al., 1997; BARBOSA et al., 2001; BRASIL. S. V. S., 2011).

Apesar do diagnóstico e tratamento serem relativamente simples, o controle da esquistossomose demanda medidas de saneamento básico, bem como educação da população, representada pelas mudanças de comportamento dos indivíduos residentes de áreas endêmicas. O principal objetivo dessas medidas é a interrupção do ciclo evolutivo do parasita, porém, encontra obstáculos importantes, tais como, a população de caramujos, a não disponibilidade de uma vacina, o tempo necessário para a população mudar seus hábitos e o custo das obras de saneamento básico, entre outros (CARVALHO et al., 1998; KATZ, 1999; KATZ e PEIXOTO, 2000; KATZ e ALMEIDA, 2003; COURA e AMARAL, 2004; FERREIRA e SILVA, 2007).

São várias as ações de controle que o governo brasileiro propõe para enfrentar o grave problema de saúde pública da esquistossomose. Para tanto, são desenvolvidas estratégias que propõe tratar a comunidade residente nas áreas de maior risco, de modo a reduzir a transmissão e complicações da doença. Inúmeras ações são necessárias para o controle e erradicação de doenças parasitárias, entre elas a necessidade de melhorias nas condições de saneamento. O Ministério da Saúde (2013) desenvolveu o plano integrado de ações estratégicas de eliminação de doenças negligenciadas e outras

relacionadas com a pobreza (OPAS: CD49. R19/2009), essas formam um conjunto de doenças que tendem a coexistir em áreas em que a população apresenta precárias condições de vida. Esse plano busca o compromisso político e institucional de redução da carga das doenças em eliminação e otimizar os recursos disponíveis para o enfrentamento desse grupo de doenças relacionadas a pobreza, entre elas a esquistossomose (BRASIL, 2013).

Ainda em 2013, o governo brasileiro publicou uma portaria nº 3.097 cuja finalidade é a implantação de ações contingenciais de vigilância, prevenção e controle da hanseníase e esquistossomose, como problemas de saúde pública. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013)

Dessa forma, pesquisas para o melhor entendimento da patogênese da doença, bem como a compreensão da associação da esquistossomose com outras doenças infecciosas, podem contribuir no implemento de ações, cujo objetivo seja buscar novos instrumentos de controle da doença, bem como tratamento, permitindo assim, a redução da morbidade e mortalidade causadas pela parasitose.

### **2.1.2 Transmissão**

A cadeia de transmissão da esquistossomose acontece quando o hospedeiro definitivo infectado elimina ovos viáveis de *S. mansoni* pelas fezes que entram em contato com coleções de água, contaminando-as. Neste ambiente, os ovos eclodem liberando uma forma larvar ciliada, denominada miracídio, que infecta o hospedeiro intermediário, moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*.

No caramujo, os miracídios passam por modificações morfológicas e se multiplicam na forma de esporocistos, dando origem às formas larvares infectantes, denominadas cercárias. Estas são eliminadas na água e, ao encontrar o mamífero suscetível (humanos, alguns primatas e roedores), penetram ativamente na pele ou mucosas. Ao penetrar no hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Estes, invadem preferencialmente os vasos venosos e são carregados passivamente para o coração e bombeados para os pulmões até alcançarem o fígado, onde se desenvolvem e amadurecem

sexualmente. No fígado, os vermes adultos acasalam e migram para as veias mesentéricas do intestino, onde as fêmeas passam a liberar ovos que, na luz intestinal, são eliminados com as fezes do hospedeiro, recomeçando o ciclo (LENZI et al., 2008).

Diferentes medidas de intervenção podem ser usadas para reduzir a morbidade da doença, bem como, prevenir ou interromper a transmissão do parasito entre o homem e o molusco hospedeiro intermediário (Figura 1). Essas medidas incluem a quimioterapia, o saneamento ambiental, o controle de moluscos, o abastecimento de água e a educação ambiental e em saúde. A quimioterapia tem duplo benefício: reduzir a morbidade causada pela presença dos vermes adultos no hospedeiro humano e diminuir o número de ovos eliminados no meio ambiente. O saneamento ambiental tem a vantagem de evitar ou reduzir a contaminação das coleções hídricas pelos ovos eliminados nas fezes, impedindo a liberação de miracídios que, de outra forma, infectariam o hospedeiro intermediário. O controle de moluscos visa reduzir sua densidade populacional, impedindo a evolução das formas larvares do parasito intra-molusco. A provisão de água encanada tem o benefício de prevenir o contato humano com coleções de água contaminadas por cercárias. Já a educação ambiental e em saúde tem como objetivo fortalecer o exercício da cidadania através da participação de toda a população no contexto e no cotidiano do controle da esquistossomose. Como nenhuma das medidas acima têm se mostrado efetiva por si só, o sucesso do controle da esquistossomose depende de seu uso combinado, levando em conta as peculiaridades de cada área. (MOZA et al., 1998; UCHOA et al., 2000)

A esquistossomose é considerada uma doença multifatorial (GAZZINELLI et al., 2006), estando sua ocorrência associada tanto a determinantes intrínsecos como extrínsecos. Os determinantes intrínsecos são de natureza biológica como os fatores genéticos e a resposta imune dos indivíduos suscetíveis. Esses determinantes são importantes objetos de investigação que podem gerar novas tecnologias para o controle da esquistossomose, como vacinas, novos fármacos e técnicas de diagnósticos mais eficazes. Os determinantes extrínsecos são os de ordem socioeconômica, ecológica e comportamental e também são importantes

alvos das ações voltadas para a prevenção e o controle. Esses determinantes estão relacionados, principalmente, à pobreza, às condições precárias de moradia, à ausência de saneamento básico, à presença do hospedeiro intermediário nas coleções hídricas, ao contato humano com a água contaminada, ao pouco conhecimento sobre a doença, à dificuldade de acesso aos serviços de saúde, dentre outros. Vários grupos de pesquisa no Brasil identificaram diversos fatores tanto intrínsecos quanto extrínsecos em comunidades endêmicas, levando a uma maior compreensão do padrão epidemiológico da doença e reconhecendo a necessidade de medidas de intervenção integradas para o controle sustentado da endemia em nosso país (BARRETO, 1991; BARBOSA FS; COIMBRA Jr, 1992; LIMA e COSTA et al., 1994; COURA-FILHO, 1994; BARBOSA CS, 1998; GAZZINELLI A et al., 1998, 2001, 2006a; XIMENES et al., 2000, 2003; ALVES-OLIVEIRA et al., 2006; GAZZINELLI MF et al., 2006, 2008; GUIMARÃES et al., 2006; ARAÚJO et al., 2007; CALDAS et al., 2008).

### **2.1.3 A doença**

As alterações fisiológicas geradas na infecção causada pelo *S. mansoni* acompanham o desenvolvimento do parasita no hospedeiro. A cercária, o esquistossômulo e o verme adulto exercem papéis diferenciados na geração da patologia. A doença irá se desenvolver em duas fases, uma fase inicial chamada de aguda e a fase posterior chamada a fase crônica. Esta fase pode apresentar 3 formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. (REY, 2008)

A evolução clínica da doença é dependente da resposta do hospedeiro à invasão, ao desenvolvimento e a oviposição do verme. Tal evolução pode alcançar formas clínicas extremamente graves envolvendo quadros de hepatoesplenomegalia, fibrose hepática, varizes esofagianas, hemorragias digestivas e conseqüentemente, a morte. A evolução para formas crônicas da doença está relacionada a intensidade da infecção e geralmente ocorre em localidades onde a prevalência está entre 2 a 7% (MESQUITA, 2004).

Na fase aguda, o homem ou outro hospedeiro definitivo pode apresentar dermatite cercariana decorrente da morte de parte das cercárias que penetraram

na pele. As manifestações clínicas são micropápulas, com intensidade e duração geralmente pequenas (LAMBERTUCCI; SILVA; VOIETA, 2005). O desaparecimento dos sinais cutâneos corresponde ao período de incubação, que pode durar de quatro a oito semanas, quando há o desenvolvimento dos esquistossômulos (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

Essa fase caracteriza-se clinicamente por febre elevada, mal estar geral, astenia, urticária, tosse seca, náuseas, vômitos, cefaléia, diarreia, dores musculares e desconforto abdominal (KATZ; ALMEIDA, 2003). Em virtude desses sintomas também ocorrerem em várias outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não sugerir o diagnóstico. O exame físico pode detectar abdome distendido e doloroso, com fígado e baço aumentados (REY, 2008). Caso não seja diagnosticada e tratada corretamente, a doença pode evoluir para a fase crônica (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Na fase crônica inicial, os principais sintomas são indisposição, vertigem, anorexia, empachamento pós-prandial e surtos diarreicos, alternados por constipação intestinal (LAMBERTUCCI et al., 2000; KATZ e ALMEIDA, 2003; BARBOSA et al., 2004).

Quando o paciente evolui para a doença crônica, podendo durar vários anos, ocorrem sinais de progressão para diversos órgãos. A patogênese da forma crônica resulta da resposta imune do hospedeiro aos ovos do helminto depositados, principalmente no sistema venoso portal. A fibrose periportal resultante dessa resposta imune leva ao surgimento da hipertensão portal, quadro clínico característico da fase crônica (JESUS et al., 2000).

Nas áreas endêmicas, a forma intestinal é muito comum sendo mais frequentemente encontrada em pacientes cronicamente infectados que, geralmente, são assintomáticos. Na maioria dos casos, os sintomas permanecem discretos enquanto a carga parasitária for baixa e o acúmulo de ovos nos tecidos for pequeno. Nesse estágio, as lesões hepáticas são moderadas e os sintomas tais como, perda de apetite, desconforto abdominal, astenia, cólicas intestinais, diarreia e disenteria são geralmente brandos e bastante variáveis, podendo persistir durante anos, pela dificuldade de diagnóstico, além de haver sintomas

similares a outros tipos de doença (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; LAMBERTUCCI et al., 2000). À medida que os ovos são arrastados pela circulação e se alojam no fígado, a parasitose se agrava, levando o paciente a desenvolver a forma hepatointestinal. Embora a sintomatologia de ambas as formas seja semelhante, as lesões hepáticas na forma hepatointestinal são mais intensas que na intestinal, com baço e fígado discretamente palpáveis (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; REY, 2008).

Com o progresso da doença o paciente pode evoluir e desenvolver a forma hepatoesplênica, que se caracteriza pelo comprometimento e aumento considerável do fígado e baço (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994). A forma hepatoesplênica compensada é caracterizada por hepatoesplenomegalia com discreta hipertensão portal. Nessa fase, há pacientes que permanecem na sua forma clínica estacionária ou podendo evoluir para a forma mais grave da doença, a hepatoesplênica descompensada, a qual acomete uma porcentagem pequena da população infectada (cerca de 10%), dependendo da área de estudo (ANDRADE; VAN MARCK, 1984). Os altos índices de mortalidade por esquistossomose ocorrem, principalmente, nessa forma, sendo suas principais manifestações clínicas ascite, circulação colateral e formação de varizes gastroesofágicas, decorrentes da hipertensão portal ocasionada pela fibrose hepática de Symmers. Quando essas varizes rompem, ocorrem hemorragias digestivas graves, muitas vezes fatais (BRASIL, 2006; PRATA, 1997; REY, 2008).

O conhecimento da patobiologia da esquistossomose em indivíduos que sofreram desnutrição contribuirá para preencher uma lacuna no conhecimento quanto ao impacto que a doença parasitária exerce em indivíduos com alterações metabólicas. A associação dessas desordens tem alto impacto financeiro para o sistema público de saúde, onde o entendimento irá subsidiar o planejamento das ações em saúde coletiva para que promovam estratégias e assim minimizar a mortalidade.

## **2.2 Translocação microbiana via TGI**

### 2.2.1 Generalidades

Dentre todos os sistemas orgânicos, o trato gastrointestinal (TGI) é reconhecido como um sistema cujo papel não é exclusivo a ações de digestão e excreção de alimentos, mas também um órgão metabólico e de defesa a micro-organismos e moléculas antigênicas (MacFIE, 2004). Ele possui uma arquitetura fisiológica eficaz composta por vários componentes, tais como uma barreira celular composta por uma camada de células epiteliais colunares interpostas por células especializadas como linfócitos e células M, tecido linfóide associado ao intestino, suco gástrico, enzimas pancreáticas, bile, muco e peristaltismo.

Em condições normais, o TGI abriga uma comunidade microbiana extremamente densa e diversa, chamada de microbiota normal, indígena ou residente podendo ser colonizado por cerca de  $10^{14}$  micro-organismos (DUNNE, 2001). Toda esta comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkuhn ou na superfície do epitélio intestinal. A concepção e manutenção constitui um processo complexo multifatorial, como: dieta, idade, utilização de antimicrobianos, utilização de probióticos e prebióticos, ambiente, microbiota materna, via de parto, interação microbiana, presença de certos genes e receptores, demanda nutricional e além da sucessão ecológica. (VAN DER WAAIJ, 1989; BOURLIOUX et al., 2003). Segundo Nicoli (1995), a microbiota é um ecossistema imensamente complexo, que pode ser comparado a uma entidade funcional dentro do hospedeiro.

Algumas das funções da microbiota intestinal têm considerável importância para o hospedeiro. Entre elas, a resistência à colonização, a modulação do sistema imunológico e participação na nutrição do hospedeiro (McFARLAND, 2000). De forma geral, os micro-organismos da microbiota residente são inócuos e benéficos na sua localização normal no hospedeiro e na ausência de anormalidades. Entretanto, os membros da microbiota podem provocar doenças em certas circunstâncias. Estes micro-organismos estão adaptados ao modo de vida não-invasivo, definido pelas limitações do meio ambiente. Se forem retirados das

restrições desse ambiente e introduzidos na corrente sanguínea ou em tecidos, esses agentes pode, torna-se patogênicos. (BARBOSA et al., 2010)

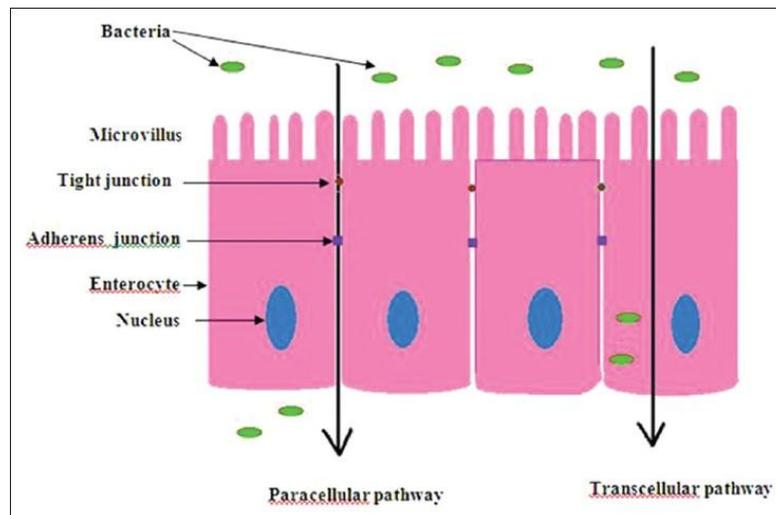
As evidências clínicas e laboratoriais mostram a alta incidência de infecções sistêmicas em diversas situações de injúria orgânica, aliada à presença de uma microbiota específica para cada tipo de infecção, dados que levou à formação do conceito de translocação microbiana. O intestino foi considerado o local mais importante na origem destas infecções, pelo fato de ser um grande reservatório de micro-organismos. Estes permanecem no lúmen intestinal, pois são contidos por uma eficiente barreira mucosa (SCHLEGEL et al., 2000; WIEST & RATH, 2003).

De início, a translocação foi definida como sendo a passagem de bactérias viáveis através do revestimento mucoso e da lâmina própria para os linfonodos e, possivelmente, para outros tecidos estéreis (BERG, 1995). Posteriormente, este conceito foi modificado e ampliado, definindo-se como a passagem de micróbios viáveis e não viáveis, assim como de seus produtos, a exemplo das endotoxinas e antígenos, através do processo da permeabilidade intestinal. O processo de translocação depende do papel de barreira exercido pela mucosa intestinal, sendo auxiliada pelos componentes do sistema imune celular (enterócitos, macrófagos e linfócitos T) e humoral (IgG, IgM e IgA secretória) (WIEST, RATH, 2003). Vários estudos em animais têm demonstrado que translocação é fenômeno multifatorial, que pode ser resultado do rompimento do equilíbrio normal da microbiota residente, o que contribui para excessivo crescimento de determinadas bactérias. O sistema imunológico do hospedeiro definhado ou a ruptura física da barreira intestinal também podem, isoladamente ou em associação, facilitar a passagem de bactéria via intestino (GENCAY et al., 2008; ZANONI et al., 2009; NIKITENKO, STADNIKOV, KOPYLOV, 2011).

De acordo com a literatura existem vários fatores preponentes para translocação bacteriana, é comum entre os autores que para ocorre TB, o processo está associado a três principais mecanismos: o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, o perfil imunológico e o aumento da

microbiota intestinal. Neste contexto, qualquer alteração de um ou todos esses componentes, pode favorecer a passagem de bactérias ou antígenos para locais extraintestinais (Figura 2), acarretando serias complicações (NAABER et al., 2000; GABE, 2001).

Figura 2 - Representação esquemática das vias de translocação bacteriana intestinal.



Fonte: Vaishnavi (2013).

Dentre os fatores que corroboram para que a translocação bacteriana ocorra, é o aumento da microbiota intestinal o principal fator. O microambiente do TGI contém uma grande variedade de micro-organismos aeróbios e anaeróbios, os quais impedem a colonização de micro-organismos patogênicos exógenos, empregando diversos mecanismos, como por exemplo, o de barreira de colonização. Diferentes fatores estão envolvidos com a redução da função da barreira de colonização, dentre eles, a desnutrição, choque, o uso de antibióticos orais, administração de nutrição enteral e parenteral, obstrução da vesícula e mais recentemente distúrbios psiquiátricos. Diversos micro-organismos podem ser translocados através da membrana intestinal entretanto, sob velocidades distintas. A capacidade de translocação é maior em linhagens específicas de bactérias, principalmente as que possuem maior capacidade de aderência e fixação ao epitélio produtor de muco. Esta capacidade geralmente está

associada aos bacilos entéricos portadores de fímbrias, por exemplo, alguns tipos de *Escherichia coli*. Dentre as bactérias Gram-negativas as Enterobactérias, tais como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* translocam de forma rápida, *S. epidermidis* de forma intermediária, enquanto geralmente os anaeróbios, por exemplo, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Fusobacterium*, em uma taxa muito lenta (BERG, 1995; MacFIE, 2000; MacFIE, 2004).

Alguns autores demonstram que diferentes elementos microbianos estão envolvidos no processo de translocação. Alguns desses parâmetros podem ser divididos em anatômicos e funcionais, isto é, nos fatores intrínsecos que influenciam no número e grau de virulência das bactérias que translocam facilmente; nos fatores que interferem na aderência provocando danos epiteliais e favorecendo a penetração por estresse oxidativo, acidose ou depleção de ATP e finalmente, fatores relacionados à resposta imune local e sistêmica do hospedeiro contra a translocação (WIEST e RATH, 2003).

O estado imunológico consiste no segundo mais importante fator, implicado com a translocação bacteriana. Em circunstâncias normais, os microorganismos translocados são fagocitados antes de atingirem os linfonodos mesentéricos e/ou vasos sanguíneos. No entanto, quando a resposta imunológica está comprometida por alguma razão, como nos casos de desnutrição, asplenia, atimia, uso de imunodepressores e leucemia, o evento se manifesta de forma mais agressiva, podendo evoluir para quadros infecciosos sistêmicos. Entretanto, cabe ressaltar que mesmo relacionada à morbidade nesta condição clínica, a translocação bacteriana não é considerada um elemento iniciador (BERG, 1995; MacFIE, 2004).

A literatura descreve que bactérias da microbiota intestinal podem causar doença sistêmica em indivíduos imunossuprimidos, sem outras condições associadas. Entende-se que o dano imunológico promove primariamente translocação (JANEWAY et al., 2002; WIEST, RATH, 2003; MACFIE, 2004). Contudo, a ocorrência de translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos em animais saudáveis foi observada por pesquisadores e tem sido considerada como parte de estimulação normal antigênica do tecido linfoide

associado ao intestino, mesmo na ausência de injúria (SCHLEGEL et al., 2000; STEINBERG, 2003). O processo de translocação ocorre em 3 estágios; no primeiro estágio, a bactéria atravessaria a mucosa intestinal, alcançando os linfonodos mesentéricos; no segundo estágio, a bactéria migraria dos linfonodos mesentéricos para outros órgãos como fígado, baço, pulmões e rins; e no terceiro e último estágio, a bactéria se disseminaria pela cavidade peritoneal e sangue, provocando sepse. (BERG,1995)

Vários são os percursos possíveis por meio dos quais os micro-organismos poderiam translocar do intestino para outros locais. A literatura referencia que a translocação, utilizando partículas inertes, sugerem que estas partículas poderiam translocar através do epitélio intestinal, possivelmente como passageiros passivos dentro de células fagociticas móveis (ALEXANDER et al., 1990; WIEST, RATH, 2003). Tem sido sugerido que o mecanismo pelo qual as bactérias atravessariam a barreira mucosa seria principalmente através do próprio enterócito. ALEXANDER et al. (1990) demonstraram que a taxa de translocação bacteriana é maior através dos enterócitos do que entre eles e que isto ocorreria por processo diferente da fagocitose ou exocitose clássicos, sendo observado em enterócitos morfologicamente intactos. Leva-se a acreditar que a capacidade de internalização através destes enterócitos estaria ligada ao grau de diferenciação destes e a sua produção de integrinas. Em seguida, foi observado que nem a maturidade do enterócitos e tampouco, sua produção de integrinas, aumentariam a capacidade de penetração de micro-organismos. Entretanto, mostrou-se que os micro-organismos internalizam-se mais facilmente quando são expostos às membranas laterais dos enterócitos (HESS et al., 2001).

Entre as células que compõe o tecido intestinal, é notório que o macrófago tecidual exerce função chave no processo de translocação. Já descrito que bactérias Gram-negativas como a *E. coli* marcadas com substâncias radioativas mostraram translocar através de trânsito direto pelos enterócitos, chegando a lâmina própria onde são fagocitadas por macrófagos que transportam a bactéria até os linfonodos mesentéricos, assim as bactérias sobreviventes são liberadas

(WIEST, RATH, 2003). RUNDLES e LIN (1998) mostraram que existe o transporte direto de *Salmonella* do trato digestório até a corrente sanguínea também se daria através de macrófagos, presentes na lâmina própria. Então, deslocaria até nódulos linfáticos, fígado, baço e medula óssea, alcançando assim a corrente sanguínea. Muitas vezes o macrófago se mostra incapaz de matar o micro-organismo, servindo então como seu meio de transporte.

Outra via de entrada microbiana sugerida seria através das bordas em escova incomum células de membrana, encontradas em porcentagens variáveis no intestino de diferentes espécies. Estudos mostram que elas transportam antígenos através da mucosa até o tecido linfóide, onde ocorrem as respostas imunitárias (BRANDTZAEG, 1998). Levando em conta esse mecanismo, foi publicado que em espécies de *Yersinia* as células de membrana de murinos são alvos preferenciais para invasão, podendo também ocorrer colonização e lesão das placas de Peyer. O mesmo tem sido relatado com a *Shigella flexneri*, que também invade células de membrana de coelho, com subsequente lesões às placas de Peyer (JANEWAY et al., 2002). Existem outras evidências em animais que bactérias patogênicas invadem células de membrana e danificam placas de Peyer, podendo ser esta uma das prováveis rotas que levariam à internalização de componentes da microbiota. Entretanto, segundo JEPSON, CLARK (1998), as células de membrana constituem pequena proporção da superfície da mucosa e, portanto, os autores acreditam na existência de outras rotas de igual importância.

Em síntese, vários estudos têm mostrado que a translocação bacteriana pode ocorrer pela via paracecular ou transcelular (MacFIE, 2000). No entanto, em condições que alterem a homeostase, como na esquistossomose em indivíduos desnutridos, pode ocorrer translocação bacteriana.

### **2.2.2 Translocação bacteriana na esquistossomose**

A esquistossomose, como agente facilitador de doenças bacterianas, encontra-se bem documentada na associação com bactérias Gram-negativas (TEIXERA, BINA & BARRETO, 1976). Em menor escala, evidenciou-se a

interação da esquistossomose com bactérias Gram-positivas (LABERTUCCI et al., 1990). Estudos experimentais mostraram maior ocorrência de abscesso hepático estafilocócico em camundongos portadores de esquistossomose quando comparados aos controles sem a doença (TEXEIRA et al., 1995). No caso das bactérias aeróbicas Gram-negativas, a translocação pode ocorrer com certa facilidade, até mesmo em indivíduos não injuriados, com enterócitos intactos. Bactérias anaeróbicas, translocam apenas em situações em que o intestino se encontra estruturalmente danificado. Estudos mostram que bactéria intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos sem outras condições associadas. Isto leva a crer que disfunção imune promove primariamente translocação bacteriana (TB) (WIEST & RATH, 2003).

O processo de translocação envolvendo a barreira da mucosa intestinal tem sido estudada como causa de sepse em pacientes susceptíveis, incluindo aqueles com cirrose e hipertensão porta (STRAUSS & CALY, 2003; MATTOS et al., 2003). Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura que investiguem bacteremia em esquistossomóticos. NISHIOKA et al. (1992) relatou um caso de associação de bacteremia por *Serratia marcescens* e esquistossomose mansônica, mas não cogita a possibilidade de translocação. Em 1993, FERRAZ et al., estudando modelo de peritonite experimental em camundongos com esquistossomose, reforçaram as pesquisas clínicas que diagnosticaram maior susceptibilidade às infecções. Em estudo de série de casos, FERRAZ et al. (2005) evidenciaram a prevalência de bactérias aeróbias em LM de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e conclui que a presença destas bactérias, como consequência da TB, pode desempenhar um papel no desenvolvimento de complicações infecciosas pós-operatória no grupo de pacientes estudados.

São escasso dados na literatura que demonstre associação da esquistossomose ao processo de translocação bacteriana. Nos últimos anos estudos experimentais foram publicados por nosso grupo de pesquisa, demonstrando existir co-relação direta de translocação na esquistossomose. Segundo Lima (2012), em modelo experimental de esquistossomose crônica

murina demonstrou que houve translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos, baço, fígado e sangue periférico e foi mais prevalente em camundongos fêmeas.

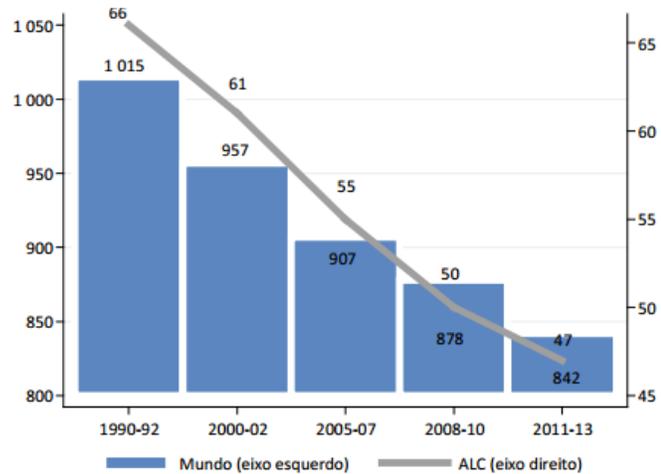
De acordo com Weber Sobrinho (2012), também evidenciou uma incidência aumentada de TB em animais infectados por *S. mansoni* pós-esplenectomia terapêutica, verificando ainda uma elevação nos níveis de IL-10 nos grupos infectados.

Mais recentemente, Oliveira (2013), ao estudar os aspectos imunológicos da associação da esquistossomose crônica e desnutrição neonatal evidenciou tendência de translocação bacteriana em ambos os grupos.

### **2.3 Esquistossomose e desnutrição**

A esquistossomose e desnutrição são problemas de saúde pública que acometem grande parcela da população mundial, e é mais frequente em países em desenvolvimento (ATINMO et al., 2009; WHO, 2009). Segundo as estimativas da FAO (2013), cerca de 840 milhões de pessoas passam fome no mundo, ou seja, recebem uma alimentação insuficiente para suprir as necessidades energéticas mínimas. Embora, esses dados ainda sejam alarmantes, este número representa uma redução de 36 milhões em relação a medida do triênio 2008-2010, conforme observado na figura 3.

Figura 3 - Evolução da fome no mundo e na América Latina e Caribe de 1990/92-2011-13.



Fonte: FAO (2013).

As deficiências nutricionais podem gerar consequências severas para o organismo, principalmente quando ocorrida nos primeiros anos de vida (BROWN, POLLITT, 1996). Muitos fatores podem causar desnutrição, sendo que a maioria deles está associado com a má alimentação ou infecções graves repetidas, especialmente em populações carentes (Rice et al., 2000).

Em humanos, eventos importantes para imunocompetência são iniciados ainda no embrião e continuam na primeira semana de vida. Em roedores, a competência imunológica também é adquirida gradualmente após o nascimento (SILVA et al., 2008). Estes constituem períodos críticos de desenvolvimento do sistema imunológico, nos quais ocorrem a evolução e maturação dos componentes celulares e moleculares essenciais para a defesa do organismo (CHANDRA, 1997). Durante estes estágios críticos, o sistema imune fica mais propenso a injúrias ambientais em razão dos processos implicados no seu desenvolvimento que ocorrem com muita rapidez (MORGANE, 1993). Assim, no homem e no camundongo, o início da vida pode ser considerado crítico para o desenvolvimento do sistema imunológico, onde as agressões nutricionais poderão ocasionar comprometimento da resposta imune, com seqüelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto (WADE et al., 1983; CUNNIGHAN-RUNDLES et al., 2005).

Acometimentos ambientais precoces incidindo nos períodos críticos de desenvolvimento podem acarretar efeitos permanentes sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos com repercussão na vida adulta (PEREIRA et al., 2009). Pesquisas indicam que a dieta materna durante a gestação, bem como a nutrição peri-natal inadequada, podem afetar a organogênese e, conseqüentemente, a função orgânica na maturidade (CAMELO et al., 2005). Em modelos experimentais, algumas alterações produzidas pela desnutrição são mais evidentes, tais como a redução do peso corporal e determinadas alterações no desenvolvimento (SILVA et al., 2008). Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, os danos terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo durante toda a vida (GUEDES, MELO, TEODÓSIO, 2004).

Estudos experimentais e epidemiológicos têm mostrado que estas agravos ambientais durante os períodos fetal, neonatal ou infância levariam o adulto a apresentar problemas como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, problemas renais, podendo repercutir nas defesas orgânicas (CAMELO et al., 2005). Deficiência de nutrientes essenciais predis põe o indivíduo a uma cascata de reações adversas, eventos metabólicos que comprometem a capacidade do corpo de se adaptar, recuperar e sobreviver (SILVA et al., 2008). O mecanismo associado com estes eventos é chamado de programação (PEREIRA et al., 2009).

Diante de toda literatura, os achados sobre privação nutricional durante o período neonatal pode implicar em mudanças no padrão fisiológico do indivíduo na vida adulta, e principalmente quando existe associação a doenças parasitárias, como na esquistossomose mansônica.

A literatura é concordante que a esquistossomose é responsável não apenas pela morbidade provocada pela parasitose, podendo levar a óbito em decorrência da patologia de base da parasitose e suas complicações. Ainda que esta parasitose pode ter reflexos sobre o estado nutricional do hospedeiro vertebrado, e conseqüentemente alterar o curso natural da doença.

Especula-se que o estado nutricional se inclui entre os fatores capazes de determinar as conseqüências da infecção e a variabilidade na resposta imune do hospedeiro. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que as deficiências

nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecção, sendo a desnutrição reconhecida como um determinante fundamental da resposta imune e como causa frequente de imunodeficiência no mundo (CHANDRA, 1997). A desnutrição e as infecções entéricas frequentes reduzem a disponibilidade de nutrientes, devido ao aumento das necessidades metabólicas, alteração na absorção e transporte de nutrientes e aumento das perdas destes, por processos como, por exemplo, a diarreia (EMERY, 2005; HODGES & GILL, 2010). Além disso, foi proposto que deficiências nutricionais podem comprometer a integridade da mucosa intestinal, resultando em aumento da permeabilidade e diminuição da secreção de enzimas, podendo assim contribuir para a translocação bacteriana, e susceptibilidade a infecções (FERRARIS & CAREY, 2000).

Ainda que diversos trabalhos mostrem os efeitos em longo prazo da desnutrição, poucos enfocam o período crítico da lactação. Quando imposta nesse período, a desnutrição pode ser um agente estressor indutor de alterações tardias na resposta imunológica (QUEIRÓS-SANTOS, 2000), implicada em diversas alterações fisiológicas e metabólicas (SANTHIAGO *et al.*, 2006), relacionadas à depressão do SI.

Na deficiência energético-protéica, são comuns os danos causados à imunidade inata, como por exemplo, a perda da integridade das barreiras físicas do epitélio e das mucosas. Isto permite o livre acesso de micro-organismos aos órgãos internos e à circulação, podendo, assim, aumentar a suscetibilidade aos agentes infecciosos e a gravidade das infecções (CHANDRA *et al.* 1997; MORGAN, 1997). O complexo desnutrição-infecção pode ser visto sob diferentes aspectos: a desnutrição pode induzir alterações nos mecanismos de defesa do indivíduo; a infecção pode agravar o estado nutricional deficiente, previamente instalado; ou ainda, pode haver desenvolvimento de desnutrição em decorrência da própria doença (BORELLI *et al.*, 1998; BRUNDTLAND, 2000). Desta forma, além da desnutrição facilitar a invasão do agente, favorecendo a sua proliferação no organismo e/ou produção de toxinas, pode também aumentar as chances de uma infecção secundária ao modificar a evolução e prognóstico de uma

determinada doença (BRUNDTLAND, 2000; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005).

Vale ressaltar as repercussões do parasitismo do helminto sobre o estado nutricional do hospedeiro vertebrado ocorrem por quatro mecanismos: a) redução da ingestão devido a anorexia ou falta de apetite; b) redução na absorção de nutrientes pelo TGI; c) redução na utilização de nutrientes (por distúrbios do metabolismo e do transporte de nutrientes, sobretudo decorrentes de lesão hepática nas formas graves) e d) excreção anormal de nutrientes e eletrólitos. Todos esses mecanismos predis põe o hospedeiro a processos infecciosos secundários a esquistossomose, devido à imunodepressão ocasionada pela associação da desnutrição e a parasitose.

Levando em consideração que a deficiência protéica é considerada um potente imunodepressor (MEIRA, 1995), Oliveira *et al.* (2004) avaliaram a resposta imune humoral e celular em camundongos esquistossomóticos desnutridos não isogênicos, na fase crônica da infecção. Os animais com deficiência protéica apresentaram baixos títulos séricos de IgG1, IgG2b e IgG3 em relação a camundongos eutróficos infectados. Contudo, não houve diferença quanto à produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5 nos dois grupos de animais estudados.

Estudos experimentais em camundongos infectados por *S. mansoni* têm permitido avançar no conhecimento sobre a esquistossomose e desnutrição. A capacidade de adaptar os processos metabólicos as mudanças ambientais influencia o comportamento do helminto dentro do hospedeiro em ações ainda mais agressivas e tornando o hospedeiro vulnerável a processos infecciosos secundários a infecção parasitária.

A justaposição da esquistossomose com a desnutrição em regiões endêmicas pode levar a uma sucessão de danos sociais e econômicos, com um aumento significativo dos custos para o tratamento e manutenção de indivíduos acometidos pela sobreposição da esquistossomose e desnutrição. Além disso, é importante reinterar que a mortalidade encontrada em crianças desnutridas, agravada por doenças infectoparasitárias é evitável e tratável por intervenções acessíveis como o reforço dos sistemas de educação e saúde.

Apesar de estar bem estabelecido, que a desnutrição agrava o curso da esquistossomose tanto em modelos experimentais e estudos clínicos e que conseqüentemente pode aumentar a susceptibilidade a infecções secundárias. Nesse sentido, ainda são necessários estudos que possam compreender lacunas existentes entre a desnutrição no início da vida e como infecção parasitária na vida adulta podem levar o aparecimento de complicações de cunho infeccioso. Assim de forma a contribuir, mobilizar e incentivar com resultados proveitosos que poderão dar base para definir estratégias adequadas no sentido de reduzir os índices de morbidade e mortalidade de ambas as doenças.

### 3. HIPÓTESES

---

- Camundongos esquistossomóticos são mais susceptíveis a translocação microbiana que camundongos não infectados;
- Camundongos desnutridos e esquistossomóticos são mais susceptíveis a translocação microbiana que camundongos esquistossomóticos e eutróficos;
- Na esquistossomose mansônica, a microbiota do trato gastrointestinal tem padrões diferentes que os observados na microbiota normal de camundongos sem a doença;
- As bactérias que causam infecções em esquistossomóticos são as mesmas que compõem a microbiota normal;
- Camundongos esquistossomóticos desnutridos fêmeas são mais suscetíveis as alterações da microbiota gastrointestinal, devido ao gênero experimental.
- Ocorre lesão da mucosa intestinal em camundongos esquistossomóticos.
- Ocorre lesão da mucosa intestinal de forma mais severa em camundongos esquistossomóticos e desnutridos.

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivos gerais

Investigar em camundongos adultos com esquistossomose mansônica em fase crônica, submetidos à desnutrição no período do aleitamento, a ocorrência de translocação bacteriana.

Observar se em camundongos adultos, submetidos à desnutrição no período do aleitamento, há diferença na ocorrência de translocação bacteriana em relação ao sexo.

### 4.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a ocorrência de translocação bacteriana via TGI em camundongos infectados ou não pelo *S. mansoni*, submetidos ou não à desnutrição.
- ✓ Comparar camundongos esquistossomóticos na fase crônica e camundongos sem infecção, quanto às alterações da microbiota gastrointestinal; peso; alterações morfométricas da parede intestinal; positividade de cultura de sangue porta e periférico, além de culturas de amostras dos linfonodos mesentéricos, fígado e baço.
- ✓ Comparar camundongos desnutridos e seus pares controles, quanto às alterações da microbiota gastrointestinal; peso; alterações morfométricas da parede intestinal; positividade de cultura de sangue porta e periférico, além de culturas de amostras dos linfonodos mesentéricos e fígado.
- ✓ Comparar camundongos esquistossomóticos desnutridos com seus pares controles, quanto às alterações da microbiota gastrointestinal; peso; alterações morfométricas da parede intestinal; positividade de cultura de sangue porta e periférico, além de culturas de amostras dos linfonodos mesentéricos e fígado.
- ✓ Comparar camundongos esquistossomóticos desnutridos com seus pares controles, quanto às alterações da microbiota, e observar a diferença entre os sexos.

## 5. METODOLOGIA

---

### 5.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo experimental, com características de um estudo de intervenção. Além disso, trata-se de um estudo com características de intervenções experimentais que são avaliadas separadamente e em combinação e contra o controle. No presente estudo, o desfecho é a translocação bacteriana.

Os animais para o estudo não foram randomizados, pois foram criados nas mesmas condições ambientais. Desta forma, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção avaliada.

Na investigação estritamente experimental, pode-se operar com uma definição bastante limitada das causas como nexos obrigatórios e unívocos entre fatores (Esquistossomose mansônica na fase crônica e as alterações causadas no hospedeiro pela desnutrição neonatal) e efeitos (translocação bacteriana). A experimentação em condições laboratoriais, com alto grau de controle, pode estabelecer, com certa margem de segurança, o caráter etiológico da esquistossomose mansônica para a produção da translocação bacteriana (ROUQUAYROL & ALMEIDA FILHO, 2003).

O modelo de estudo experimental é o único que pode fornecer um controle eficaz das confusões provocadas pelas variáveis de confundimento. Isso porque, além das condições controladas de observação, teremos a facilidade de execução uma vez que o mesmo será desenvolvido em animais experimentais, que apresentam respostas parecidas aos humanos em relação à esquistossomose, já que a linhagem de camundongos Swiss freqüentemente utilizada apresenta variabilidade genética (não isogênicos) o que facilita comparar os resultados.

### 5.2 Animais e dietas

Foram utilizados como modelo experimental, camundongos machos e fêmeas da linhagem *Swiss webster*, que foram fornecidos pelo Biotério do Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA).

Os animais foram obtidos acasalando-se machos e fêmeas, com idade entre 90 e 120 dias, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16 dias (HARKNESS, 1993). O diagnóstico da prenhez foi realizado pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes por mãe. Este número parece conferir maior potencial lactotrófico (FISHBECK, RASMUSSEN, 1987). Neste mesmo dia, adotado como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas em dois grupos:

- 1) **Nutrido** - constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 17% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (Tabela 1);
- 2) **Desnutrido** - constituído por filhotes amamentados por mães submetidas à dieta contendo 8% de proteína à base de caseína utilizada como fonte protéica (Tabela 1).

**Tabela 1** - Composição (g/100g da mistura) das rações utilizadas na alimentação materna

<i>Ingrediente</i>	<i>Caseína a 17%</i>	<i>Caseína a 8%</i>
Amido de Milho	41,01	48,51
Caseína	18,89	8,89
Amido dextrinizado	13,05	16,65
Sacarose	10	12,1
Óleo de Soja	7	4
Celulose	5	5
Mix Mineral (AIN 93 G)	3,5	3,5
Mix Vitamínico (AIN 93)	1	1
L-Cistina	0,3	0,1
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,0008

Fonte: REEVES et al.,1993.

Os animais dos dois grupos foram amamentados durante os primeiros 21 dias após o nascimento - período de aleitamento (HARKNESS, 1993). Neste período foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Gehaka®) os pesos corporais (PC) de cada animal, a fim de acompanhar o peso corporal durante a manipulação nutricional. A partir do 22º dia de vida (desmame), os filhotes foram separados de suas mães, passando a consumir Labina®, dieta padrão do biotério (Tabela 2), o registro do peso corporal foi realizado semanalmente até o final dos experimentos a fim de acompanhar a evolução ponderal.

**Tabela 2** - Composição da dieta padrão Labina® (Purina do Brasil) utilizada na alimentação dos animais.

Enriquecimento		Enriquecimento		Níveis de garantia (%)	
<b>Vitamina A</b>	20000U I	<b>Piridoxina</b>	6mg	<b>Umidade (máx)</b>	13
<b>Vitamina D3</b>	6000UI	<b>Biotina</b>	0,1mg	<b>Proteína (min)</b>	23
<b>Vitamina E</b>	30UI	<b>Colina</b>	2000mg	<b>Extrato Etéreo</b>	2,5
<b>Vitamina K</b>	6mg	<b>Manganês</b>	50mg	<b>Matéria Fibrosa (máx)</b>	9,0
<b>Vitamina B12</b>	10mg	<b>Iodo</b>	2mg	<b>Matéria Mineral (máx)</b>	8,0
<b>Vitamina B2</b>	8mg	<b>Ferro</b>	65mg	<b>Cálcio (máx)</b>	1.8
<b>Pantetonato de Cálcio</b>	24 mg	<b>Zinco</b>	35mg	<b>Fósforo (min)</b>	0,0

<b>Niacina</b>	95mg	<b>Cobre</b>	26mg
<b>Tiamina</b>	4mg	<b>Antioxidante</b>	100mg
<b>Ácido Fólico</b>	0,5mg		

Fonte: AgribRANDS do Brasil Ltda.

Os animais foram mantidos em uma mesma sala e em condições ambientais similares, alojados em gaiolas especiais (machos separados das fêmeas) camas de maravalha (anteriormente autoclavada), com livre acesso para ração para camundongos e água estéril *ad libitum* (Figura 4).

**Figura 4 - A.** Camundongos *Swiss webster*. **B.** Gaiolas de camundongos, com cama de maravalha, ração Labina® e bebedouro, alojadas no Biotério do LIKA/UFPE.



Fonte: Próprio autor.

### 5.3 Formação dos grupos de estudo

Foram utilizados 100 camundongos, parte destes foram submetidos à desnutrição, 50 machos e 50 fêmeas, com 35 dias de nascidos. Destes, 50 camundongos (25 machos e 25 fêmeas) foram infectados com *S. mansoni* e 50

camundongos (25 machos e 25 fêmeas) constituíram o grupo dos não-infectados com *S. mansoni*.

Cento e sessenta dias após a exposição cercariana, os camundongos foram sacrificados, de acordo com 8 grupos propostos para o estudo, conforme a figura 5:

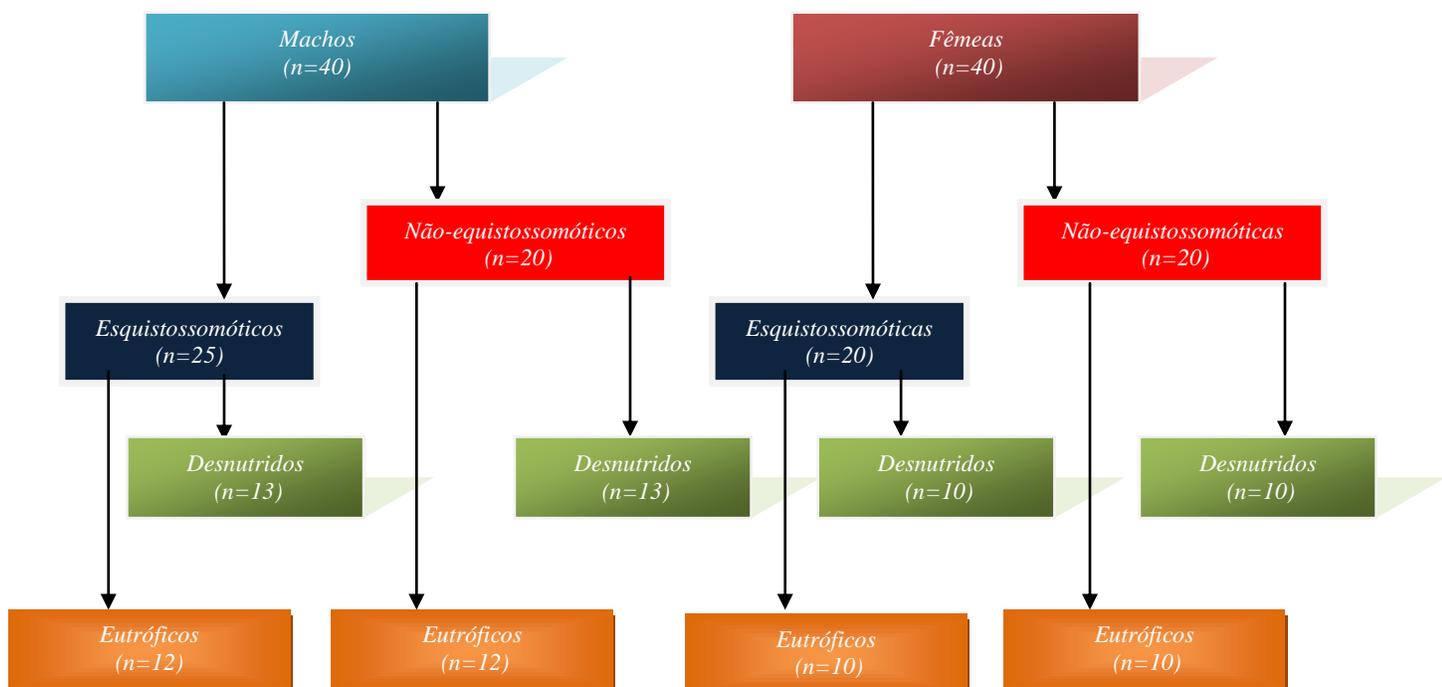
#### - MACHOS

- **MNN** – Machos não-infectados eutróficos
- **MNE** – Machos não-infectados desnutridos
- **MIN** – Machos infectados eutróficos
- **MIE** – Machos infectados desnutridos

#### - FÊMEAS

- **FNN** – Fêmeas não-infectadas eutróficas
- **FNE** – Fêmeas não-infectadas desnutridas
- **FIN** – Fêmeas infectadas eutróficas
- **FIE** – Fêmeas infectadas desnutridas

**Figura 5** - Distribuição de grupos de camundongos que foram submetidos a estudos.



Fonte: Próprio autor.

## 5.4 Categorização das variáveis

### 5.4.1 Variáveis independentes

<i>Nome</i>	<i>Definição conceitual</i>	<i>Definição operacional</i>	<i>Categorização</i>
<b>Desnutrição</b>	Consequência, para o organismo, do déficit de nutrientes	Amamentação dos animais em mães alimentadas com dieta hipoprotéica (caseína 8%)	Nutridos Desnutridos
<b>Infecção pelo <i>S. mansoni</i>.</b>	Infecção ativa dos camundongos, por via percutânea, com cercárias do helminto	Presença de ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados nas fezes através de exame parasitológico	Infectados Não-infectados

### 5.4.2 Variável dependente

<i>Nome</i>	<i>Definição conceitual</i>	<i>Definição operacional</i>	<i>Categorização</i>
<b>Translocação bacteriana</b>	Passagem de micro-organismos via trato gastrointestinal para órgãos e/ou sistema circulatório.	Presença de bactérias em cultura de sangue e/ou homogeneizados de órgãos.	Com translocação bacteriana Sem translocação bacteriana

## 5.5 Padronização das técnicas

### 5.5.1 Avaliação do peso corporal

O estado nutricional dos animais de todos os grupos foi avaliado através da análise das curvas ponderais, obtidas após registros dos pesos corporais em balança eletrônica digital Gehaka®. Os pesos foram registrados diariamente do 1º até o 21º dia de vida e semanalmente após esse período (do 22º ao 161º).

### 5.5.2 Obtenção das cercárias e infecção dos camundongos

Para infecção dos camundongos, foram utilizadas cercárias, da cepa Belo Horizonte (BH), obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário controlado do Setor de Parasitologia, Departamento de Medicina Tropical, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

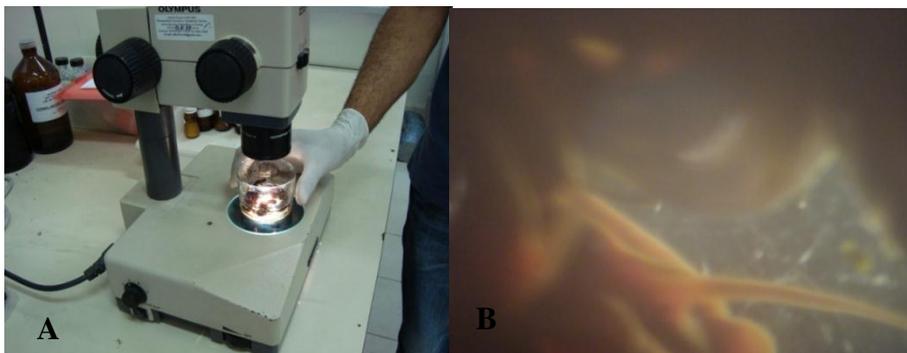
Para infecção dos caramujos, utilizou-se o protocolo de Standen (1952), os moluscos foram anteriormente postos em contato com miracídios permanecendo exposto à luz e ao calor por aproximadamente duas horas. Após infecção, os caramujos foram postos em aquários com água desclorada e livres de exposição luminosa. De acordo com Olivier e Stirewalt (1952), após 30 dias de infecção os moluscos da espécie *B. glabrata* em meio aquático e sob exposição à luz artificial, têm a capacidade de eliminar cercárias através de seus tecidos moles (Figura 6).

Foi obtida uma suspensão cercariana, e cada camundongo (35 dias de vida), agora anestesiado com 0,6 ml de Xilazina (80%) e Ketamina (20%), foi infectado por via subcutânea, através da adição de uma gota contendo uma fração desta suspensão, contendo, em média, 30 cercárias, na sua porção abdominal (Figura 7 e 8). Os camundongos infectados foram colocados em gaiolas separadas daqueles não infectados por *S. mansoni*.

**Figura 6** - Moluscos da espécie *B. glabrata* infectados, em meio aquático e sob exposição à luz artificial.



**Figura 7** – **A.** Obtenção da suspensão cercariana. **B.** Cercária liberada pelo molusco e observada com auxílio da microscopia óptica (20X)



Fonte: Lima (2011).

**Figura 8** - Camundongos anestesiados e expostos à suspensão cercariana, por via percutânea, e luz artificial.

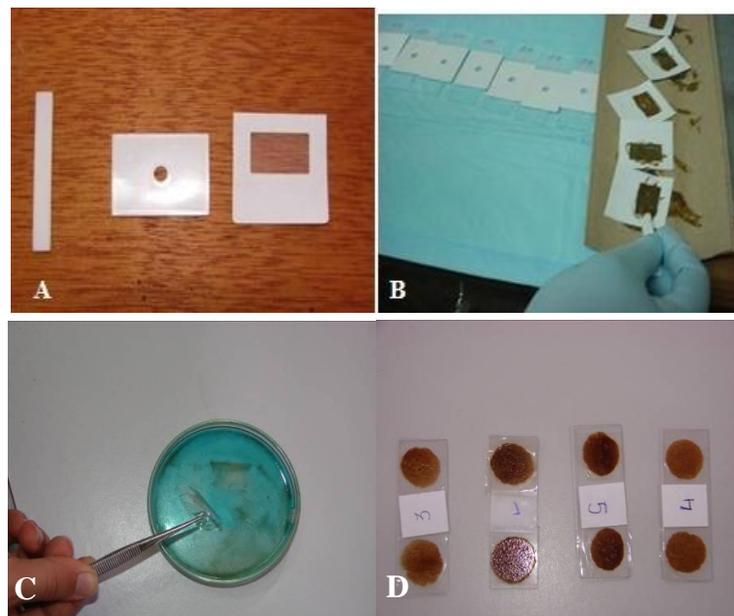


Fonte: Lima (2011).

### 5.5.3 Contagem de ovos

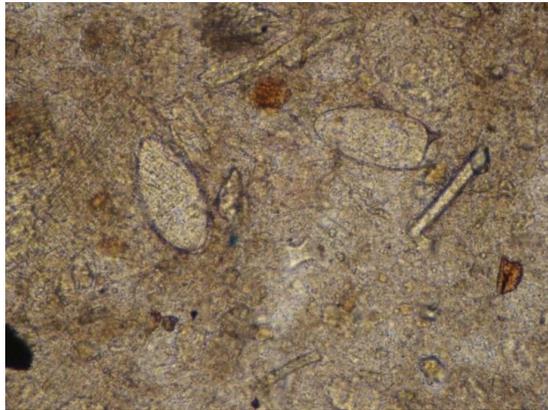
Após 45-50 dias de infecção, os camundongos infectados foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram confeccionadas duas lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de Kato-Katz (KATZ, CHAVES & PELLEGRINO, 1972) para quantificação do número de ovos por grama de fezes e determinação da infecção (Figuras 9 e 10).

**Figura 9** - Método de Kato-Katz. **A.** Helm-test®, **B.** Recolhimento das fezes que passam pela malha, **C.** Papel de celofane emergido em solução verde malaquita a 3%, **D.** Lâminas preparadas



Fonte: Lima (2011).

**Figura 10** – Observação de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método Kato-Katz.



Fonte: Lima (2011).

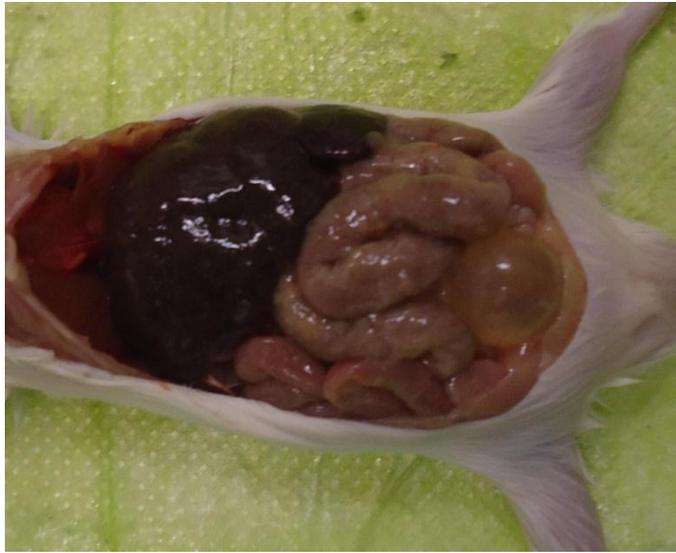
#### 5.5.4 Coleta de amostras

A etapa crônica da infecção esquistossomótica murina é considerada completamente estabelecida a partir da 12<sup>a</sup> semana após a exposição cercariana (FALLON, 2000; PEARCE & MCDONALD, 2002). Por essa razão, os camundongos foram eutanasiados para estudo aos 4 meses da exposição.

Aos 4 meses da infecção, todos os camundongos foram anestesiados com Xilazina (80%) e Ketamina (20%), para coleta do sangue periférico, por punção caudal, e do sangue cardíaco. Antes da coleta, foi realizada rigorosa assepsia da cauda e de todo o corpo do animal com iodopovidona, sendo retirado o excesso com álcool a 70%, para evitar contaminação das amostras com a microbiota destas regiões.

Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizada incisão mediana xifo pubiana com auxílio de tesoura cirúrgica. Em seguida, coletou-se o baço, fragmentos do fígado, sangue porta, linfonodos mesentéricos na região média do intestino delgado e as fezes nesta região para cultura microbiológica. (Figura 11).

Figura 11 - Incisão mediana xifo pubiana para coleta de amostras biológicas.



Fonte: Magalhães (2012).

### **5.5.5 PERFUSÃO DO SISTEMA PORTA-HEPÁTICO**

Após a retirada do sangue porta, fragmentos do baço, fígado e linfonodos mesentéricos, fezes e fragmentos do intestino delgado, os camundongos eutanasiados foram submetidos à perfusão porta-hepática (YOLLES et al., 1947). Esta técnica foi utilizada para avaliação do parasitismo através do número de vermes adultos. A coleta dos vermes foi feita durante a coleta das amostras e perfusão por observação direta dos vasos mesentéricos e por esmagamento do fígado (HILL, 1956). Os vermes foram contados e classificados segundo o sexo.

### **5.5.6 Estudo da translocação bacteriana**

Todo material coletado foi submetido ao cultivo para verificação de crescimento de micro-organismos. Para análise quantitativa, as amostras de sangue e macerado dos órgãos e linfonodos mesentéricos foram semeadas diretamente nos meios de cultivo com alça calibrada. Posteriormente, as amostras de sangue porta (0,1 mL), periférico (0,1 ml) e macerado foram inoculadas em tubos contendo BHI (Brain Heart Infusion) (1:5) e incubados em estufa

bacteriológica a 37°C. As amostras presentes neste meio foram semeadas em placas de Petri contendo meios de cultivo com 24, 48 e 72 horas para observação do crescimento microbiano. A contagem das bactérias foi realizada após 18-24 horas de incubação.

As fezes foram misturadas na mesma quantidade de Solução salina 0,9% estéril, homogeneizadas e cultivadas com alça calibrada de 100 µl nas placas de Petri contendo meios de cultivo Ágar sangue e Ágar EMB Levine (Himedia®).

Para os diferentes grupos de micro-organismos foram utilizados os meios citados abaixo:

✓ Bactérias aeróbias

Todo material coletado foi submetido a meios de cultura para o crescimento de bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas (Ágar Sangue e Ágar EMB Levine (Himedia®)). Após crescimento nas placas de cultura, as espécies bacterianas foram confirmadas por testes bioquímicos convencionais para enterobactérias, como as provas bioquímicas para identificação pela técnica de Rugai e Araújo modificada (PESSOA & SILVA, 1974), citrato, indol, lisina e *kits* de identificação (NEWPROV®).

Para gram-positivas foram utilizados o teste de catalase, CAMP, *Staphy-test* (teste rápido para caracterização de *Staphylococcus aureus*) (PROBAC DO BRASIL®), DNASE, manitol, bilesulina e discos de identificação para confirmação da identificação, como novobiocina, optoquina e bacitracina.

✓ Bactérias não-fermentadoras

Após crescimento em Agar Sangue e realização de oxidase, quando positiva, as bactérias não-fermentadoras foram identificadas por *Kits* para identificação de não-fermentadoras (NEWPROV®).

### 5.5.7 Avaliação da Microbiota Intestinal

Para avaliação da microbiota intestinal, as fezes dos camundongos foram coletadas em tubos de ensaio estéreis diretamente da região média do intestino delgado. As amostras coletadas foram, imediatamente, transportadas

para o Setor de Microbiologia do LIKA/UFPE, onde foram submetidas às análises microbiológicas.

Para a análise microbiológica qualitativa foi utilizado o mesmo método utilizado por BISSO (2008). Nos tubos contendo as amostras fecais será acrescentada solução salina estéril (NaCl 0,9%). Após a homogeneização mecânica, foram realizadas 5 diluições seriadas múltiplos de dez. Foi semeado 0,1mL de cada diluição, nos meios Ágar Sangue e Ágar EMB Levine (Himedia®) e incubados a 37°C, durante 48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de fezes (UFC/g). Os *Enterococcus*, *Staphylococcus* e coliformes que cresceram foram identificados também por suas características coloniais e testes bioquímicos.

#### **5.5.8 Análise morfométrica da mucosa intestinal**

Biópsia do intestino delgado foram colhidas e lâminas contendo cortes sagitais foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e Tricomo de Masson para avaliação morfológica. As variáveis consideradas neste estudo histológico foram as medidas da profundidade de cripta, espessura de parede, espessura do vilo e número de vilos (TRAMONTE et al., 2004). O estudo histomorfométrico foi realizado por um observador que desconhecia qualquer dado sobre o grupo dos animais. Foi utilizada escala graduada, dividida em 100 unidades, adaptada à ocular do microscópio óptico com aumento de 100 vezes para as mensurações.

Foi considerado como: a) profundidade de cripta - a distância da fosseta do vilo da mucosa até a lamina basal; b) espessura de parede – como sendo a distância da serosa à luz do intestino; c) espessura de vilo – a espessura no terço médio do vilo; d) número de vilos – será obtido pela contagem do número de vilos no tamanho da escala graduada.

Todas as medidas foram obtidas pela média aritmética de cinco medidas no segmento intestinal examinado, escolhendo-se sempre as glândulas melhor orientadas em cada corte.

### **5.5.9 Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife-PE (processo nº 23076.0262257/2011-74)

Todos os procedimentos descritos para utilização dos animais foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelas normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

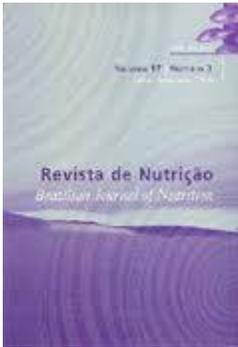
### **5.6 Análise estatística**

Para análise comparativa das variáveis quantitativas foram aplicados os testes t de Student, Mann-Whitney ou Análise de variância ANOVA. Os resultados da evolução ponderal foram expressos por Média  $\pm$  Desvio Padrão. O dados da contagens de leucócitos foi representado por Média  $\pm$  Erro Padrão. Para a análise das variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-quadrado. A significância estatística foi considerada ao nível de  $p < 0,05$ . O software utilizado para as análises foi o SigmaStat® 3.5.

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1 Artigo Original



**DESNUTRIÇÃO NEONATAL EM CAMUNDONGOS:**

**TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA**

**Malnutrition neonatal in mice: Bacterial Translocation**

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar em camundongos em ambos os sexos, desnutridos no período neonatal, as bactérias da microbiota intestinal e a ocorrência de translocação bacteriana. **Métodos:** 40 camundongos *Swiss webster* (*Mus musculus*) (20 fêmeas/20 machos) foram divididos em dois grupos: Nutridos (10 machos/10 fêmeas) e desnutridos (10 machos/10 fêmeas). Os animais foram pesados diariamente até o final do aleitamento, 21 dias e semanalmente, até o fim dos experimentos, quando os animais foram eutanasiados para estudo da translocação bacteriana e a análise da microbiota. Para a microbiota, as fezes foram coletadas diretamente da região média do intestino delgado. Para a translocação bacteriana foi coletado sangue periférico, sangue porta, fígado, baço e linfonodos mesentéricos para o estudo microbiológico. **Resultados:** A desnutrição acarretou diminuição do crescimento ponderal e alterou a microbiota intestinal, quanto a diversidade bacteriana. Apenas os animais desnutridos, de ambos os sexos, apresentaram translocação bacteriana primária e secundária. **Conclusões:** O modelo de desnutrição neonatal produziu seqüela no peso corporal e alterou a microbiota intestinal, em ambos os sexos. A translocação bacteriana foi um evento presente nos animais desnutridos independente do sexo.

**PALAVRAS-CHAVES:** Desnutrição, translocação bacteriana, sexo, microbiota intestinal.

## Abstract

**Objective:** To identify the intestinal bacterial profile in early life undernourished mice, male and female, as well as the occurrence of intestinal bacterial translocation. **Methods:** 40 Swiss webster (*Mus musculus*) mice (20 female, 20 male) were divided in two groups: Control (10 female, 10 male) and Undernourished (10 female, 10 male). They were weighed daily until the weaning on the 21st day of life and then, weekly. Feces were collected from medium length of small intestine and used for bacterial profile identification. Peripheral and portal blood, liver, spleen and mesenteric lymph nodes were collected to assess the bacterial translocation through microbiologic culture. **Results:** Undernourished mice presented diminished body weight and differences in the intestinal bacterial profile. Additionally, only undernourished mice presented primary and secondary intestinal bacterial translocation, with no sex-related differences. **Conclusions:** Early life undernutrition altered the intestinal bacterial profile in adult mice, leading to intestinal bacterial translocation. Those events were not sex-related.

**INDEXING TERMS:** Malnutrition, Bacterial translocation, Sex, Intestinal microbiota.

## INTRODUÇÃO

A translocação microbiana, mecanismo fisiológico da passagem de bactérias do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos, tem sido estudada como causa patológica quando estas bactérias migram, aderem e se multiplicam em outros tecidos, como fígado e baço<sup>1</sup>. Estudos mostram que a microbiota intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos, sem outras condições associadas<sup>1,2</sup>. Os fatores que controlam a translocação de micro-organismos estão relacionados ao agente e ao hospedeiro. Isto pode ocorrer devido a três situações: disfunção da barreira intestinal, alteração da microbiota intestinal e deficiência imunológica do hospedeiro<sup>1,2</sup>. Além disso, a desnutrição pode levar à atrofia de órgãos linfóides causando uma maior susceptibilidade aos patógenos ambientais e conseqüentemente, aumento da migração de micro-organismos do lúmen para os linfonodos mesentéricos e outros órgãos<sup>3</sup>.

Pacientes hospitalizados em uso de sonda-nasogástrica e histórico de desnutrição são mais favoráveis a sepse<sup>4</sup>. Associada a enfermidades, a desnutrição quando imposta no início da vida pode acarretar diversas modificações com sequelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto. Apesar dos avanços científicos e da transição epidemiológica e nutricional, os desafios permanecem em compreender como indivíduos que sofreram privação alimentar durante a fase neonatal podem sofrer complicações infecciosas durante a vida adulta, principalmente, quando submetidos a cirurgias e hospitalizações por períodos longos. É enfático, que entre as estratégias para reduzir a translocação microbiana está o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos e o suporte nutricional<sup>5</sup>. Dependendo da intensidade e da duração das alterações nutricionais, as conseqüências terão impacto maior ou menor sobre todo o organismo no futuro.

Além da desnutrição, o sexo foi estudado recentemente como fator preditivo para translocação bacteriana em camundongos submetidos à disfunção imune, como infecção esquistossomótica e esplenectomia<sup>6</sup>. O sistema endócrino pode influenciar a resposta a micro-organismos por modular a resposta imune, como também, a interrelação entre micro-organismos e hormônios na manutenção da homeostase<sup>7</sup>. Em virtude destes fatos, a habilidade dos hormônios em afetar o sistema imunológico dirigido contra agentes infecciosos tem recebido maior atenção. Machos e fêmeas podem apresentar respostas diferentes aos processos de translocação microbiana e evolução a sepse<sup>8</sup>.

Existem evidências que sugerem que a desnutrição poderia predispor a várias infecções sistêmicas, e a gênese do processo infeccioso seria a translocação bacteriana. Contudo, ainda são poucos estudos que forneçam elementos para ocorrência de translocação bacteriana em organismos que sofreram desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento, bem como se o sexo seria um fator preditivo para diferença na ocorrência de translocação. Desta forma, objetivamos avaliar a presença de bactérias da microbiota intestinal de camundongos desnutridos, ainda no período neonatal, e de ambos os sexos.

## MÉTODOS

### Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 40 camundongos, machos e fêmeas, da linhagem *Swiss webster*, provenientes da colônia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/ UFPE). Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas). O estudo foi aprovado através do processo nº 23076.0262257/2011-74 pela Comissão de Ética no uso de animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA).

Até 24 horas após o nascimento, os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com a alimentação materna: Nutrido (N) (n=20, sendo 10 machos e 10 fêmeas) (caseína 17%) e Desnutrido (D) (n= 20, sendo 10 machos e 10 fêmeas) (caseína 8%) (Tabela 1). As mães receberam água e ração *ad libitum*. Após o desmame (22º dia de vida), os animais de ambos os grupos foram alimentados com dieta labina (purina®) para reposição nutricional, até o final dos experimentos.

O peso corporal dos animais foi mensurado diariamente (em balança eletrônica digital – Gehaka®; 0,001g) no período de aleitamento (21 dias) e semanalmente a partir do 22º dia de vida, a fim de acompanhar a evolução ponderal.

Tabela 1 Composição (g/100g da mistura) das rações utilizadas na alimentação materna

<i>Ingrediente</i>	<i>Caseína a 17%</i>	<i>Caseína a 8%</i>
Amido de Milho	41,01	48,51
Caseína	18,89	8,89
Amido dextrinizado	13,05	16,65
Sacarose	10	12,1
Óleo de Soja	7	4
Celulose	5	5
Mix Mineral (AIN 93 G)	3,5	3,5
Mix Vitamínico (AIN 93)	1	1
L-Cistina	0,3	0,1
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,0008

Fonte: REEVES et al.<sup>9</sup>

### **Avaliação da translocação bacteriana**

Os animais foram anestesiados para coleta de sangue periférico, por punção caudal. Antes da coleta, foi realizada rigorosa assepsia da cauda e de todo o corpo do animal com iodopovidona para evitar contaminação das amostras.

Imediatamente, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e realizou-se, após tricotomia e assepsia, incisão mediana xifo pubiana com auxílio de tesoura cirúrgica.

Coletou-se sangue periférico (0,5 mL) em tubos de ensaio estéreis após punção caudal. Em seguida, realizou-se incisão mediana xifo pubiana para coleta de sangue porta (0,5 mL) utilizando agulha 13 x 4,5 acoplada à seringa descartável de 1mL. Posteriormente, fragmentos de aproximadamente  $0,03 \pm 0,01$  g de linfonodos mesentéricos, baço e fígado foram coletados, macerados e homogeneizados individualmente em placas de Petri estéreis. Fragmentos do baço, fígado, sangue porta, linfonodos mesentéricos e fezes da região média do intestino delgado.

Todas as amostras foram acrescidas de BHI (Infusão de cérebro e coração, Difco, São Paulo, SP, Brasil, 1:5 e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C / 24horas). Depois, semeadas em placas de Petri contendo meios de cultivo específicos para cada grupo de micro-organismos, bactérias gram-positivos (Agar sangue- Himedia®), bactérias gram-negativos (Agar EMB Levine - Himedia®). A leitura das placas foi realizada após 24-72 horas de incubação (37 °C). Com o crescimento nas placas de cultura, as espécies bacterianas foram identificadas por testes bioquímicos convencionais.

Considerou-se translocação bacteriana a presença de micro-organismo em cultura de sangue e/ou homogeneizado de órgãos, quando o mesmo esteve presente nas fezes do animal.

### **Avaliação da microbiota intestinal**

Amostra de fezes foi coletada diretamente da região média do intestino delgado de cada animal, após coleta dos tecidos. Para a determinação do número de unidades de colônias por grama de fezes (UFC/g) utilizou-se método adotado por Bisso<sup>10</sup>. Em tubos contendo amostras fecais foi acrescentada solução salina estéril 1:10 (NaCl 0,9%). Após homogeneização mecânica, obteve-se diluição inicial  $10^{-1}$ , seguida de diluições seriadas, até diluição de  $10^{-6}$ . A partir das cinco diluições preparadas, foram inoculados 0,1 ml de cada na superfície de placas contendo meios de cultivo bacterianos (Agar sangue e EMB Levine - Himedia®). Espalhou-se o inóculo com auxílio da alça calibrada descartável. As placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 24-48 horas. As bactérias foram identificadas de acordo com a morfologia colonial, microscópica e características bioquímicas. O cálculo do UFC foi dado pelo número de colônias detectado no meio de cultura x fator decimal de diluição das fezes x 10 (fator para expressar o resultado por grama de fezes, visto que o volume semeado em cada meio foi 0,1mL).

### **Apresentação e análise dos dados**

As variáveis quantitativas foram expressas por média e erro padrão, já as variáveis qualitativas em frequências absolutas e relativas. Para comparação entre os pesos utilizou-se teste Two-Way ANOVA, sendo estipulado o nível de significância de  $P < 0,05$ . O software utilizado para as análises foi o SigmaStat® 3.5.

## **RESULTADOS**

Os animais desnutridos apresentam um menor ganho de peso corporal em relação aos nutridos a partir do 4º dia de vida nos machos (Gráfico 1) e do 3º dia nas fêmeas (Gráfico 2), essa diferença perdura por todo período de aleitamento.

Quanto ao período de reposição nutricional, as fêmeas (Gráfico 4) apresentaram um menor ganho de peso a partir do 91º dia até a eutanásia, para os machos (Gráfico 3) não houve diferença significativa durante o mesmo período de reposição nutricional.

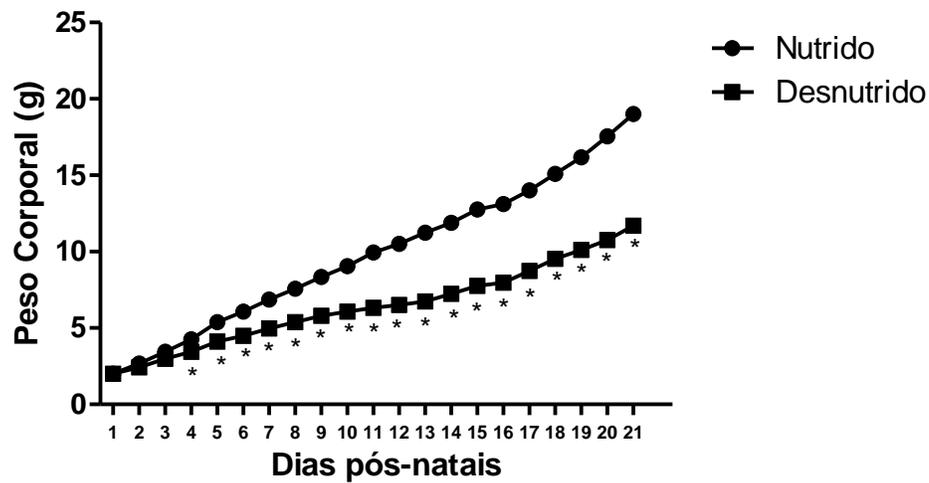


Gráfico 1 – Curva ponderal de camundongos machos nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Média  $\pm$  EPM – Two-Way ANOVA, \* $p < 0,05$ .

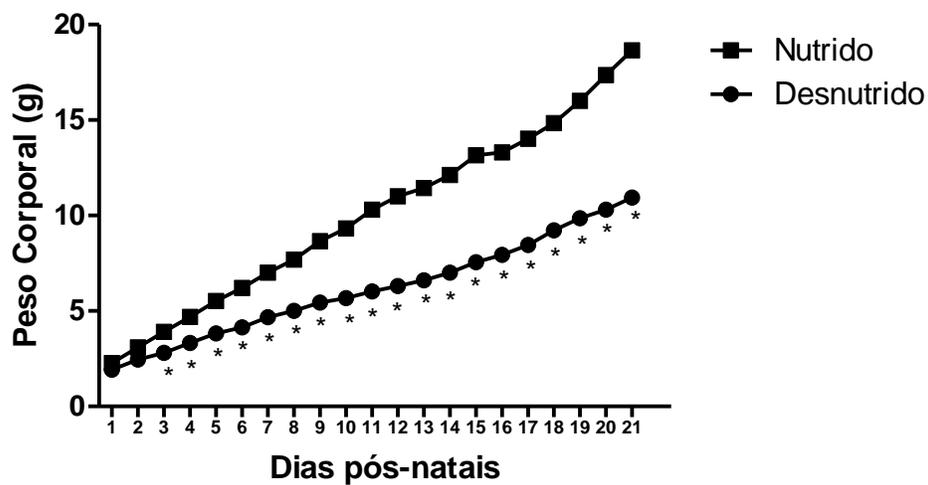


Gráfico 2 – Curva ponderal de camundongos fêmeas nutridas e desnutridas do 1º ao 21º dia de vida. Média  $\pm$  EPM - Two-Way ANOVA, \* $p < 0,05$ .

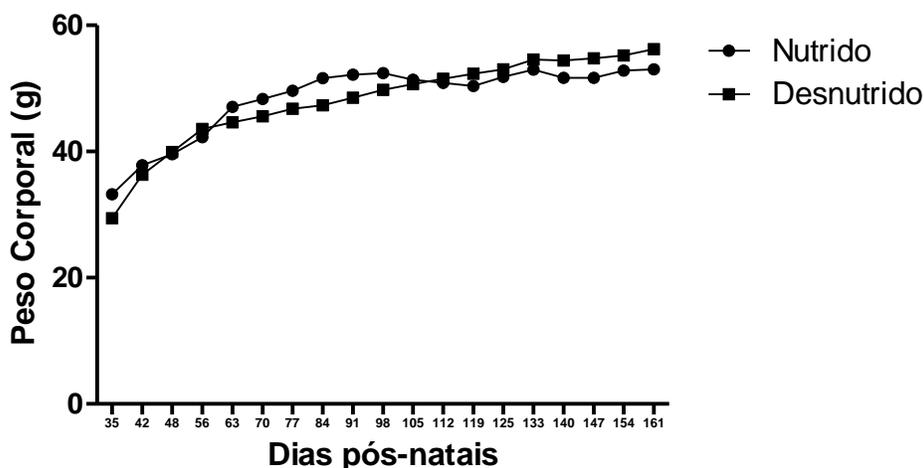


Gráfico 3 - Curva ponderal de camundongos machos do 35º até o 161º dia de vida. D-Desnutrido, N – Nutrido. Dados como média ± EPM - Two-Way ANOVA. \*p<0,05.

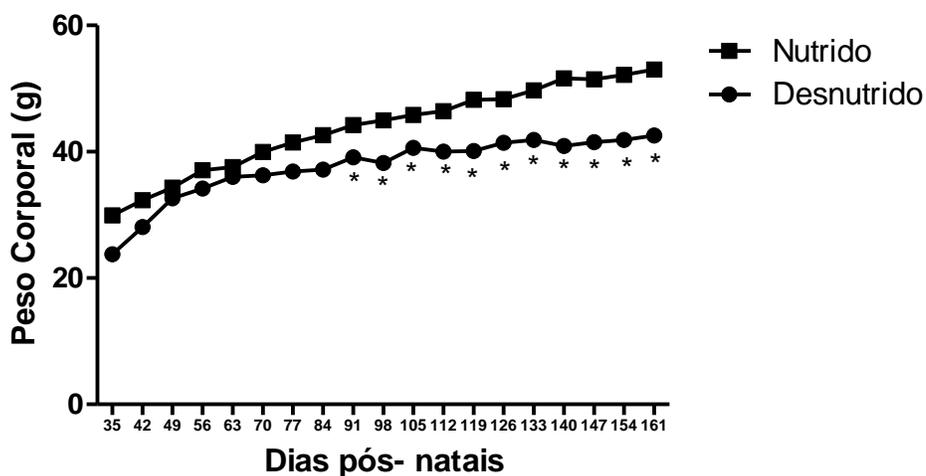


Gráfico 4 - Curva ponderal de camundongos fêmeas do 35º até o 161º dia de vida. D-Desnutrido, N – Nutrido. Dados como média ± EPM - Two-Way ANOVA. \*p<0,05.

## TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Translocação bacteriana foi observada apenas nos animais desnutridos, em ambos os sexos, sendo um pouco maior em animais machos desnutridos (Tabela 4). Houve translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos em ambos os sexos, nos animais desnutridos. Com relação à translocação para o sangue porta e fígado, apenas animais fêmeas desnutridas apresentaram bactérias nestas amostras teciduais.

No grupo desnutrido, bactérias foram isoladas dos linfonodos mesentéricos, nos cinco casos (uma fêmea e quatro machos), eram Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Serratia sp.* Nas culturas de linfonodos mesentéricos, machos desnutridos apresentaram positividade bacteriana em 100% das amostras. Nas amostra tecidual foram isolados *Proteus mirabilis em fígado*. Não foi encontrado bactérias nas amostras de sangue periférico, sangue porta e baço dos machos desnutridos.

Na cultura dos fragmentos dos linfonodos mesentéricos de fêmeas desnutridas foi evidenciado *S. aureus* e *E. coli*. em sangue porta, *E. coli*. Não observamos bactérias nas amostras de sangue periférico, fígado e baço das fêmeas desnutridas.

**Tabela 2-** Frequência de translocação bacteriana em camundongos desnutridos e eutróficos, machos e fêmeas.

Local	Translocação/ Isolado bacteriano		Translocação/ Isolado bacteriano	
	N - ♂	D - ♂	N - ♀	D - ♀
Linfonodos Mesentéricos	-	+ (4) <i>E. coli</i> e <i>Serratia sp</i>	-	+(1) <i>Escherichia coli</i>
Baço	-	-	-	-
Fígado	-	+(1) <i>P. mirabilis</i>	-	+ (1) <i>E. coli</i>
Sangue Periférico	-	-	-	-
Sangue Porta	-	-	-	+ (1) <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>

### Microbiota entérica

A Tabela 2 e 3 demonstram a análise qualitativa e quantitativa das amostras entéricas quanto à presença de bactérias nos grupos desnutrido e controle, segundo o sexo. Observamos aproximadamente as mesmas quantidades de colônias quando comparamos subgrupos machos e fêmeas, de ambos os grupos, desnutridos e controle. No entanto, animais desnutridos apresentaram maior prevalência de coproculturas positivas, tanto com relação à densidade bacteriana por espécies quanto ao número de UFC.

**TABELA 3 – Distribuição da frequência de bactérias por UFC (log10/g de fezes) isoladas de amostras entéricas camundongos machos desnutridos e nutridos.**

Isolados bacterianos	Grupos experimentais					
	Desnutrido			Nutrido		
	n	%	UFC (log 10)/g	n	%	UFC (log 10)/g
<i>Citrobacter freundii</i>	5	30	10 <sup>4</sup>	-	-	-
<i>Corynebacterium sp</i>	7	50	10 <sup>7</sup>	-	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	20	10 <sup>7</sup>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	16	80	10 <sup>9</sup>	17	90	10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	10	50	10 <sup>9</sup>	9	30	10 <sup>5</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	30	10 <sup>7</sup>	3	20	10 <sup>4</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	9	40	10 <sup>6</sup>	5	20	10 <sup>5</sup>
<i>Serratia sp.</i>	5	40	10 <sup>9</sup>	4	40	10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	50	10 <sup>7</sup>	7	40	10 <sup>5</sup>
<i>Staphylococcus coag neg</i>	6	50	10 <sup>5</sup>	12	80	10 <sup>7</sup>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10	60	10 <sup>9</sup>	-	-	-

**TABELA 4 – Distribuição da frequência de bactérias por UFC (log10/g de fezes) isoladas de amostras entéricas camundongos fêmeas desnutridas e nutridas.**

Isolados bacterianos	Grupos experimentais					
	Desnutrido			Nutrido		
	n	%	UFC (log 10)/g	n	%	UFC (log 10)/g
<i>Citrobacter freundii</i>	5	30	10 <sup>4</sup>	-	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	3	20	10 <sup>7</sup>	-	-	-

<i>Enterococcus faecalis</i>	16	80	10 <sup>9</sup>	17	90	10 <sup>7</sup>
<i>Escherichia coli</i>	10	50	10 <sup>9</sup>	9	30	10 <sup>5</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	9	40	10 <sup>6</sup>	5	20	10 <sup>5</sup>
<i>Serratia sp.</i>	5	40	10 <sup>9</sup>	4	40	10 <sup>8</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	50	10 <sup>7</sup>	7	40	10 <sup>5</sup>
<i>Staphylococcus coag neg</i>	6	50	10 <sup>5</sup>	12	80	10 <sup>7</sup>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	10	60	10 <sup>9</sup>	-	-	-

## DISCUSSÃO

No presente estudo a desnutrição imposta no período neonatal, seguida de reposição nutricional, produziu sequelas no crescimento e desenvolvimento nos animais.

Nesta pesquisa, utilizou-se como modelo experimental de desnutrição neonatal dieta a base de caseína 8%, caracterizada como hipoprotéica. A redução de proteína na dieta oferecida as mães é caracterizada pela restrição na quantidade total de nutrientes acessíveis aos filhotes. Assim, camundongos lactentes fêmeas desenvolvem desnutrição protéica aguda e os filhotes, desnutrição protéico-calórica contínua. Segundo Lisboa et al.<sup>11</sup> roedores lactentes alimentados com dieta hipoprotéica apresentam hipofagia, provocada por uma combinação de hiperleptinemia e hipoprolactinemia. Congruentemente o leite oferecido nesse período é deficiente em proteína e em volume para a sua prole<sup>12</sup>.

Este evento é condicionante para origem de efeitos deletérios observados a prole. A restrição alimentar durante o desenvolvimento do animal pode provocar efeitos irreversíveis, dependendo do período e do órgão em desenvolvimento. Se esta restrição se der durante o desenvolvimento celular, os animais não alcançarão níveis normais no peso de alguns órgãos, mesmo após reposição nutricional, devido ao decréscimo no número de células<sup>13</sup>.

Os animais que foram amamentados por essas mães apresentaram retardo do crescimento verificado pelo baixo peso no desmame, persistindo até os 161º dias de vida. Os animais desnutridos machos, a partir do 4º dias pós-natal e as desnutridas fêmeas, a partir do 3º dia pós-natal, apresentaram redução no peso quando

comparados aos respectivos controles. Esses dados são concordantes aos obtidos por Melo et al.<sup>14</sup>, que utilizaram a mesma dieta e o mesmo modelo de desnutrição aplicado no presente estudo.

Nossos dados mostram que a desnutrição neonatal produziu reduções do peso corporal tanto no período de aleitamento quanto na fase de reposição nutricional. A oferta da dieta normoprotéica a partir do desmame, parece não ter sido eficiente em recuperar a deficiência de peso corporal originada ainda no período do aleitamento, fenômeno já observado anteriormente em estudos com o mesmo modelo de desnutrição<sup>15,16,17</sup>. Segundo Nunes et al.<sup>18</sup>, ratos desnutridos durante o período pré e pós-natal, ao serem alimentados com dieta balanceada, rapidamente melhoram seu peso, entretanto, o peso alcançado após o período de reposição nutricional é inferior ao dos animais controle.

Diversos tipos de micro-organismos estão presentes no intestino. Seu estabelecimento e manutenção constitui processo complexo que pode ser influenciado por vários fatores, como: dieta, idade, utilização de antibióticos, utilização de probióticos e prebióticos, ambiente, microbiota materna, via do parto, interações microbianas e micro-organismo/hospedeiro e a presença de certos genes e receptores, além de sua sucessão ecológica, demanda nutricional e tolerância oral<sup>19, 20</sup>. Estes dados mostram que a microbiota é um ecossistema imensamente complexo, que pode ser comparado a uma entidade funcional ou a um “órgão” dentro do hospedeiro<sup>21</sup>. Foi observado, no presente trabalho, que a desnutrição modificou a microbiota dos camundongos. O grupo desnutrido, independente do sexo, apresentou maior variedade e quantidade de colônias bacterianas nas coproculturas quando comparados aos respectivos controles. O que poderia ser explicado, em parte, por ineficiência funcional do sistema imune associado ao trato digestório, em virtude da imunomodulação, hipotrofia das vilosidades ou estado nutricional. Entretanto, sabe-se que o desequilíbrio da microbiota residente contribui para excessivo crescimento de determinadas bactérias, tornando fator para processo de translocação bacteriana<sup>22</sup>.

Dentre as bactérias intestinais, a capacidade de translocação é maior em linhagens específicas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, que possuem maior capacidade de aderência e fixação ao epitélio produtor de muco<sup>23</sup>. No presente estudo, as bactérias que mais frequentemente translocaram via trato gastrointestinal no grupo dos desnutridos foram *Escherichia coli*, *Serratia sp*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis*. É importante salientar que o

trato gastrointestinal funciona como reservatórios de disseminação de infecção potencial<sup>23</sup>, como também que fazem parte da sua constituição micro-organismos anaeróbios facultativos, em maior número, e baixas contagens de anaeróbios estritos<sup>21</sup>.

Segundo Youssef et al.<sup>24</sup>, foi evidenciada translocação de bactérias Gram-negativa a partir do trato gastrointestinal em população de crianças desnutridas. De acordo com Vaishnavi et al.<sup>25</sup>, a translocação bacteriana é uma promotora de sepse, pode ser potencializado esse fator em indivíduos que sofreram má nutrição durante algum período da vida.

De acordo com Boza et al.<sup>26</sup>, a desnutrição devido à restrição dietética e fome causa uma série de mudanças metabólicas, que levam além da redução do peso corporal, imunodisfunção e alteração tecidual digestiva, particularmente do fígado e do intestino delgado. Esse conjunto de fatores é condicionante para translocação bacteriana sistêmica e suas complicações em indivíduos hospitalizados e/ou com patologias de trato gastrointestinal estabelecidas.

De acordo com os resultados, observamos maior ocorrência de translocação nos camundongos desnutridos em ambos os gêneros, quando comparados aos controles eutróficos. Foram observadas na referida pesquisa, translocação secundária para fígado em animais desnutridos de ambos os sexos; e para sangue porta, em fêmeas desnutridas. Nosso estudo demonstrou os machos apresentaram maior número de translocação bacteriana que as fêmeas, apesar de não ser estatisticamente significativa. O tamanho limitado da amostra impede que se obtenha uma melhor análise referentes a esse resultado.

A desnutrição precoce sofrida no grupo de animais pesquisados pode ter sido um dos fatores que levou a translocação bacteriana, além linfonodos, durante a vida adulta. Paralelamente, sabe-se que a desnutrição leva ao comprometimento da atividade enzimática mucosa, diminuição da absorção de nutrientes e aminoácidos, queda de fluxo sanguíneo mesentérico e comprometimento da função imune e da barreira intestinal<sup>3</sup>, condições conhecidas por facilitar a translocação bacteriana.

É frequente a importância de estudos em relação à influência do gênero no tratamento e desfechos de doenças<sup>8</sup>. Há muito tempo tem sido reconhecido que o sexo contribui para a incidência e evolução de distúrbios do sistema imune. Estudos demonstraram os esteróides gonadais como reguladores do número de monócitos, produção de citocinas e a diferenciação destes monócitos em macrófagos, exercendo suas funções sobre o sistema imunológico por modificar a secreção das citocinas

imunomoduladoras e regular a expressão de receptores na superfície célula<sup>27</sup>. Assim, o sexo pode influenciar no desfecho de determinadas doenças e orientar o tratamento a ser seguido. Couto et al.<sup>28</sup>, em estudo de pacientes com sepse, observou que mulheres abaixo dos quarenta anos de idade, portanto em período fértil, tiveram menor mortalidade do que homens; demonstrando uma tendência para menor mortalidade entre homens com mais de 50 anos.

Vários estudos demonstram que, durante a gravidez, ocorre supressão do sistema imunocelular para prevenir a rejeição materna fetal, pelo aumento nos níveis de estrogênio e/ou progesterona<sup>29</sup>. Apoio a este papel supressivo da progesterona é dado pelo conhecimento de que muitas doenças auto-imunes, como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla, podem melhorar com a gravidez e piorar após o parto. Nos monócitos humanos, a progesterona eleva a síntese das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6<sup>30</sup>. No presente trabalho, não se obteve uma resposta definitiva sobre a influencia do sexo no aumento da translocação bacteriana em desnutridos e não desnutridos. Serão necessários outros estudos para esclarecer a fisiopatologia que forma a base das diferenças relacionadas ao sexo em relação a translocação bacteriana.

## **CONCLUSÃO**

A desnutrição protéica imposta aos animais durante o período crítico de desenvolvimento causou redução ponderal persistente na prole até a vida adulta. O modelo de desnutrição adotado promoveu alteração dos componentes bacterianos da microbiota intestinal tanto no grupo dos animais machos, quanto nas fêmeas. Apenas os animais desnutridos, de ambos os sexos, apresentaram translocação bacteriana primária e secundária, entretanto não foi encontrada diferença quanto ao sexo do animal.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Não há conflito de interesses

## **COLABORADORES**

BHA GALVÃO participou da elaboração do projeto de pesquisa, da estratégia experimental, da coleta de dados, tabulação, da discussão dos resultados e da redação

do artigo. SB SILVA E CA ARAUJO participou da preparação dos grupos experimentais, da manutenção dos animais no biotério e da coleta de dados. AL AIRES participou da preparação dos grupos experimentais, da manutenção dos animais no biotério e da coleta das amostras. KM LIMA e WT FERREIRA e SILVA participou da elaboração do projeto de pesquisa, desenho experimental e análise dos dados. CMMB CASTRO participou da elaboração do projeto de pesquisa, da tabulação, da discussão dos Resultados e da elaboração do artigo.

## Referências

- 1- Wiest R, Rath HC. Bacterial translocation in the gut. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 2003; v. 17, p. 397-425.
- 2- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shomchik M. *Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença*. 5ª ed. ARTMED, 2002; Porto Alegre.
- 3- Chandra, R.K. Nutrition and immune system: an introduction. *Am Journal of Clinical Nutrition*, 1997; v.66, n.2, p: 460– 463.
- 4- Morelli, NR; Enokida, DM; Trauma, Sepse e Desnutrição: Um Estudo de Caso. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, 2013; 15(1): 59-63.
- 5- Deitch, EA; The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch surg*, 1990; 125:403-404.
- 6- Lima KM, Aires AL, Lucena LRR, Almeida TM, Albuquerque MCPA, Castro CMMB. Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 2012; 42: 309-320.
- 7- Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC, Morales-Montor J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?. *Trends Parasitol*, 2005; 21: 588-593.
- 8- Couto DO, Peixoto Junior AA, Farias JLM, Sales DB, Lima JPA, Rodrigues RS, Meneses FA. Associação entre sexo e mortalidade em pacientes com sepse: os hormônios sexuais influenciam o desfecho?. *Rev. bras. ter. intensiva*. 2011, vol.23, n.3, pp. 297-303. ISSN 0103-507X. doi: 10.1590/S0103-507X2011000300007.
- 9- Reeves, PG, Nielsen, FH, Fahey, GC AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A Rodent diet. *Journal of Nutrition*, Bethesda, 1993; v.123, n.11, p.1939-1951.

- 10- Bisso LM. Modelo Murino de inflamação intestinal crônica: Avaliação quantitativa da dinâmica da microbiota intestinal (Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense), 2008; Rio de Janeiro.
- 11- Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCP, Bonomo LT, Denolato ATA, Reis AM, et al. Leptin and Prolactin, but not corticosterone, Modulate Body Weight and Thyroid function in Protein-Malnourished Lactating rats. *Horm Metab Res.* 2006; 38(5): 295-9. doi: 10.1055/s-2006-925390.
- 12- Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res.* 2000; 20(11): 1603-1612. doi: 10.1016/S0271-5317(00)00246-3.
- 13- Rabelo, F. Marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes com doença hepática não gordurosa não alcoólica (DHGNA). 2010. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo.
- 14- Melo JF, Macedo EMC, Silva RPP, Viana MT, Silva WTF, Castro CMMB. Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. *Rev. Nutr.* 2008; 21(6): 683-694. doi: 10.1590/S1415-52732008000600007.
- 15- Delmondos GMB. Repercussão do treinamento físico moderado e intenso nos mecanismos de defesa de ratos adultos desnutridos precocemente. [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2009.
- 16- Severo MS. Função microbicida de macrófagos alveolares de ratos submetidos à desnutrição neonatal: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *staphylococcus aureus* metilicina-sensível e metilicina resistente. [Dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2009.
- 17- Costa TB, Moraes NG, Almeida TM, Severo MS, De Castro CMMB. Desnutrição neonatal e produção de IFN- $\gamma$  IL-12 e IL-10 por macrófagos/linfócitos: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *Staphylococcus aureus* metilicina sensível e metilicina resistente. *Rev. Nutr.* 2012; 25(5): 607-619. doi: 10.1590/S1415-52732012000500006.
- 18- Nunes ML, Batista BB, Micheli F, Batistella V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rats. *J Ped (Rio de Janeiro).* 2002; 78(1): 39-44. doi: 10.1590/S0021-75572002000100009.
- 19- Van Der Waaij D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annual Review of Microbiology*, 1989; v. 43, p. 67-87.
- 20- Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 91 14, 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003; v. 78, p. 675-683.
- 21- Nicoli JR. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin*, 1995; v. 15, p. 183-190.

22- Gencay C, Kilicoglu SS, Kismet K, Kilicoglu B, Erel S, Muratoglu S, et al. Effect of honey on bacterial translocation and intestinal morphology in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(21): 3410-5. PubMed PMID: 18528939.

23- Petroianu A, Petroianu S. Anatomy of splenogastric vessels in patients with schistosomal portal hypertension. *Clin Anat.* 1994; 7:80-3. doi: 10.1002/ca.980070205.

24- Youssef M, Al Shurman A, Chachaty E, Bsoul AR, Andremont A. Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract in malnourished children with Gram-negative bacteremia. *Clin Microbiol Infect.* 1998; 4(2): 70-74. PubMed PMID: 11864289.

25- Vaishnavi C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. *Indian J Med Microbiol.* 2013; 31(4):334-42. doi: 10.4103/0255-0857.118870. PubMed PMID: 24064638.

26- Boza JJ, Moënnoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsché R, et al. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr.* 1999; 129(7): 1340-6. PubMed PMID: 10395596.

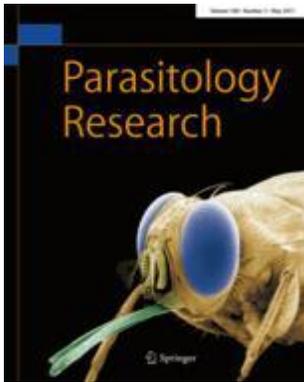
27- Pelfrey CM. Sexual dimorphism in autoimmunity: a focus on Th1/14. Th2 cytokines and multiple sclerosis. *Clinical Application of Immunology*, 2001; v. 1, n. 6, p. 331-45.

28- Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Rocha DB, Ferreira HS. Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. *Rev Pat Trop*, 2007; 36: 54-66.

29- Grossman Cj, Rossele Ga, Mendenhall Cl. Sex steroid regulation of 5. autoimmunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1994; v. 40, v. 649- 59.

30- Jain Sk, Kannan K, Prouty L, Jain Sk. Progesterone, but not 17 $\beta$ -estradiol, increases TNF- $\alpha$  secretion in U937 monocytes. *Cytokine*, 2004; v. 26, n. 3, p. 102-5.

## 6.2 -Artigo original



### TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL

## Resumo

Estudos experimentais sobre as inter-relações entre esquistossomose e estado nutricional do hospedeiro têm demonstrado que a desnutrição protéico-calórica associada à infecção por *S. mansoni* altera o ambiente do trato gastrointestinal, portanto, associação capaz de favorecer translocação bacteriana (TB). O presente trabalho avaliou a associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana, em camundongos desnutridos no período neonatal. Camundongos fêmeas formaram os grupos Nutrido Infectado (NI), Nutrido Não Infectado (NNI), Desnutrido Infectado (DI) e Desnutrido Não Infectado (DNI). Analisou-se o peso corporal (PC), ocorrência de TB e morfometria intestinal em todos os grupos. Os animais desnutridos obtiveram um menor ganho de PC que os nutridos. Verificou-se um maior índice de TB nos animais infectados. Entre os infectados, houve uma maior incidência de TB nos desnutridos. Observou-se um maior número de ovos e vermes recuperados no grupo N, entretanto não houve diferença na maturação de ovos na mucosa intestinal. Quanto a morfometria intestinal, houve diferença entre NI e NNI para altura e área da vilosidade, e apenas na altura para NI e DNI. Observamos uma maior diversidade de colônias nos grupos de animais desnutridos, controle e esquistossomóticos. Pode-se concluir que a desnutrição modifica a resposta imune e parece favorecer translocação bacteriana em camundongos infectados por *S. mansoni*.

**Palavras-chave:** Esquistossomose. Desnutrição. Translocação bacteriana. Microbiota.

## Introdução

Desnutrição e esquistossomose são problemas de Saúde Pública que ocorrem simultaneamente em muitas regiões endêmicas do Brasil e do mundo. É frequente a associação da esquistossomose com a desnutrição, uma vez que a deficiência nutricional é capaz de interferir na formação de processos essenciais para a defesa do hospedeiro (Pordeus et al., 2008). Estudos experimentais sobre as inter-relações entre esquistossomose e estado nutricional do hospedeiro têm demonstrado que a desnutrição protéico-calórica associada à infecção por *S. mansoni* altera o ambiente do trato gastrointestinal (Barros, 2008; Coutinho et al., 2003).

Com os danos intestinais causados pela infecção parasitária e o efeito de uma nutrição deficiente na resposta imunológica intestinal, como ocorre na desnutrição, pode predispor ao desenvolvimento do processo de translocação bacteriana (TB). Esse processo pode ocorrer por falha na barreira intestinal e está caracterizado pela absorção prejudicada de nutrientes, comprometimento da resposta imunológica intestinal e aumento da permeabilidade do intestino (De-Souza e Greene, 2005).

A translocação bacteriana está associada ao risco aumentado de sepse, supondo que o intestino seja o causador da mesma. Esta hipótese propõe que a bactéria, que normalmente reside dentro do lúmen intestinal, possa translocar através das células do epitélio intestinal e atuar como propagadora da sepse aos sítios distantes (Wiest & Rath, 2003).

Acredita-se que para ocorrer à passagem de micro-organismos e endotoxinas da luz intestinal para a corrente sanguínea há necessidade da existência isolada ou conjunta de danos na imunidade do paciente, alteração da microbiota e quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal (Dwinell et al., 2003; Wiest & Rath, 2003). Na literatura científica pesquisada, não foram encontrados estudos que esclareçam as dúvidas a respeito da associação entre translocação bacteriana, desnutrição e esquistossomose mansônica mesmo

sabendo que esta última, pode provocar além de alterações no sistema imunológico, dano ao intestino, sistema porta e linfonodos mesentéricos.

Diante da existência de lacunas na compreensão de determinadas respostas imunológicas inseridas no processo de TB e esquistossomose e, considerando que, o estado nutricional do hospedeiro é tido como um dos prováveis fatores coadjuvantes no agravamento da infecção parasitária (Silva, 2009), o presente estudo se propõe a avaliar a ocorrência de translocação bacteriana em animais esquistossomóticos na fase crônica submetidos à desnutrição neonatal.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e dietas**

Foram utilizados 60 camundongos, fêmeas, da linhagem *Swiss webster*, provenientes da colônia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas). O estudo foi aprovado através do processo nº 23076.0262257/2011-74 pela Comissão de Ética no uso de animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA).

Até 24 horas após o nascimento, os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com a alimentação materna: Nutrido (N; n=30) alimentados por mães que recebiam dieta a base de caseína 17% e Desnutrido (D; n= 30) alimentados por mães que recebiam dieta a base de caseína 8% (Tabela1). As mães receberam água e ração *ad libitum*. Após o desmame (22º dia de vida), os animais de ambos os grupos passaram a ser alimentados com dieta labina (Purina®), para reposição nutricional, até o final dos experimentos.

O peso corporal dos animais foi mensurado diariamente (em balança eletrônica digital – Gehaka®; 0,001g) no período de aleitamento (21 dias) e semanalmente a partir do 22º dia, a fim de acompanhar a evolução ponderal.

Tabela 1 - Composição (g/100g da mistura) das rações utilizadas na alimentação materna.

<i>Ingrediente</i>	<i>Caseína a 17%</i>	<i>Caseína a 8%</i>
Amido de Milho	41,01	48,51
Caseína	18,89	8,89
Amido dextrinizado	13,05	16,65
Sacarose	10	12,1
Óleo de Soja	7	4
Celulose	5	5
Mix Mineral (AIN 93 G)	3,5	3,5
Mix Vitamínico (AIN 93)	1	1
L-Cistina	0,3	0,1
Bitartarato de Colina	0,25	0,25
BHT	0,0014	0,0008

Fonte: REEVES et al., 1993.

### **Infecção pelo *S. mansoni* e grupos de estudo**

A infecção foi realizada no trigésimo quinto dia de vida do animal, por via percutânea. Os camundongos foram postos em contato com aproximadamente 30 cercárias, da cepa Belo Horizonte (BH), obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* mantidos pelo Setor de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical (UFPE).

Foram infectados 15 animais de cada grupo (N e D), constituindo-se os subgrupos: Nutrido Infectado (NI; n=15), Nutrido Não Infectado (NNI; n=15), Desnutrido Infectado (DI; n=15) e Desnutrido Não Infectado (NNI; n=15).

Uma vez que a fase crônica da doença esquistossomótica murina é estabelecida a partir da 12<sup>a</sup> semana da exposição cercariana (Fallon 2000; Pearce and MacDonald et al. 2002), o tempo de experimentação determinado para o estudo foi de 14 semanas de infecção.

### **Avaliação parasitológica**

Com 45 dias da exposição cercariana, os animais foram avaliados individualmente pelo método Kato-Katz, para confirmar a infecção e quantificar o

número de ovos eliminados junto às fezes. Após a retirada das amostras biológicas para estudo da translocação, os vermes foram recuperados através da técnica de perfusão do sistema venoso porta e veias mesentéricas de acordo com a técnica de Yolles et al. (1947), objetivando a contagem e classificação do sexo dos vermes adultos. Para o oograma, fragmentos de diferentes regiões no intestino delgado foram removidos e usados para avaliar o desenvolvimento e maturação dos ovos de *S. mansoni*, estudado de acordo com a Pellegrino et al. (1962).

### **Avaliação da translocação bacteriana**

Posteriormente ao período de experimentação, os camundongos foram anestesiados com cloridato de cetamina (10%) e xilazina (2%) para coleta de sangue periférico, por punção caudal. Antes da coleta, foi realizada rigorosa assepsia da cauda e de todo o corpo do animal com iodopovidona para evitar contaminação das amostras.

Imediatamente, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e realizou-se, após tricotomia e assepsia, incisão mediana xifo pubiana com auxílio de tesoura cirúrgica.

Coletou-se sangue periférico (0,5 mL) em tubos de ensaio estéreis após punção caudal. Em seguida, realizou-se incisão mediana xifo pubiana para coleta de sangue porta (0,5 mL) utilizando agulha 13 x 4,5 acoplada à seringa descartável de 1mL. Posteriormente, fragmentos de aproximadamente  $0,03 \pm 0,01$  g de linfonodos mesentéricos, baço e fígado foram coletados, macerados e homogeneizados individualmente em placas de Petri estéreis.

Todas as amostras foram acrescidas de BHI 1:5 (Infusão de cérebro e coração, Difco, São Paulo, SP, Brasil) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C / 24horas. Depois, semeadas em placas de Petri contendo meios de cultivo específicos para cada grupo de micro-organismos: bactérias gram-positivos (Agar sangue - Himedia®), bactérias gram-negativas (Agar EMB Levine - Himedia®). A leitura das placas foi realizada após 24-72 horas de incubação (37°C). Com o

crescimento nas placas de cultura, as espécies bacterianas foram identificadas por testes bioquímicos convencionais.

Considerou-se translocação bacteriana a presença de micro-organismo em cultura de sangue e/ou homogeneizado de órgãos, quando o mesmo esteve presente nas fezes do animal.

### **Avaliação da microbiota intestinal**

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da região média do intestino delgado de cada animal. Para a determinação do número de unidades Formadoras de colônias por grama de fezes (UFC/g) utilizou-se método adotado por Bisso (2008). Em tubos contendo amostras fecais foram acrescentado solução salina estéril/ NaCl 0,9% (1:10). Após homogeneização mecânica, foram inoculados 0,1 ml da amostra na superfície de placas contendo meios de cultivo bacterianos (Agar sangue e EMB Levine - Himedia®). Espalhou-se o inóculo com auxílio da alça calibrada descartável. As placas foram incubadas invertidas a 37°C durante 24-48 horas. As bactérias foram identificadas de acordo com a morfologia colonial, microscópica e características bioquímicas.

### **Análise morfométrica da mucosa duodenal**

Fragmentos da porção média do intestino delgado de cada animal foram coletados, fixados em formaldeído a 10% tamponado em PBS (Tampão fosfato tamponado, Difco, Detroit, MI) a pH 7,2 e processados para inclusão em parafina. Posteriormente, realizado cortes histológicos de 5µm de espessura e corados pela técnica de Tricrômico de Masson. As variáveis consideradas para o intestino no estudo morfométrico foram medidas da altura, área e quantidade das vilosidades. Para esta análise, examinador cego aos grupos, capturou imagens em cinco campos aleatórios (área total de campo = 12.234 µm<sup>2</sup>, área total visualizada = 61.170µm<sup>2</sup>) das amostras histológicas de cada animal e analisou as mesmas com auxílio do software Image J<sup>®</sup>. Os valores obtidos

foram expressos em micrometro ( $\mu\text{m}$ ) para a análise estatísticas foram utilizadas as médias dos dados.

## Apresentação e análise dos dados

As variáveis quantitativas foram expressas por média e desvio padrão, já as variáveis qualitativas em frequências absolutas e relativas. Para comparação entre os pesos utilizou-se teste Two-Way ANOVA, sendo estipulado o nível de significância de  $P < 0,05$ . Utilizou-se o teste One-Way ANOVA para os dados histomorfométricos. O software utilizado para as análises foi o SigmaStat® 3.5.

## Resultados

De acordo com os dados do Gráfico 1, os animais desnutridos apresentaram um menor ganho de peso corporal em relação aos seus controles a partir do 3º dia ( $p < 0,05$ ), diferença observada durante toda vida do grupo (Gráfico 2). Não houve diferenças significativas ao comparar camundongos infectados e não infectados (DI *versus* DNI ou NI *versus* NNI).

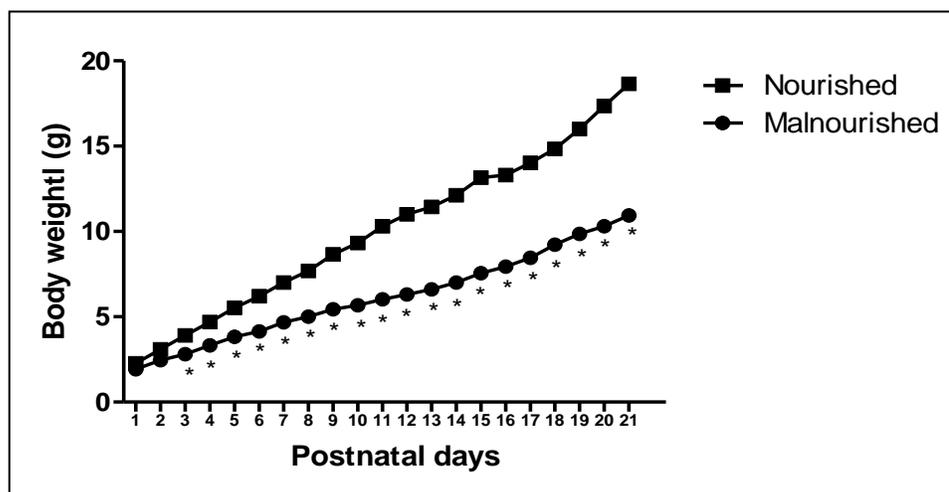


Gráfico 1 – Curvas ponderais de camundongos nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Média  $\pm$  EPM - Two-way ANOVA, \* $p < 0,05$ .

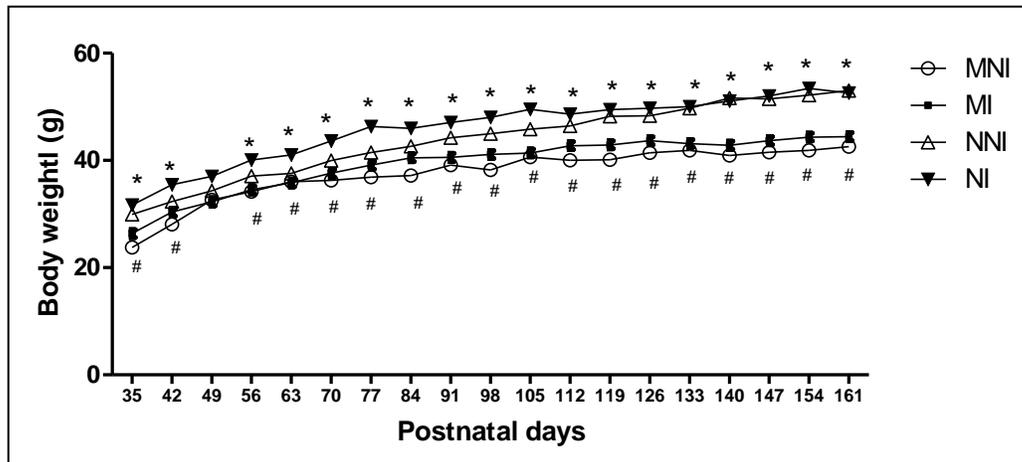


Gráfico 2 - Curvas ponderais de camundongos do 35º até o 161º dia de vida. NI- Nutrido Infectado, NNI- Nutrido Não Infectado, DI – Desnutrido Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Média ± EPM – Two-way ANOVA.

\* Diferença entre NI e DI ( $p < 0,05$ ) # Diferença entre NNI e DNI ( $p < 0,05$ )

Nos esquistossomóticos, a média de vermes adultos recuperados dos camundongos nutridos foi maior quando comparados aos desnutridos ( $P = 0,0001$ ), sendo a quantidade de vermes machos maior que a quantidade de vermes fêmeas ( $P = 0,0001$ ). O número de ovos por g/fezes foi maior grupo nutrido quando comparado ao desnutrido no 45º dia após a infecção ( $P < 0,05$ ). Quanto ao oograma, não houve diferença quanto ao estágio de maturação dos ovos presentes na mucosa intestinal em ambos os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Número médio de vermes recuperados, ovos eliminados por g/fezes e estágio de maturação de ovos em camundongos esquistossomóticos nutridos e desnutridos. Média ± DP, \* $p < 0,05$ .

Grupos	Número de ovos	Recuperação de vermes		Oograma		
		Total	Fêmea	Imaturos	Maduros	Mortos
Nutridos	42 ± 11,35*	21,00±3,46*	9,833±1,47*	57,61±6,052	34,97±2,439	6,882±0,8661
Desnutridos	18 ± 6,66	13,29±2,49	6,286±1,11	55,93±5,260	38,89±3,280	7,218±0,8312

A tabela 3 demonstra a análise qualitativa das amostras entéricas quanto à presença de bactérias nos animais que sofreram desnutrição e infecção pelo S.

*mansoni* e seus controles. Observamos uma maior diversidade de colônias nos grupos de animais desnutridos, controle e esquistossomóticos. Entretanto, camundongos desnutridos parasitados apresentaram maior prevalência de coproculturas positivas, em relação à densidade bacteriana por espécies.

Tabela 3- Distribuição da frequência relativa e absoluta de isolados bacterianos em amostras entéricas por grupo.

Isolados Bacterianos	NNI		NI		DNI		DI	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Bacillus</i> sp	-	-	-	-	4	26,6	5	33,3
<i>Citrobacter diversus</i>	5	33,3	2	13,3	3	20,0	6	40,0
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	2	13,3	2	12,3	4	26,6
<i>Corynebacterium</i> sp	-	-	1	6,6	3	20,0	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	26,6	2	13,3	3	20,0	5	33,3
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	-	-	2	13,3	2	13,3
<i>Enterobacter gergoviae</i>	-	-	1	6,6	1	6,6	3	20,0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	-	-	-	-	-	-	2	13,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	100	8	53,3	15	100	8	53,3
<i>Escherichia coli</i>	10	66,6	12	80,0	10	66,6	11	73,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	13,3	2	13,3	-	-	1	6,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	26,6	3	20,0	4	26,67	6	40,0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	-	-	-	-	-	-	1	6,6
<i>Proteus mirabilis</i>	5	33,3	6	40,0	6	40,0	8	53,3
<i>Proteus rettgeri</i>	2	13,3	1	6,6	3	20,0	1	6,6
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	1	6,6	2	13,3	3	20,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	6,6	1	6,6	2	13,3	2	13,3
<i>Serratia liquefaciens</i>	8	53,3	6	40,0	9	60,0	5	33,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	73,3	10	66,6	10	66,6	14	93,3
<i>Staphylococcus coag neg</i>	13	86,6	11	73,3	9	60,0	12	80,0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	2	13,3	10	66,6	10	66,6
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-	1	6,6

As frequências absolutas e relativas da incidência de translocação bacteriana por grupos encontram-se na tabela 4. Foi verificado maior índice de translocação nos grupos infectados, animais desnutridos apresentaram maior translocação que animais nutridos ( $p < 0,05$ ). Em relação a translocação no grupo desnutrido, a TB ocorreu principalmente nos animais infectados, quando comparados aos não infectados ( $p < 0,05$ ). Nos animais nutridos, houve um maior número de TB nos animais infectados em relação ao grupo não infectado ( $p < 0,05$ )

Tabela 4 – Incidência de translocação bacteriana segundo os grupos de comparação. Dados como frequência absoluta e relativa – Fisher e Yates corrigido.

<b>Grupos</b>	<b>Translocação bacteriana</b>
Nutrido Infectado	7/15 (46,6%) <sup>a,c</sup>
Desnutrido Infectado	13/15 (86,6%) <sup>b</sup>
Nutrido Não Infectado	0/15 (0%)
Desnutrido Não Infectado	3/15 (20%)

<sup>a</sup> Diferença entre Nutrido Infectado e Nutrido Não Infectado ( $p=0,006$ )

<sup>b</sup> Diferença entre Desnutrido Infectado e Desnutrido Não Infectado ( $p=0,001$ )

<sup>c</sup> Diferença entre Nutrido Infectado e Desnutrido Infectado ( $p=0,05$ )

Houve translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos em três grupos experimentais, sendo mais prevalente em esquistossomóticos. Com relação à translocação para sangue porta, fígado, baço e sangue periférico, animais parasitados apresentaram maior número de bactérias teciduais, sendo mais assinalado nos desnutridos esquistossomóticos (Tabela 5).

Foram isoladas diferentes espécies de bactérias gram-negativas, grande parte dos isolados fazem parte da família *Enterobacteriaceae* fermentadoras e apenas uma espécie não fermentadora de carboidratos, em todas as amostras representativas de translocação bacteriana, diferentemente do observado para bactérias gram-positivas, que estiveram em menor número.

Tabela 5- Frequência de translocação bacteriana por tecido.

Grupos	Translocação bacteriana de acordo com as amostras teciduais										
	LM		SPO		F		B		SPE		
	N	%	n	%	N	%	N	%	N	%	
NNI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NI	7	46,6	4	26,6	3	20,0	2	13,3	1	6,6	
DNI	3	20,0	1	6,6	1	6,6	-	-	-	-	
DI	13	86,6	6	40,0	3	20,0	3	20	2	13,3	

A análise morfológica macroscópica da mucosa intestinal revelou aumento de volume, aumento de calibre e intensa rigidez tecidual nas alças intestinais nos animais esquistosomóticos, sendo mais acentuado nos que sofreram desnutrição neonatal. As análises morfológicas e morfométricas da porção média do intestino delgado estão descritas a seguir.

Para o grupo dos animais nutridos não infectados (NI) – os cortes histológicos revelaram por campo examinado, número mínimo de 7 e máximo de 10 vilosidades; com média de 7,8; OR de 0,45; e mediana de 9. As vilosidades eram constituídas por células de padrão cuboidal; na proximidade da porção de lâmina própria observamos criptas com características usuais de normalidade, bem como células claras, por vezes tais células foram encontradas nas porções de corpo e ápice destas estruturas (figura 1a). Os dados referente a altura e área das vilosidades encontra-se na tabela 5.

Para o grupo dos animais nutridos infectados (NI)- os cortes histológicos revelaram por campo examinado número mínimo de 5 máximo de 8 vilosidades; com média de 6,7; OR de 0,49; e mediana de 6. As vilosidades eram constituídas por células de padrão cuboidal, sendo observado hiperplasia na altura das vilosidades; na proximidade da porção de lâmina própria visualiza-se padrão fibroso associado a formação granulomatosa, bem como células claras, por vezes tais células foram encontradas nas porções de corpo e ápice destas estruturas (figura 1b). Os dados referente a altura e área das vilosidades encontra-se na tabela 5.

Para o grupo dos animais desnutridos não infectados (DNI) – os cortes histológicos revelaram por campo examinado número mínimo de 5 e número de 7 vilosidades; com média de 5,7; OR de 0,44; e mediana de 5. As vilosidades eram constituídas por células de padrão por células de padrão cuboidal, sendo observado hiperplasia na largura das vilosidades; na proximidade da porção de lâmina própria observamos criptas com características usuais de normalidade, bem como células claras em dimensão variável, por vezes tais células foram encontradas nas porções de corpo e ápice destas estruturas (figura 1c). Os dados referente a altura e área das vilosidades encontra-se na tabela 5.

Para o grupo dos animais desnutridos infectados (DI) - os cortes histológicos revelaram por campo examinado número mínimo de 7 e máximo de 13 vilosidades; com média de 9,3; OR de 0,79; e mediana de 10. As vilosidades eram constituídas por células de padrão cuboidal e claras em proporção equivalente, em alguns espécimes observamos um predomínio de células claras; na porção de lâmina própria observamos criptas que estão presentes até a região de terço médio das vilosidades, na mesma estrutura observa-se padrão fibroso associado a formação granulomatosa, relevante ressaltar que visualiza-se a formação de granuloma no terço basal epitelial e também observado na camada muscular e serosa, isoladamente ou em coalescência. Os granulomas são formados por macrófagos e linfócitos dispostos em proximidade ao ovo ou vestígio de ovo central e eventualmente observa-se eosinófilos, resultando em deslocamento das vilosidades no espaço intraluminal (figura 1d). Os dados referente a altura e área das vilosidades encontra-se na tabela 5.

Figura 1 – Aspectos histológicos da região media do intestino delgado por grupo experimental coradas pelo Tricrômico de Masson. (a) NNI- Nutrido Não Infectado, (b) NI- Nutrido Infectado, (c) DNI – Desnutrido Não Infectado; (d) DI – Desnutrido Infectado.

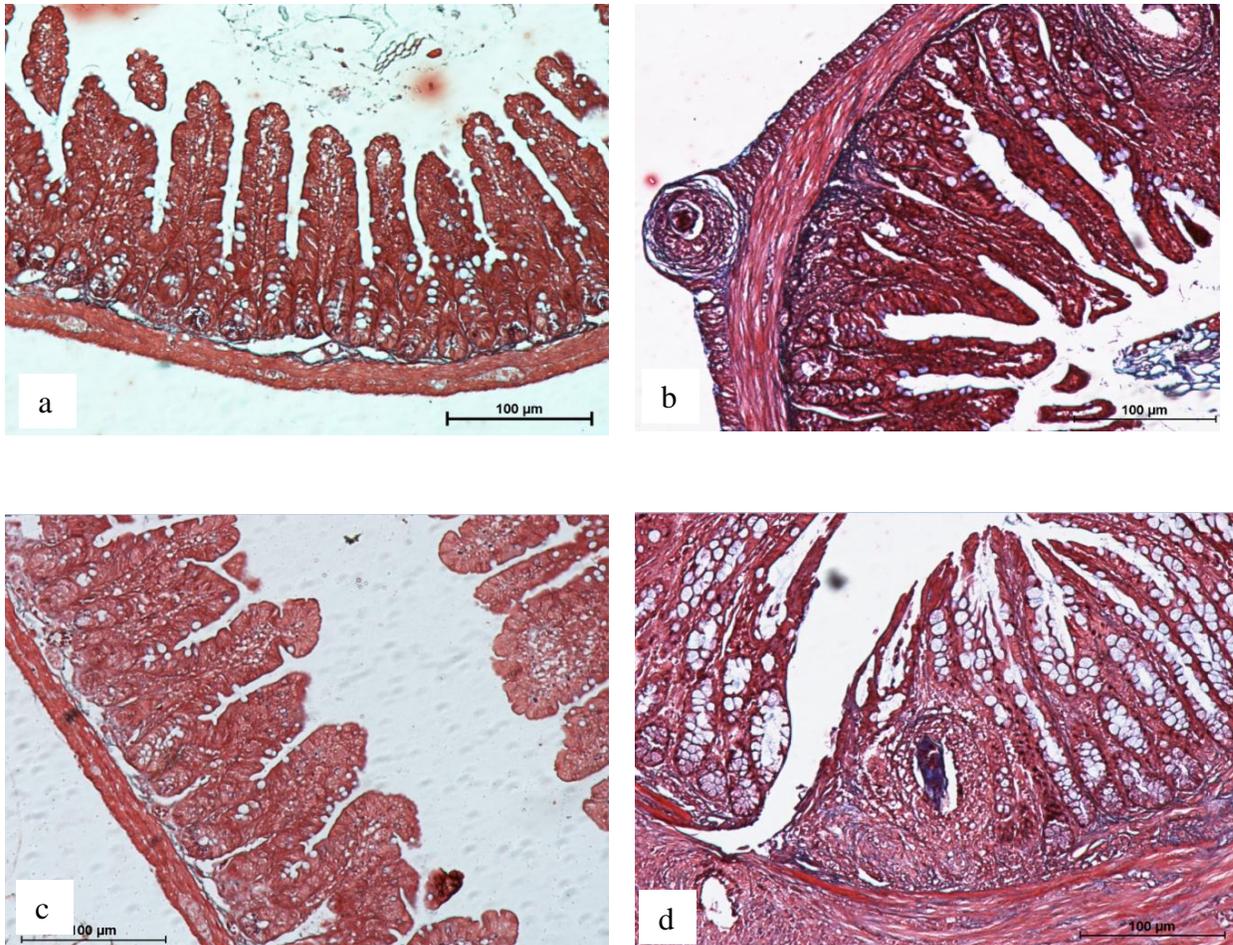


Tabela 6- Comparação da morfometria da mucosa duodenal e do fígado entre os grupos: NI- Nutrido Infectado, NNI- Nutrido Não Infectado, DI – Desnutrido Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Média  $\pm$  DP – One-way ANOVA.

Grupos	Parâmetros morfométricos	
	Altura da vilosidade	Área da vilosidade
NNI	186,70 $\pm$ 10,01	9.119,53 $\pm$ 945,80
NI	255,97 $\pm$ 44,34 <sup>a</sup>	14.543,26 $\pm$ 3.150,53 <sup>a</sup>
DNI	259,04 $\pm$ 53,65 <sup>b</sup>	13.607,16 $\pm$ 2.913,86
DI	232,30 $\pm$ 27,20	10.512,86 $\pm$ 2.177,82

<sup>a</sup> Diferença entre Nutrido Infectado e Nutrido Não Infectado ( $p=0,002$ )

<sup>b</sup> Diferença entre Nutrido não Infectado e Desnutrido Não Infectado ( $p=0,009$ )

## Discussão

A esquistossomose associada à desnutrição neonatal em modelo experimental permite compreender alterações fisiopatológicas originadas dessa associação, onde as complicações de natureza infecciosa podem existir a partir de processo de translocação bacteriana intestinal. No presente estudo, foram avaliados os efeitos da infecção por *S. mansoni* em animais adultos que sofreram de desnutrição durante o período de lactação.

Assim, utilizou-se como modelo experimental de desnutrição neonatal, dieta a base de 8% de caseína oferecida as mães no período de lactação dos filhotes e essa dieta materna, se caracteriza por ser hipoprotéica. A redução do aporte de proteína na dieta oferecida as mães proporciona restrição da quantidade total de nutrientes acessíveis a prole, através do aleitamento. Os dados revelam que, durante o período de lactação o ganho de peso corporal foi menor no grupo desnutrido quando comparado ao grupo nutrido. Tais resultados demonstram diferença nos pesos corporais entre os grupos, a partir do terceiro dia de vida pós-natal, sugerindo que o modelo de desnutrição imposta no período de lactação ocasionou retardo no crescimento verificado pelo baixo peso durante a lactação. Esses resultados corroboram com os achados de Melo et al. (2008), entretanto empregaram uma dieta multideficiente, a Dieta Básica Regional (DBR). Porto et al. (2007) e Costa et al. (2012) ao utilizar caseína 8% como modelo de desnutrição, detectaram redução no peso das animais desnutridos após o quinto e quarto dia de vida, respectivamente.

A substituição pela dieta normoprotéica (23% proteína) a partir do desmame não foi eficaz em compensar a diferença de peso entre os animais desnutridos. Segundo Guzmánsilva et al.(2004), animais desnutridos durante o período perinatal ao serem alimentados com dieta equilibrada nutricionalmente, rapidamente melhoram seu peso, no entanto, o peso alcançado após o período de reposição nutricional é inferior ao dos animais controles.

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* parece não ter influenciado de modo marcante o estado nutricional de ambos os grupos, uma vez que os animais infectados apresentaram, quanto à curva ponderal, comportamento semelhante aos seus respectivos controles não infectados. Esses achados estão de acordo com observações realizadas por estudos anteriores (Coutinho et al. 2003; 2007; Silva 2008). Ao se avaliar sobreposição de desnutrição e esquistossomose, os dados demonstram que existem diferenças no peso corporal durante o curso da doença, além do animais apresentarem eriçamento de pêlos e debilidade corporal, comprovando que o estado nutricional do hospedeiro, conservou relação com o modelo de desnutrição imposta e não com a infecção, confirmando também achados anteriores (Coutinho et al. 2003; OLIVEIRA 2004).

Divergindo, Lima et al. (2012) observaram que camundongos esquistossomóticos apresentaram redução da evolução do peso quando comparados aos controles. Cabe ressaltar que Lima et al. (2012), utilizou uma maior carga parasitária (50 cercárias) para a infecção experimental o que pode ter contribuído para a diferença encontrada.

Nesse estudo, a avaliação da carga parasitária dos animais mostrou que o número de vermes machos e fêmeas recuperados foi maior no grupo nutrido quando comparado ao desnutrido ( $p < 0,05$ ). O mesmo se observa quanto ao número de ovos eliminados por g/fezes. As menores cargas parasitárias e ovos liberados nas fezes, detectadas nos grupos desnutridos, estão de acordo com achados anteriores (De Witt, 1957; Magalhães et al 1986). A redução na quantidade absoluta de ovos no grupo desnutrido, talvez decorra de um retardo na oviposição dos parasitos, influenciada pelo estado de desnutrição do hospedeiro (Couto et al., 2002; Ferreira et al., 1998; Tshikuka et al., 1997). No presente estudo, a desnutrição do hospedeiro teve repercussão sobre o crescimento dos animais, sobre a carga parasitária, porém, não houve diferença quanto a viabilidade e a maturação dos ovos de *S. mansoni* em mucosa intestinal.

Em trabalhos experimentais já foi demonstrado que deficiência nutricional altera a imunocompetência e aumenta o risco para doenças infecciosas e

parasitárias, por outro, diretamente influenciado pelas helmintíases, principalmente as intestinais (Scrimshaw and San Giovanni 1997).

O trato gastrointestinal de mamíferos é colonizado por um grande número de micro-organismos comensais e simbióticos referidos coletivamente como, microbiota normal, indígena ou residente (Xu and Gordon, 2003). A colonização bacteriana do intestino é essencial para muitos processos fisiológicos tais como: a manutenção da barreira epitelial intestinal, o desenvolvimento intestinal e a absorção de nutrientes bem como, o desenvolvimento do sistema imune e a defesa contra agentes patogênicos (Sansone, 2004). O intestino delgado de homens e animais contém um ecossistema com elevadas contagens de micro-organismos anaeróbios facultativos e baixas contagens de anaeróbios estritos (Kleessen et al. 2000). De acordo com os nossos dados, a análise da diversidade de bactérias originadas da região média do intestino delgado demonstrou que tanto os animais esquistossomóticos quanto os que sofreram desnutrição pregressa, modificam a microbiota dos camundongos. O aumento do crescimento e rompimento do equilíbrio do ecossistema microbiano contribui para o excessivo crescimento de determinadas bactérias, tornando fator para o processo de translocação bacteriana (Couto et al 2007; 2008).

No nosso estudo a maioria dos micro-organismos foi detectada nas fezes de todos os indivíduos por razões óbvias, alguns membros não foram identificados, possivelmente porque a natureza e a diversidade da população de enterobactérias nos mamíferos variam consideravelmente de indivíduo para indivíduo (Schierck et al., 2007). Na atual investigação foram isolados da microbiota intestinal, uma predominância de bactérias gram-negativas e em menor quantidade as gram-positivas. Entre os gêneros de bactérias gram-negativas foram encontradas: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Yersinia*. Entre os gêneros de gram-positivas: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, as quais na sua maioria, foram descritas em estudos de translocação (Skinn et al. 2007, Silva et al. 2009, Wells et al. 1991). Weber Sobrinho (2012) descreve em seu trabalho vários gêneros e

espécies encontradas, corroborando com os dados aqui expostos, entretanto o mesmo autor trabalhou com animais esplenectomizados e esquistossomóticos.

Nos animais com esquistossomose e desnutridos as alterações na microbiota intestinal poderiam ser explicadas pela imunomodulação, hipotrofia das vilosidades ou possíveis competição entre as espécies bacterianas (Gencay et al 2008; Zanoni et al 2009).

Diversos autores revelam que bactéria da biota intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunocomprometidos, sem outras condições associadas. Provavelmente alterações de cunho imune promove primariamente alterações na microbiota intestinal e translocação de bactérias (Wiest e Rath 2003; Macfie 2004; Janeway et al 2002).

A deposição dos ovos de *S. mansoni* no epitélio intestinal induz a um processo inflamatório com hiperplasia, ulceração e formação de micro abscessos (Chen 1991), além do comprometimento da circulação mesentérica devido à ação mecânica, traumática, irritativa e espoliativa dos vermes adultos que se alimentam de sangue e obstruem os vasos (Katz and Almeida 2003). Vale ressaltar que, na fase crônica da infecção há uma modulação negativa comum do sistema imunológico caracterizado pela resposta do tipo Th2, com contínua eosinofilia, produção de anticorpos e citocinas como IL-5 e IL-10. (Maizels and Yazdanbakhsh 2003). Tais agravos podem predispor a ocorrência de translocação bacteriana e permitir a instalação de sepse (Lima et al 2012).

Simultaneamente, sabe-se que a desnutrição, sobretudo a neonatal, promove diversas alterações intestinais como atrofia de mucosa e diminuição de enzimas intestinais, podendo assim contribuir para alteração na barreira mecânica intestinal e consequente o aumento da permeabilidade intestinal, contribuindo para o risco de translocação bacteriana e septicemia (Ulusoy et al 2003). Perante ao exposto, foi estudado a ocorrência de TB nos camundongos desnutridos e eutróficos, infectados ou não pelo *S. mansoni*.

Segundo Wiest and Rath (2003) o processo de TB pode ocorrer de modo independente de alterações no trato gastrointestinal, sendo chamada de translocação fisiológica, contudo o evento não foi observado no grupo de animais

livres de intervenção, sendo também evidenciado por Oliveira (2013). A ocorrência da TB é definida como a passagem de bactérias viáveis, endotoxina e/ou antígenos a partir do lúmen intestinal para linfonodos mesentéricos e circulação, causando inflamação sistêmica e lesões de órgãos distantes (Balzan 2007). Na atual investigação, houve uma maior ocorrência de TB em camundongos esquistossomóticos, quando comparados aos animais controles sem infecção, em ambos os grupos com e sem intervenção nutricional. Assim, corroborando com os achados de Lima et al (2012) e Weber Sobrinho (2012), ambos os estudos encontraram alta incidência de TB em animais esquistossomóticos na fase crônica, entretanto a variável estado nutricional não foi abordada pelos autores. Sobretudo, os resultados aqui apresentados demonstram que também existe relação entre a TB e camundongos esquistossomóticos desnutridos ( $p < 0,05$ ). A TB pode ocorrer em uma variedade de condições patológicas como desnutrição, imunossupressão e helmintíases (Romond et al 2008, Alverdy et al 2000).

É estabelecido na literatura através de estudos experimentais que a associação da esquistossomose e desnutrição, a última induzida com dieta hipoprotéica, promove danos em vários órgãos e sistemas (Couto et al 2007; 2008). Porém, são escassos os resultados sobre o baixo ganho de peso imposto desnutrição no período crítico do desenvolvimentos dos sistemas fisiológicos atrelado a esquistossomose, sobretudo os danos fisiopatológicos que podem ocorrer na fase crônica da infecção e conseqüentemente o surgimento de processos infecciosos secundário a esquistossomose, como produto da translocação bacteriana. Segundo Carvalho et al. (2008), em qualquer relação ecológica o parasitismo para assegurar seu desenvolvimento e sobrevivência, em alguma fase, retirará sua energia e nutrientes direta ou indiretamente do alimento, de metabólitos e de tecido do hospedeiro. Ainda segundo estes autores, infecção pelo *S. mansoni* se relaciona com várias formas de má-nutrição, embora ainda não esteja completamente esclarecido com que intensidade ela agrava ou provoca estado de desnutrição no homem. Nos resultados do presente estudo e de acordo com as doenças crônicas, camundongos esquistossomóticos apresentaram grande número de TB em órgãos e tecidos quando comparados aos controles.

No presente estudo comparado ao grupo controle, observou-se associação entre esquistossomose e desnutrição e esses animais apresentaram uma maior frequência de TB. Foi isolado nas amostras teciduais bactérias entéricas, sendo estas de 10 espécies da família *Enterobacteriaceae*, *Enterococos* e 2 linhagens do gênero *Staphylococcus*. Observou-se que a maior parte dos animais infectados e desnutridos, apresentou translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos, destacando-se a prevalência de infecção por *S. liquefaciens* e *E. coli*. Corroborando com os dados apresentados por Ferraz et al. (2005) que sugere a presença de bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter calcoaceticus*, em linfonodos mesentéricos como consequência da TB fato que pode desempenhar papel no desenvolvimento de complicações infecciosas, principalmente em pacientes esquistossomóticos. Vale ressaltar que houve TB ainda no grupo DI para o sangue porta, fígado, baço e sangue periférico e as bactérias mais prevalentes foram as gram-negativas do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus* e o bacilo não fermentador, *Pseudomonas*, entre as gram-positivas, *Staphylococcus* e *Enterococcus*. Um fato importante é que o trato intestinal dos roedores é colonizado por uma microbiota bastante estruturada. É característica destes animais a resistência a diferentes bactérias gram-negativas. No entanto, o elevado número de camundongos colonizados e infectados por *E. coli*, em todos os grupos e particularmente, nos animais desnutridos, pode ser justificado por ser a mais populosa dentre as bactérias da diversidade intestinal em murinos (Bleich et al. 2012).

Goldani et al. (2005) descreveram relato de caso de paciente com esquistossomose mansônica crônica que desenvolveu recorrentes abscessos piogênicos no fígado devido a *Pseudomonas aeruginosa*. Em pacientes com esquistossomose, a frequência de infecções secundárias por *Staphylococcus aureus* não é incomum. Outro estudo descreveu um caso de um paciente que desenvolveu abscesso hepático por *S. aureus* associado à esquistossomose, e sugeriram que a lesão hepática pode ter facilitado à instalação de infecções secundárias. (Graham e Orr 1950).

Nos nossos resultados, os animais esquistossomóticos que sofreram privação protéica durante o período crítico do desenvolvimento, apresentou uma mudança no padrão arquitetural e funcional do intestino delgado, quando comparado aos animais que não sofreram privação protéica e sem infecção. A redução do ganho de peso na desnutrição tem sido relacionada a alterações funcionais e morfológicas principalmente, no pâncreas e epitélio entérico que comprometem a digestão e absorção de nutrientes (Torun & Chew, 1994). Dessa forma, a ingestão inadequada de proteínas retarda o crescimento e pode levar o organismo a ter redução do aproveitamento alimentar (Manzano, 2001; Marcondes, 1976).

Sugere-se que a desnutrição promoveu alteração na organogênese do epitelial intestinal, tal dado é reforçado pela modificação do padrão arquitetural quando comparamos os animais NNI e DNI ( $p < 0,05$ ). Sob diversas condições nutricionais e patológicas, o intestino pode sofrer atrofia, comprometendo suas funções essenciais (Baracos Samuels e Adegoke 2000). Entre as alterações patológicas mais frequentemente discutidas como causa de defeito na barreira intestinal, a atrofia da mucosa é a mais frequente (D'Acampora et al. 2004). Brewster et al (1997) demonstra a influência da atrofia de mucosa intestinal como causa de translocação bacteriana. O mesmo autor concluiu que a atrofia das vilosidades e o aumento da celularidade na lâmina própria, encontrados nas biópsias de pacientes desnutridos, estavam diretamente relacionados com um maior índice de translocação bacteriana e conseqüentemente de sepse.

Quando da presença da infecção por *S. mansoni* reafirmamos a interferência da nutrição, pois as alterações morfológicas observadas no grupo dos animais desnutridos foram mais severas quando comparadas aos animais nutridos. Em trabalhos experimentais, Coutinho et al. (1997, 2003, 2007) têm demonstrado que o estado nutricional pode contribuir para alterações no trato gastrointestinal na fase crônica da esquistossomose. A intensidade do processo inflamatório nos granulomas foi menor nos animais esquistossomóticos que sofreram intervenção nutricional durante a lactação. Esses dados corroboram com achados de outros estudos (Magalhães et al 1986; Coutinho et al 1997; 2003).

Lima et al (2012) estudou translocação bacteriana na fase crônica da esquistossomose e observou uma redução na altura e área da vilosidade em animais esquistossomóticos, divergindo dos achados do presente estudo.

A desnutrição neonatal em camundongos provocou modificações na resposta imune quando infectados por *S. mansoni*, promovendo uma maior ocorrência de translocação bacteriana. A associação da esquistossomose e desnutrição neonatal promoveu alteração na microbiota intestinal e no padrão arquitetural e funcional do intestino delgado. Novos trabalhos são necessários para esclarecer quais são os mecanismos celulares e moleculares ligados ao processo de TB a serem observados em animais que sofreram desnutrição neonatal seguida de reposição nutricional e na vida adulta, a associação com doenças parasitárias.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Madruga Lima Ribeiro, veterinária responsável pelo Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE, por sua grande colaboração durante a realização desse trabalho.

### **Referências**

- Baracos VE, Samuels SE, Adegoke OAJ. (2000) Anabolic and catabolic mediators of intestinal protein turnover: a new experimental approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 3(3): 183-9.
- Barros, A. F. (2008) Resposta imune humoral e patologia hepática de camundongos desnutridos infectados com *Schistosoma mansoni*. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- Bisso LM. Modelo Murino de inflamação intestinal crônica: Avaliação quantitativa da dinâmica da microbiota intestinal (Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal Fluminense) Rio de Janeiro, 2008.
- Brewster D, Manary M, Menzies I, O'Loughlin EV, Henry RL. (1997) Intestinal permeability in kwashiorkor. *Arch Dis Child*, 76(3): 236-41.
- Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. (2008) *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Chen, M.G. (1991) Relative distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in the intestine of man: a subject of inconsistency. *Acta Trop*, 48, 163-171.
- Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, Castro CMMB (2012) Desnutrição neonatal e produção de IFN- $\gamma$  IL-12 e IL-10 por macrófagos/ linfócitos: estudo

- da infecção celular, *in vitro*, por *Staphylococcus aureus* metilina sensível e metilina resistente. Rev Nutr 25(5): 607-619.
- Coutinho EM et al. (2003) Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 98: 919–925.
- Coutinho EM, Freitas LPCG, Abath FGC (1992) The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 25: 13-20.
- Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araujo RE, Oliveira SA, Luna CF, Barbosa- Jr AA, Andrade ZA (2007) Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. Acta Tropica, 101(1): 15–24.
- Coutinho, A.M.C. (2001) Hipoalbuminemia en diálisi: es marcador de desnutrición o de inflamación? La Revista de Investigación Clínica, Mexico, v.53, n.2, p.152-8.
- Coutinho, E. M. (2004) Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, p. 85 – 92.
- Coutinho, E. M. et al. (1972) Inquérito clínico- nutricional e antropométrico preliminar, em áreas endêmicas de esquistossomose mansoniana, no nordeste do Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília, v. 6, p. 211 – 236.
- Coutinho, E. M. et al. (1997) Pathogenesis of schistosomal “pipestem” fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. Int. J. Exp. Pathol., Oxford., v. 78, p. 337 – 342.
- Coutinho, E. M. et al. (2003) Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, p. 919 – 925.
- Coutinho, E. M. et al. (2007) Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. Acta Trop., Basel, v. 101, p. 15 – 24.
- Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Machado SS, Ferreira HS. (2008) Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Rev Soc Bras Med Trop; 41: 390-393.
- Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Rocha DB, Ferreira HS. (2007) Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. Rev Pat Trop; 36: 54-66.
- Couto, J. L. A. et al. (2002) Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. Rev. Soc. Bras. Med.Trop., Brasília, v. 35, p. 601 – 607.
- D'Acampora, AJ; Ortellad, DK; Carvalho, ROM; Serafim, JDM; Farias, DC; Tramonte,R. (2004) Armando José et al. Atrofia mucosa/translocação bacteriana na sepse experimental em ratos Wistar. Acta Cir. Bras., vol.19, n.5, pp. 478-486.
- De Witt, WB. (1957) Experimental schistosomiasis mansoni in mice maintained on nutritionally deficient diet. Journal of Parasitology. 42(2): 129-135.
- De-Souza DA, Greene LJ. (2005) Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine. Crit Care Med.; 33(5): 1125-35.
- Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM (2003) Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa Surgery, 133(1): 601-607.

- Fallon PG (2000) Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology Today* 21(1): 29-35.
- Ferraz AAB, Campos JM, Araújo Júnior JGC, Albuquerque AC, Ferraz EM (2005) Gut Bacterial Translocation and Postoperative Infections: A Prospective Study in Schistosomal Patients. *Surg Infect* 6: 197-201.
- Ferreira, H. S. et al. (1998) A long-term intake of a protein hydrolysate seems to increase the risk of encephalopathy in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 93, p. 199 – 203.
- Goldani LZ, Santos RP, Sugar AM. (2005) Pyogenic liver abscess in patients with Schistosomiasis mansoni. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 99: 932-6.
- Graham JG, Orr JL. (1950) Hepatic abscess associated with visceral schistosomiasis. *Lancet*; 1: 714-716.
- Guzmánsilva MA, Wanderley AR, Macêdo VM, Boaventura GT. (2004) Recuperação da desnutrição em ratos mediante rações adicionadas ou não de suplemento alimentar e de vitaminas e minerais durante o período de crescimento. *Rev Nutr.*; 17(1): 5969.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shomchik M. (2002) *Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença*. 5rd ed. ARTMED, Porto Alegre.
- Katz N, Almeida K (2003) Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult* 55(1): 38-43.
- Kleessen B, Bezirtzoglou E, Matto J.(2000) Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human digestório microflora. *Microbiol Ecol Health Dis*; 2: 53-63.
- Lima KM, Aires AL, Lucena LRR, Almeida TM, Albuquerque MCPA, Castro CMMB (2012) Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. *Acta Gastroenterol Latinoam* 42:309-320.
- Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCP, Bonomo LT, Denolato ATA, Reis AM, Moura EG (2006) Leptin and Prolactin, but not corticosterone, Modulate Body Weight and Thyroid function in Protein-Malnourished Lactating rats. *Horm Metab Res* 38:1-5.
- Macfie J. (2004) Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br Med Bull*; 71: 1-11.
- Magalhães, LA; Guaraldo, AMA; Zanoti-Magalhães, EM; Alcantara, FG. (1986) Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. *Ver Saúde Pública São Paulo*. 20(5): 362-368.
- Maizels, R. M.; Yazdanbakhsh, M. (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. London. v. 3, n. 9, v. 733-744.
- Marcondes, E. (1976) *Desnutrição*. São Paulo: Savier.
- Melo JF, Macedo EMC, Silva RPP, Viana MT, Silva WTS, Castro CMMB (2008) Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. *Rev Nutr* 21(6):683-694.
- Moura EG, Passos MCF (2005) Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* 25(3/4): 251-269

- Moura EG, Santos RF, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes AT, Oliveira E, Passos MC (2008) Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats – the role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res* 40(1): 1-7.
- Oliveira, S. A. et al. (2004) Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.*, Berlin, v. 93, p. 30 – 35.
- Oliveira, DC. (2013) Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana: estudos dos aspectos imunológicos em camundongos submetidos à desnutrição neonatal. (Dissertação). Universidade Federal de Pernambuco.
- Pearce EJ, MacDonald AS (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews* 2: 499-511.
- Pordeus, L.C; Aguiar, L.R; Quimino, L.R.M; Barbosa, C.S. (2008) A ocorrência das formas agudas e crônicas da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 17(3) p. 163-17.
- Porto SMMS, Araújo FRG, Melo JF, Silva RR, Silva KMF, Castro CMMB (2007) Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco* 51(1): 59-65.
- Scrimshaw NS, San Giovanni JP (1997) Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 66(2): 464S-477S.
- Silva FL (2009) Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni*. Dissertation. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil.
- Torun, B.; Chew, F. (1994) Protein energy malnutrition. In: Shils, M.E.; Olson, J.A.; Hike, M. *Modern nutrition in health and disease*. 8th ed. Philadelphia,: Lea & Febiger, p.950-76.
- Tshikuka, J. G. et al. (1997) Relationship of childhood protein-energy malnutrition and parasite infectious in an urban African setting. *Trop. Med. Int. Health*, Oxford, v. 2, p. 374 – 382.
- Ulusoy H, Usul H, Aydin S, Kaklikkaya N, Cobanoglu U, Reis A, Akyol A, Ozen I (2003) Effects of immunonutrition on intestinal mucosal apoptosis, mucosal atrophy, and bacterial translocation in head injured rats. *Journal of Clinical Neuroscience* 10(5): 596-601.
- Weber Sobrinho CR (2012) Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana/sepsis: perfil de citocinas na infecção crônica em camundongos submetidos à esplenectomia. Thesis. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Wiest R, Rath HC (2003) Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 397-425.
- Yolles, T.K.; Moore, D.V.; De Giusti, D.L.; Ripson, C.A.; Meleney, H.E. (1947). A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. *J. Parasit.* 33, 419-26.

## 7- CONCLUSÕES

---

- ✓ Houve uma maior ocorrência de translocação bacteriana em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, submetidos ou não à desnutrição.
- ✓ Houve uma maior ocorrência de translocação bacteriana em camundongos desnutridos, porém o sexo não foi um fator de risco para ocorrência de translocação bacteriana.
- ✓ Existiu à maior ocorrência de translocação bacteriana em camundongos desnutridos infectados pelo *S. mansoni*, comparados aos infectados nutrido.
- ✓ Camundongos desnutridos e esquistossomóticos apresentaram maior prevalência de coproculturas positivas, tanto com relação à densidade bacteriana por espécies quanto ao número de UFC.
- ✓ A análise morfométrica duodenal revelou aumento na altura e área das vilosidades nutridos e parasitados com *S. mansoni*, quando comparados aos respectivos controles. Entre os grupos de animais sem infecção, houve um aumento da altura das vilosidades nos animais desnutridos, quando comparado ao respectivo controle.
- ✓ Houve translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos nos animais esquistossomóticos, sendo mais prevalente em animais que sofreram desnutrição neonatal. Na translocação para sangue porta, fígado, baço e sangue periférico, os grupos dos animais parasitados apresentaram bactérias nestas amostras teciduais, sendo mais assinalado nos desnutridos. Os animais que sofreram desnutrição neonatal e sem infecção, apresentaram translocação para linfonodos mesentéricos, sangue porta e fígado.

## REFERÊNCIAS

---

ALEXANDER JW, BOYCE ST, BABCOCK GF. The process of microbial translocation. **Annals of Surgery**, 1990; v. 212, p. 496-510.

ALVES-OLIVEIRA LF, MORENO EC, GAZZINELLI G, MARTINS-FILHO OA, SILVEIRA AMS, GAZZINELLI A, et al. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infect. Immun.** 2006.

ANDRADE, Z. A.; WARREN, K. S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Londres**, 1964; v. 58, p. 53- 57.

ARAÚJO KC, RESENDES APC, SOUZA-SANTOS R, SILVEIRA-JÚNIOR JC, BARBOSA CS. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Cad. Saúde Pública**. 2007.

ASSIS AM, BARRETO ML, PRADO MS, REIS MG, PARRAGA IM, BLANTON RE. 1998. Schistosoma mansoni infection and nutritional status in schoolchildren: a randomized, double-blind trial in Northeastern Brazil. **Am J Clin Nutr**, 1998; 68: 1247-1253.

ATINMO T, MIRMIRAN P, OYEWOLE OE, BELAHSEN R, SERRA-MAJEM L. Breaking the poverty/malnutrition cycle in Africa and the Middle East. **Nutr Ver.**,2009 ; 67: 40-46.

BARBOSA CS, ARAUJO K, FAVRE TC, PIERI OS. Spacial distribution of schistosomiasis foci in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Insituto Oswaldo Cruz**, 2004; v. 99, p.79-83.

BARBOSA CS. Epidemiology and anthropology: an integrated approach dealing with bio-socio-cultural aspects as strategy for the control of endemic diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 1998. vol.93, suppl.1, pp. 59-62.

BARBOSA F.H.F.; MARTINS F.S.; BARBOSA L.P.J.L.; NICOLI J.R. Microbiota indígena do trato digestório. **Rev. Biol. Ciênc da Terra**, 2010; 10, 78-93.

BARBOSA FS, COIMBRA JÚNIOR CE. **Alternative approaches in schistosomiasis control**, 1992; Mem. Inst. Oswaldo Cruz. vol.87, suppl.4, pp. 215-220.

BARBOSA JR., A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **Jornal Brasileiro de Patologia, Rio de Janeiro**, 2001; v. 37, p. 197-200.

BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A.L.C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S.M.L.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B; MORAES, C.N.L.; SPINELLI, V. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 2001; v. 17, p.725-728.

BARRETO ML. Geographical and socioeconomic factors relating to the distribution of *Schistosoma mansoni* infection in an urban area of north-east Brazil. **Bull. World Health Organ**, 1991; 69(1):93-102.

BATISTA FILHO, M. & BARBOSA, N. de P. Pró- memória: alimentação e nutrição no Brasil,1974-1984. Brasília. Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição**, 1985.

BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, 1995; v. 3, p. 149-54.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Ann Nutr Metab**, 1998; v. 42, p. 367-73.

BOURLIOUX P, KOLETZKO B, GUARNER F, BRAESCO V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine", held in Paris, June 91 14, 2002. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 2003; v. 78, p. 675-683.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annalytical Biochemistry**, 1976; v. 72, p. 248-254, Orlando.

BRANDTZAEG, P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. **Nutr. Rev.**, 1998; v. 56, S5-S18.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: **plano de ação 2011-2015** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. – 1. ed., 1. reimpr., 2013; Brasília : Ministério da Saúde.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Esquistossomose. Brasília, DF, 2006.

BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Notificação de Agravos**. Esquistossomose. Brasília, DF, 2011.

BROWN, JL e POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. **Scientific American**, 1996; v.2, p: 38-43.

BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutr Rev.**, 2000; v. 58, p. 1-4.

CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LFA, SILVEIRA AMS, OLIVEIRA RC, GAZZINELLI G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop.** 2008.

CAMELO, J.R.J.S., MARTINEZ, F.E.; Dilemas nutricionais no pré-termo extremo e repercussões na infância, adolescência e vida adulta. **J.Pediatr**, 2005; v.81, n.1.

CARVALHO E.M.; BACELLAR O.; BROWNELL C.; REGIS T.; COFFMAN R.L.; REED S.G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, 1994; v. 152, p. 5949-5956.

CARVALHO E.M.F. et al. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole? **Cadernos de Saúde Pública**, 1998; v.14, p. 787-795.

CASAPÍA M, JOSEPH SA, NÚÑEZ C, RAHME E, GYORKOS TW. Parasite and maternal risk factors for malnutrition in preschool-age children in Belen, Peru using the new WHO Child Growth Standards. **Br J Nutr**, 2007; 98: 1259-1266.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, 1997; v. 66(2), p. 460S-463S.

CHEEVER, A.W.; HOFFMANN, K.F.; WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, 2000; v. 21, n. 9, p. 465-6.

COURA, J.R.; AMARAL R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2004; v.99, p.13-19.

COURA-FILHO P. Uso do paradigma de risco para a esquistossomose em áreas endêmicas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**. 1994.

COUTINHO, E. M. et al. Pathogenesis of schistosomal “ pipestem” fibrosis: a lowprotein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. **International Journal for Parasitology**, 1997; v. 78, p. 337-342.

COUTINHO, E. M. et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Tropica**, 2007; Basel, v. 101, n. 1, p. 15–24.

COUTINHO, E. M. Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, out. 2004; v. 99, p. 85-92, Rio de Janeiro.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, jan./mar. 1992; n.25, p. 13 – 20, Brasília.

COUTINHO, E.M. *et al.* Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2003; v. 98, p. 919–925, Rio de Janeiro.

CROMPTON DW, NESHEIM MC. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. **Ann Rev Nutr**, 2002; 22: 35-59.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D.F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 2005. v.115, p. 1119-1128.

DE SOUZA, D. A., GREENE, L. J. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: Effect of glutamine. **Critical Care Medicine**. 2005; v.33, p.1125 – 1135.

DESAI M, CROWTHER N, OZANNE SE, LUCAS A, HALES CN. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. **Biochem Soc Trans**, 2000; 23: 331-335.

DOMINGUES, A.L.C.; DOMINGUES, L.A.W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed). **Esquistossomose mansônica**, 1994; Recife: Ed. Universitária da UFPE, cap. 5, p. 91-105.

DUNNE C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. **Inflammatory Bowel Disease**, 2001; v. 7, p. 136-145.

DWINELL, M.B.; JOHANESSEN, P.A.; SMITH, J.M. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. **Surgery**, 2003; v. 133, n.1, p. 601-7.

EMERY PW. Metabolic changes in malnutrition. **Eye**, 2005; 19: 1029–1034.

ENK, M. J.; AMARAL, G. L.; COSTA E SILVA, M. F.; SILVEIRA-LEMOS, D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, G.; COELHO, P. M.; MASSARA, C. L. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Jul. 2010; v. 105, n. 4, p.537-540.

ENK, M.; LIMA, A. C.; BARROS HDA, S.; MASSARA, C. L.; COELHO, P. M.; SCHALL, V. T. Factors related to transmission of and infection with *Schistosoma mansoni* in a village in the South-eastern Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Jul. 2010; Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 570-577.

FAGUNDES AT, MOURA EG, PASSOS MC, OLIVEIRA E, TOSTE FP, BONOMO IT, TREVENZOLI IH, GARCIA RM, LISBOA PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. **Br J Nutr**, 2007; 98(5): 922-928.

FALLON, P.G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, 2000; v. 21, n. 1, p. 29-35.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação). **Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional na América Latina e Caribe**, 2013; Roma.

FENWICK, A. Waterborne infectious diseases-could they e consigned to history? **Science, United States**, 2006; aug., v. 313, n. 5790, p. 1077-1081.

FERRARIS RP & CAREY HV . Intestinal transport during fasting and malnutrition. **Annu. Rev Nutr**, 2000; 20:195–219.

FERRAZ A.A.B.; SANTOS JUNIOR M.A.; MATHIAS C.A.; MAGALHÃES M.; BARCELAR T.; FERRAZ E.M. Modelo de Peritonite Experimental Em Camundongos Esquistossomoticos. **Acta Cir Bras.**, 1993; v. 8, n. 1, p.28-31.

FERRAZ, A.A.B.; CAMPOS, J.M.; ARAÚJO JÚNIOR, J.G.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; FERRAZ, E.M. Gut Bacterial Translocation and Postoperative Infections: A Prospective Study in Schistosomotic Patients. **Surgical Infections.**, 2005; v. 6, n. 2, p.197-201.

FERRAZ, A.A.B.; SANTOS JUNIOR, M.A.; MATHIAS, C.A.; MAGALHÃES M.; BARCELAR T.; FERRAZ E.M. Modelo de peritonite experimental em camundongos esquistossomóticos. **Acta Cir. Bras**, 1993; 8, 28-31.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Rev Patol Trop.**, 2007; Goiânia. v. 36, n. 1, p. 67-74.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, 2007; v.36, n. 1, p. 67-74.

FISHBECK, K.L., RASMUSSEN, K.M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. **Journal of Nutrition, Bethesda**, 1987; v.117, n.11, p: 1967-1975.

GABELE, E.; BRENNER, D. A.; RIPPE, R. A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. **Front. Biosci., Tampa F.L.**, 2003; v. 8, p. 69 - 77.

GAZZINELLI A, GAZZINELLI MF, CADETE MM, PENA FILHO S, SÁ IR, KLOOS H. Sociocultural aspects of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Cad Saude Publica.** 1998.

GAZZINELLI A, VELASQUEZ-MELENDEZ G, CRAWFORD SB, LOVERDE PT, CORREA-OLIVEIRA R, KLOOS H. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. **Acta Trop.** 2006.

GAZZINELLI MF, REIS DCD, KLOOS H, VELÁSQUEZ-MELENDEZ G, DUTRA IR, GAZZINELLI A. The impact of two education methods on knowledge of schistosomiasis transmission and prevention among schoolchildren in a rural community in northern Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2006.

GENCAY, C.; KILICOGLU, S.S.; KISMET, K.; KILICOGLU, B.; EREL, S.; MURATOGLU, S.; SUNAY, A.E.; ERDEMLI, E.; AKKUS, M.A. Effect of honey on bacterial translocation and intestinal morphology in obstructive jaundice. **World J Gastroenterol**, 2008; 14(21), 3410-5.

GODFREY KM, BARKER DJ 2000. Fetal nutrition and adult disease. **Am J Clin Nutr**, 2000; 71: 1344-1352.

GUEDES, R.C.A.; MELO, A.P.R.; TEODÓSIO, N.R. Nutrição adequada: a base do funcionamento cerebral. **Cienc. Cult.**, 2004; v.56, n.1.

GUIMARÃES RJPS, FREITAS CC, DUTRA LV, MOURA ACM, AMARAL RS, DRUMMOND SC, et al. Analysis and estimative of schistosomiasis prevalence for the state of Minas Gerais, Brazil, using multiple regression with social and environmental spatial data. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Set, 2006; 101 Suppl 1:91-96.

HARKNESS, J.E. Biologia e manejo. In Biologia clínica de coelhos e roedores. **Roca**, 1993; v.2, p: 9-55.

HESS JF, HEY PJ, CHEN TB, O'BRIEN J, OMALLEY SS, PETTIBONE DJ, CHANG RSL. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. **Journal of Biological Chemistry**, 2001; v. 382, p.123-129.

HODGES K & GILL R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, 2010; 11: 4-21.

HUGHES S, KELLY P. Interactions of malnutrition and immune impairment with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunol**, 2006; 28: 577-588.

JANEWAY C.A.; TRAVERS P.; WALPORT M.; SHOMCHIK M. **Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença**. 5º ed. ARTMED, Porto Alegre, 2002.

JARDIM-BOTELHO A, BROOKER S, GEIGER SM, FLEMING F, SOUZA LOPES AC, DIEMERT DJ, CORRÊA-OLIVEIRA R, BETHONY JM. Age patterns in undernutrition and helminth infection in a rural area of Brazil: associations with ascariasis and hookworm. **Trop Med Int Health**, 2008; 13: 458-467.

JEPSON MA, CLARK MA. Studying M cells and their role in infection. **Trends in Microbiology**, 1998; v. 6, p. 359-365.

JESUS, AR et al. Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection determined by ultrasound in an endemic area of Brazil, Caatinga do Moura. **Am J Trop Med Hyg**, 2000; v. 63, n 1-2 p. 1-4.

KATZ N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansônica. *Rev Soc. Bras Med Trop*, 1999; v. 32, v.705-711.

KATZ N.; ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, 2003; v. 55, n. 1, p. 38-43.

KATZ N.; PEIXOTO S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansônica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2000; v. 33, n. 3, p. 303-308.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do instituto de medicina tropical de sao Paulo**, 1972; v.14, p. 397-402.

LAMBERTUCCI J.R.; TEIXEIRA R.; NAVARRO M.M.M.; COELHO P.M.Z.; FERREIRA M.D. Liver abscess and schistosomiasis: A new association. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1990; v. 23, p.239-240.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, 2000; v. 77, p. 101-109.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. Esquistossomose mansônica. In: Coura J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005; v. 1, cap 76, p. 931-946.

LENZI HL, JURBERG AD, COELHO PMZ, LENZI JA. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* do hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, Coelho PMZ,

Lenzi HL, organizadores. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose uma visão multidisciplinar**, 2008; 1 ed. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ.

LIMA MF, COSTA I, ROCHA RS, MAGALHÃES MH, KATZ N. Um modelo hierárquico de análise das variáveis sócio-econômicas e dos padrões de contatos com águas associados à forma hepatoesplênica da esquistossomose. **Cad. Saúde Pública**, 1994; 10(supl 2):241–253.

LIMA, K.M.; AIRES, A.L.; LUCENA, L.R.R.; ALMEIDA, T.M.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; CASTRO, C.M.M.B. Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. **Acta Gastroenterol Latinoam**, 2012; v. 42, p. 309-320.

LISBOA PC, FAGUNDES AT, DENOLATO AT, OLIVEIRA E, BONOMO IT, ALVES SB, CURTY FH, PASSOS MC, MOURA EG. Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. **Exp Biol Med**, 2008; 233(1): 57-63.

MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. **Br. Med. Bull**, 2004; v. 71, p. 1-11.

MACFIE, J. Enteral Versus Parenteral Nutrition: the significance of bacterial translocation and gut-barrier function. **Nutrition**, 2000; v. 16, p. 606-611.

MATTOS A.A.; CORAL G.P.; MENTI E.; VALIATTI F.B.; KRAMER C. Infecção bacteriana no paciente cirrótico. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2003; v. 40, n. 1, p. 11-15.

MCFARLAND LV. Normal flora: diversity and functions. **Microb Ecol Health Dis**, 2000; 12: 193- 207. **Medical Bulletin**, 2004; 71: 1-11.

MEIRA, D.A. Interaction of infection, nutrition and immunity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1995; n. 28, p. 315 – 319, Brasília.

MELO, J. F. De. **Atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos submetidos à desnutrição neonatal**. [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2007

MESQUITA GV, BRANDT CT, SANTOS SM, MARICEVICH JPBR. Avaliação de pacientes esquistossomóticos quanto ao conteúdo mineral ósseo, nível de magnésio corporal total e atividade da enzima Lecitina-Colesterol-Acetiltransferase em pós-esplenectomizados com auto-implante esplênico. **Rev Bras Ortop**, 2004; 39: 49-58.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundo Nacional de Saúde aos Fundos de Saúde dos Municípios com alta carga da doença para implantação, implementação de ações contingenciais de vigilância,

prevenção e controle da hanseníase e esquistossomose, como problemas de saúde pública. **Portaria nº 3.097**, Dez, 16. 2013.

MORGAN, G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence? **The Lancet.**, 1997; v. 349, p.1693-1695.

MORGANE, P.J. Malnutrition and the development of the brain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 1993; v.17, p: 91-128.

MOURA EG, LISBOA PC, CUSTÓDIO CM, NUNES MT, SOUZA KP, PASSOS MCF. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and adulthood. **J Nutr Biochem**, 2007; 18: 134-139.

MOZA PG, PIERI OS, BARBOSA CS, REY L. Fatores sócio-demográficos e comportamentais relacionados à esquistossomose em uma agrovila da zona canavieira de Pernambuco, Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, 1998; 1;14(1).

MUNIZ PT, FERREIRA UM, FERREIRA CS, CONDE WL, MONTEIRO CA. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalence, temporal trends and associations with physical growth. **Ann Trop Med Parasitol**, 2002; 96: 503-512.

MWATHA J.K.; KIMANI G.; KAMAU T.; MBUGUA G.G.; OUMA J.H.; MUMO J.; FULFORD A.J.; JONES BUTTERWORTH A.E.; ROBERTS M.B.; DUNNE D.W. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, 1998; v. 160, n. 4, 1992-9.

NAABER, P.; SMIDT, I.; TAMME, K.; LIIGANT, A.; TAPFER, H.; MIKELSAAR, M.; TALVIK, R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. **J Med Microbiol**, 2000; v. 1, n. 49, p. 431-439, May.

NICOLI JR. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin**, 1995; v. 15, p. 183-190.

NIKITENKO, V.I.; STADNIKOV, A.A.; KOPYLOV, V.A. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract in healthy and injured rats. **J. Wound Care**, 2011; 20(3), 114-22.

NISHIOKA, S.A.; FERREIRA, M.S.; BURGARELLI, M.K.N. *Serratia marcescens* bacteremia associated with schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 1992; SP, v. 25, n. 3, p. 191-193.

OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research.**, Mar. 2004; Berlin, v. 93, p. 30- 35.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S.mansoni*. **Journal of Parasitology**, 1952 v. 38, p. 19–23.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Resolução CD49.R19/2009**: Eliminação de doenças negligenciadas e outras infecções relacionadas à pobreza.

PARRAGA IM, ASSIS AM, PRADO MS, BARRETO ML, REIS MG, KING CH, BLANTON RE. 1996. Gender differences in growth of school-aged children with schistosomiasis and geohelminth infection. **Am J Trop Med Hyg**, 1996; 55: 150-156.

PASSOS MCF, RAMOS CF, MOURA EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body Weight of offspring. **Nutrition Research**, 2000; 20: 1603-1612.

PASSOS MCF, VICENTE LL, LISBOA PC, MOURA EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult animals whose mothers were malnourished during lactation. **Horm Metab Res**, 2004; 36: 625–629.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, 2002; v. 2, p. 499-511.

PEARCE, EJ, CASPAR, P, GRZYCH, JM, LEWIS, FA, SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, 1991; v.173, p.159-166.

PEREIRA, K.N.F.; VITORIANO, I.L.S.; MELO, M.P.P; ARAGÃO, R.S.; TOSCANO, A.E.; SILVA, H.J.; DE CASTRO, R.M.; Effects of malnutrition and/or neonatal inhibition of serotonin reuptake in neuromuscular development of the gastrointestinal tract: review of literature; **Neurobiologia**, 2009; v.72, n.2.

PESSOA G.V.A.; SILVA E.A.M. Milieu pour l'identification presumptive rapide das enterobactérias, des Aeromonas et des vibrions. **Ann Microbiol.**, 1974; v. 125<sup>a</sup>, p.341-7.

PORDEUS, L.C; AGUIAR, L.R; QUIMINO, L.R.M; BARBOSA, C.S. A ocorrência das formas agudas e crônicas da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 2008; 17(3) p. 163-17.

PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: VERONESI R; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia São Paulo: Ed. Atheneu**, 1997. v. 2, p. 1354 - 1372.

QUEIROS-SANTOS, A. **Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos**. [Dissertação de Mestrado]. Univ. Federal de Pernambuco. Recife, 2000.

REY, L. **Parasitologia**. Cap. Schistosoma Mansonii e Esquistossomose: A Doença, p. 351, 2008.

ROUQUAYROL MZ, ALMEIDA FILHO N. Epidemiologia e Saúde, 6 ed, **MEDSI**, 2003; 728 p.

RUNDLES C.; LIN D.H. Nutrition and the immune system of the gut. **Nutrition**, 1998; v.14, p.573-579.

SANTHIAGO, V.; DA SILVA, A.S.R.; GOBATO, C.A.; DE MELLO, M.A.R. Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. **Rev Bras Med Esporte**, 2006; v.12. n. 2, Mar/Abr.

SCHLEGEL, L.; COUDRAY-LUCAS, C.; BARBUT, F.; BOUSCHER, J.L.; JARDEL, A.; ZARRABIAN, S.; CYNOBER, L. Bacterial dissemination and metabolic changes in rats induced by endotoxemia following intestinal E. coli Overgrowth are reduced by ornithine  $\alpha$ -ketoglutarate administration. **Journal of Nutrition**, 2000; v. 130, p. 2897-2902.

SILVA, F. L. **Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com Schistosoma mansoni**. (Dissertação - mestrado em saúde pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 115 p, 2008.

STANDEN, D. The effect of temperature light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1952; v.45, p.225-24.

STEINBERG, S.M. Bacterial translocation: what it is what it is not. **The American Journal of Surgery**, 2003; v. 186, p. 301-306.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, United States, jul. 2006; v. 6, n. 7, p. 411-425.

STEPHENSON LS, LATHAM MC, OTTESEN EA. Malnutrition and parasitic helminth infections. **Parasitology**, 2000; 121, (Suppl.): S23-S38.

STRAUSS E.; CALLY W.R. Peritonite bacteriana espontânea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003; v. 36, n.6, p.711-717.

TEIXEIRA R, COELHO PMZ, ANJOS JM, FILHO GB, JÚNIOR GMA, SERUFO JC et al. Abscesso piogênico do fígado associado à esquistossomose mansônica experimental: I. A importância do ovo de *S. mansoni* na gênese do abscesso. **Rev Soc Bras Med Trop**, 1995; 28: 106.

TEIXEIRA RS, BINA JC, BARRETO SH. Bacterial infection of long duration due to genus *Escherichia* in a patient with *Schistosoma mansoni*. **Revista Médica da Bahia**, 1976; 22: 70-74.

TRAMONTE R.; CARVALHO R.O.M.; FARIAS D.C.; SERAFIM J.D.M.; ORTELLADO D.K.; D'ACAMPORA A.J. Alterations of intestinal mucosa in rats: morphometric study in three kinds of treatment after experimental acute abdominal sepsis induction. **Acta Cir Bras**, 2004; v. 19, n.2.

UCHOA E, BARRETO SM, FIRMO JO, GUERRA HL, PIMENTA FG, LIMA E COSTA MF. The control of schistosomiasis in Brazil: an ethnoepidemiological study of the effectiveness of a community mobilization program for health education. **Soc Sci Med**, 2000; Nov; 51(10):1529-1541.

VAN DER WAAIJ D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. **Annual Review of Microbiology**, 1989; v. 43, p. 67-87.

VICENTE LL, MOURA EG, LISBOA PC, COSTA AMA, AMADEU T, MANDARIM-DE-LACERDA CA, PASSOS MCF. Malnutrition during lactation is associated with higher expression of leptin receptor in pituitary of the adult offspring. **Nutritio**, 2004; 20: 924-928.

VICKERS MH, IKENASIO BA, BREIER BH. IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. **Endocrinol**, 2001; 142, 3964-3973.

WADE, S. et al. Early nutritional experiments: effects on the humoral and cellular immune responses in mice. **J Nutr.**, 1983; v. 113, n.6, p. 1131 – 1139.

WEBER SOBRINHO, C.R. Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana/sepsis: perfil de citocinas na infecção crônica em camundongos submetidos à esplenectomia. **Tese**. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. 2012.

WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, 2003; v. 17, p. 397-425.

WILLIAMS M.E.; MONTENEGRO S.; DOMINGUES A.L.; WYNN T.A; TEIXEIRA K.; MAHANTY S.; COUTINHO A.; SHER A. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, 1994; v. 170, p.946-954.

WILLIAMS, M.E.; MONTENEGRO, S.; DOMINGUES, A.L.; WYNN, T.A; TEIXEIRA, K.; MAHANTY, S.; COUTINHO, A.; SHER, A. Leukocytes of patients with

*Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, 1994; v. 170, p.946-954.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Elimination of schistosomiasis in low transmission áreas: Salvador, Bahia, 18-19. **Report of the WHO informal consultation**. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes**. 2th ed. Geneva, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities. Geneva: **WHO**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/WHO. Global trends in schistosomiasis control. **Bulletin of the World Health Organization**, Genebra, 2008; v. 86, n. 10, p. 738-738, oct.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/WHO. **The Global Network for Neglected Tropical Diseases Control (GNNTDC)**. 2010a. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/GNNTDC/en/index.html](http://www.who.int/neglected_diseases/GNNTDC/en/index.html)>. Acesso em: 13 nov. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/WHO. **Weekly epidemiological record**. World Health Organization, 2008; v. 81, p. 145-164.

XIMENES R, SOUTHGATE B, SMITH PG, GUIMARÃES NETO L. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in an urban area in the Northeast of Brazil. **Rev. Panam. Salud Publica**, 2003; Dez;14(6):409-421.

XIMENES RA, SOUTHGATE B, SMITH PG, GUIMARÃES NETO L. Migration and urban schistosomiasis. The case of São Lourenço da Mata, northeast of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, 2000; Sao Paulo. Ago ;42(4):209-217.

YOLLES TK, MOORE DV, DE GIUSTI DL, RIPSON CA, MELENEY HE. A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **J Parasit**, 1947; 33: 419-26.

ZANONI, F.L.; BENABOU, S.; GRECO, K.V.; MORENO, A.C.R.; CRUZ, J.W.M.C.; FILGUEIRA, F.P.; MARTINEZ, M.B.; FIGUEIREDO, L.F.P.; SILVA, M.R.; SANNOMIYA, P. (2009). Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. **Clinics**, 2009; 64, 911-919.

ZHOU, X. N.; YANG, G. J.; YANG, K.; WANG, X. H.; HONG, Q. B.; SUN, L. P.; MALONE, J. B.; KRISTENSEN, T. K.; BERGQUIST, N. R.; UTZINGER, J. Potential impact of climate change on schistosomiasis transmission in China. **The American**

Translocação bacteriana em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* submetidos à desnutrição neonatal.

**Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2008; United States, v. 78, n. 2, p. 188-194.

## ANEXO – Aprovação Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 07 de julho de 2011.

Ofício nº 382/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª. Celia Maria Machado Barbosa de Castro**  
Departamento de Imunopatologia Keizo Asami  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.026257/2011-74

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Translocação bacteriana em camundongos infectados com schistosoma mansoni submetidos á desnutrição neonatal.**”

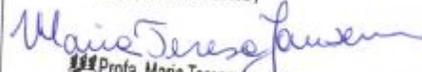
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Imunopatologia Keizo Asami; Animais: Camundongo;  
Linhagem: Swiss webster; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: Recem nascidos (primeiro dia de vida)  
Número de animais previsto no protocolo: 100 animais.

Atenciosamente,

  
Profª. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEUA

