



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE O TECIDO  
HEPÁTICO NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA  
EXPERIMENTAL**

**Glauber Melo de Araújo**

**RECIFE**  
**2015**

**Glauber Melo de Araújo**

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE O TECIDO  
HEPÁTICO NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde para obtenção do Grau de Mestre em Patologia, com orientação do professor Mário Ribeiro de Melo Júnior.

**RECIFE  
2015**

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

A663e Araújo, Glauber Melo de.  
Efeitos da dieta hiperlipídica sobre o tecido hepático na  
esquistossomose mansônica experimental / Glauber Melo de Araújo. –  
Recife: O autor, 2015.  
75 f.: il.; quad.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Mário Ribeiro de Melo Júnior.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,  
CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.  
Inclui referências e anexos.

1. Granulomas. 2. Esquistossomose mansônica. 3. Colágeno. 4.  
Características evolutivas. I. Melo Júnior, Mário Ribeiro de (Orientador).  
II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-016)



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM PATOLOGIA.**

AUTOR: **Glauber Melo de Araújo**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **PATOLOGIA**

TÍTULO A DISSERTAÇÃO: **“Efeitos da Dieta Hiperlipídica sobre o Tecido Hepático na Esquistossomose Mansônica Experimental.”**

ORIENTADOR: **Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior**

DATA DA DEFESA: **01 de setembro de 2015.**

*Dissertação Aprovada  
em 01/09/2015*

BANCA EXAMINADORA:

  
Margarete Valdevino da Silva  
Secretária  
Pós-Graduação em Patologia  
UFPE SIAPE: 113.140-3

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ivone Antonia de Souza

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carina Scanoni Maia

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Rodrigo César Azevedo Pereira Farias

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**R E I T O R**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE- REITOR**

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

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

Prof. Francisco de Sousa Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Prof<sup>a</sup>. Catarina de Oliveira Neves

**COORDENADOR DO MESTRADO DE PATOLOGIA**

Prof. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA**

Prof. Lucas André Cavalcante Brandão

**R E C I F E**

2015

Dedico a **Deus** por ter me ajudado na elaboração deste trabalho, pois, sem a fé que me anima na palavra do senhor não teria buscado força e perseverança para construir e modelar esta Dissertação.

A minha amada e adorada esposa, **Annecy Bezerra Venâncio** que tanto me apoiou e ajuda na minha construção profissional, além de ser a mãe exemplar para o fruto do nosso amor, minha eterna e para sempre amada filha **Ana Carolina Venâncio Melo de Araújo**.

A meus amados pais, **Ivanildo Ferreira de Araújo e Inaura Melo de Araújo**, pelo amor incondicional, paciência e por sempre acreditarem em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, primeiramente, pela vida e força dada para superar todas as dificuldades, e coragem para traçar esse caminho.

A minha esposa e fiel companheira, pelo amor e apoio sempre prestados, pela força que sempre me deu e pela amizade verdadeira e incondicional.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicional de sempre, apoiando-me quando eu precisei e me ajudando em cada luta. Obrigada por toda a educação dada e por sempre batalhar junto comigo.

Um agradecimento especial ao meu mestre e orientador prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Mário Ribeiro de Melo-Junior, pela confiança depositada em mim, ensinamentos e dedicação dispensados durante a realização deste trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Manuela Figueiroa Lyra, pelo apoio, ensinamentos e confiança a mim depositado e por suas palavras de encorajamentos prestadas nos momentos mais difíceis.

A Melissa Papaléo Rocha de Lima que conheci no decorrer do projeto e tornou-se peça fundamental para a finalização do meu sonho, por toda a atenção prestada a mim, todos os esclarecimentos, todo o apoio e ajuda que foram primordiais.

A Margarete Valdevino, secretária do PosPat, pelo apoio e serviço sempre eficiente, que sempre esteve a postos e ajudou no decorrer das questões burocráticas do desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Silvana Paz que com tanto carinho e dedicação fez as lâminas para o meu experimento e sem seus conhecimentos e dedicação não teria conseguido o material para os estudos.

Obrigado Deus pela oportunidade de trabalhar com pessoas especiais.

## RESUMO

A Esquistossomose Mansônica permanece sendo um grave problema de saúde pública e ainda pertence à lista de doenças negligenciadas no Brasil com um impacto sócio-econômico significativo. Estima-se que 207 milhões de pessoas estejam infectadas, 500 mil morrem a cada ano e 120 milhões sejam assintomáticos. O processo patológico característico é a presença do granuloma hepático caracterizado como reação de defesa do organismo para isolamento do ovo e proteção contra a liberação de seus antígenos. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da dieta hiperlipídica no tecido hepático em um modelo experimental de esquistossomose mansônica utilizando 35 camundongos fêmeas separados em 4 grupos: Dieta Hiperlipídica e Infectado - H+I (n=9), Infectados - I (n=7), Dieta Hiperlipídica - H (n=9) e Controle - C (n=10). Fragmentos hepáticos foram fixados e realizados estudos histológicos e morfométricos como números, volumes e evoluções do granulomas, além da quantificação da densidade de colágenos. Foi evidenciada a caracterização prevalente da fase granulomatosa no grupo I do que o H+I, além de uma melhor formação de colágenos no grupo H+I em relação aos restantes dos grupos. No decorrer do estudo observou-se a ausência de esteatose no grupo H+I. O estudo demonstrou que a presença de dieta hiperlipídica altera alguns rearranjos na formação granulomatosa que levou à necessidade de observações mais intensas a cerca da temática.

Palavras-Chave: Granulomas. Esquistossomose Mansônica. Colágeno. Características Evolutivas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis remains a serious public health issue and still belongs to the list of neglected diseases in Brazil with a significant socio-economic impact. It is estimated that 207 million people are infected, 500 thousand die annually and 120 million are asymptomatic. The characteristic pathological process is the presence of hepatic granuloma characterized as the body's defense reaction to egg insulation and protection against the release of their antigens. The aim of the study was to evaluate the influence of high fat diet on liver tissue in an experimental model of schistosomiasis mansoni using 35 female mice divided into 4 groups: fat diet and Infected - H + I (n = 9), Infected - I (n = 7), high fat diet - H (n = 9) and control - C (n = 10). Tissue specimens were fixed and made histological and morphometric studies as numbers, volumes and granulomas developments, as well as quantification of collagen density. The prevailing characterization of granulomatous phase (FG) was observed in group I than H + I, along with a better collagen formation in the H + I group compared to the other groups. During the study we observed the absence of steatosis in H + I group. The study showed that the presence of fat diet alters some rearrangements in granulomatous formation, leading to the need for more intense observations about the theme.

Keywords: Granulomas. Schistosomiasis. Collagen. Evolutionary Features.

## LISTA DE ABREVIACÕES/ SIGLAS

DM	Dermatite Cercariana
DVP	Distúrbios vasculares pulmonares (DVP)
ECP	Eosinophil cationic protein ((Proteína eosinofílica catiônica)
EDN	Eosinophil-derived neurotoxin (Neurotoxina derivada de eosinófilo)
EPO	Eosinophil peroxidase (Peroxidase eosinofílica)
EM	Esquistossomose Mansônica
FA	Fase aguda
FC	Fase crônica
FD	Formas digestivas
FPF	Fibrose periportal do fígado
FPN	Forma pseudoneoplásicas
HD	Hospedeiro Definitivo
HE	Hematoxilina-eosina
HI	Hospedeiro Intermediário
IL	Interleucinas
LE	Lesões ectópicas
LP	Leptina
MBP	Major Basic Protein (Proteína eosinofílica básica principal)
NE	Nefropatia esquistossômica
OMS	Organização mundial de saúde
PECE	Programa Especial de Controle da Esquistossomose

PBS Tampão fosfato salino

TM Tricrômico de Masson

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição das áreas de risco da esquistossomose no mundo.....	20
Figura 2: Prevalência da esquistossomose por área no Brasil.....	21
Figura 3: : Ciclo de Transmissão da Esquistossomose Mansônica.....	23
Figura 4: Microfotografias do tecido hepático.....	56
Figura 5: Evolução dos Granulomas.....	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1: Análise da percentagem do ganho de peso final entre os grupos.....	53
Gráfico 2: Evolução ponderal de camundongos Swiss Webster em diferentes períodos de vida.....	54
Gráfico 3: Amostra ponderal semanal entre o período pré-infecção e pós-infecção.....	54
Gráfico 4: Volume dos Granulomas.....	57
Gráfico 5: Número Médio de Granulomas.....	57
Gráfico 6: Densidade do Granuloma.....	57
Gráfico 7: Percentual médio dos granulomas por fases.....	60
Gráfico 8: Evolução Fase Pré Granulomatosa (FPG).....	60
Gráfico 9: Evolução Fase Granulomatosa (FG).....	60
Gráfico 10: Evolução Fase Cura por Fibrose (FCF).....	60
Quadro 1: Definição dos grupos experimentais e esquema de dieta.....	33

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	16
2.	Revisão da Literatura.....	20
2.1.	Aspecto Epidemiológico.....	21
2.2.	Agente Etiológico e seu Ciclo Biológico.....	23
2.3.	História Natural da Esquistossomose.....	25
2.3.1.	Dermatite Cercariana.....	25
2.3.2.	Forma Aguda.....	26
2.3.3.	Forma Crônica.....	26
2.4.	Granulomas.....	27
2.5.	Dieta Hiperlipídica e o Sistema Imunológico.....	28
3.	Objetivos.....	30
3.1.	Objetivos Gerais.....	31
3.2.	Objetivos Específicos.....	31
4.	Metodologia.....	32
4.1.	Animais e Infecções.....	33
4.2.	Formação dos Grupos Experimentais.....	33
4.3.	Estudo Histopatológico e Morfométrico.....	35
4.4.	Número de Granulomas.....	35
4.5.	Volume do Granuloma.....	35
4.6.	Evolução do Granuloma.....	35
4.7.	Determinação do percentual de colágeno.....	36
4.8.	Análise Estatística.....	36
5.	Referências.....	37
6.	Artigo: Efeitos da Dieta Hiperlipídica sobre o Tecido Hepático na Esquistossomose Mansônica Experimental .....	47
7.	Conclusões.....	61
	Referências .....	63
	Anexos.....	67



A esquistossomose mansônica (EM) ainda permanece sendo um grave problema de saúde pública no país. Há diversas áreas no Brasil que são consideradas endêmicas para a moléstia, como alguns estados do nordeste e sudeste, que vão desde o Rio Grande do Norte até Minas Gerais, tendo focos isolados espalhados pelo Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, constituindo importante causa de morbidade e mortalidade da população (LINS, CAVALCANTI, FILHO, 2008).

Ela está incluída na Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas e tem um impacto sócio - econômico significativo. Estima-se que 779 milhões de pessoas estão em constante risco de infecção e 207 milhões são infectados, dos quais 120 milhões são sintomáticos, 20 milhões desenvolve a forma crônica e mais de 500 mil morrem a cada ano (STEINMANN et al, 2006).

A sua patogênese é dependente da interação entre o helminto, o hospedeiro intermediário (HI) e o hospedeiro definitivo (HD) onde seu ciclo de transmissão requer a contaminação das águas superficiais por excretas, especificamente de caramujo (HI) de água doce, com contatos humanos, desta forma tornando o homem como HD (GRYSEEIS et al., 2006).

Inicia-se a contaminação por ingestão de alimentos ou água contaminada pelo homem, após a infecção, a fêmea produz centenas a milhares de ovos por dia no intestino do hospedeiro que os eliminam por meios das fezes. Em ambiente favorável podem ficar em media sete dias liberando miracídeos os quais, podem entrar em contato com o HI, caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata*, originando a cercária. Após liberação das cercarias, o verme pode entrar em contato com o HD, *Homo sapiens sapiens*, através da pele e migrar para o sangue produzindo a infestação cercariana em órgãos vitais como fígado, baço, pulmão, rim, cérebro, entre outros (RODRIGUES et al, 2010).

O sítio anatômico predileto dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* é a vasculatura mesentérica. Os ovos são evacuados no trato intestinal junto com as fezes, podendo ficar presos principalmente na parede do intestino ou no fígado, por onde chegam através da circulação porta. Portanto, caracteriza se como uma doença hepato-intestinal (LAMBERTUCCI, SILVA, VOIETA, 2005).

O desenvolvimento da doença ocorre principalmente devido à deposição dos ovos no tecido do HD pelo verme adulto do sexo feminino. O antígeno do ovo induz à formação de granuloma e fibrose, principalmente no intestino e sistema portal hepático. Destarte, a fibrose periportal do fígado (FPF) é uma das consequências mais graves da infecção por EM que envolve a remodelação da matriz extracelular e deposição de colágeno, principalmente por células estreladas hepáticas, as quais, exercem um papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção da fibrose, ao longo dos ramos do trato portal (BOOTH, 2004; CALDAS, 2008).

A EM ocorre em duas fases: Fase aguda (FA) e Fase crônica (FC), sendo a FA característica de indivíduos que visitaram recentemente as áreas endêmicas, sem ter tido nenhum contato anterior com o parasita (GAZZINELLI, 1985). Na FC, a maioria dos pacientes que vivem nas áreas endêmicas são assintomáticos, sendo que alguns desenvolvem FPF com hipertensão portal, esplenomegalia, varizes de esôfago e hematêmeses recorrentes (COLLEY et al., 1986).

Tal doença é resultante da reação inflamatória granulomatosa aos ovos do parasita localizados nos tecidos e apresenta efeito acumulativo de lesões, principalmente no fígado. Os ovos excretam um antígeno solúvel responsável pelo desencadeamento de um complexo fisiopatológico reacional que promoverá a formação do granuloma. Diariamente, cada casal de *Schistosoma mansoni* pode levar à formação de cerca de 200 granulomas: ovo + reação granulomatosa que o envolve. Estes podem apresentar-se em pontos isolados ou difusos no intestino grosso e fígado (ANDRADE, 2009).

Dentre as células que compõem o granuloma, por volta de 50% são eosinófilos, que secretam a proteína eosinofílica básica principal (*major basic protein* - MBP), a proteína eosinofílica catiônica (ECP – *eosinophil cationic protein*), a peroxidase eosinofílica (EPO – *eosinophil peroxidase*) e a neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN – *eosinophil-derived neurotoxin*). Demonstrou-se que a ECP causa, *in vitro*, a fragmentação e a ruptura do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni* e juntamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a EPO mata o esquistossômulo. Enquanto a MBP é tóxica a células de mamíferos e larvas de helmintos, provavelmente causa danos aos ovos de *Schistosoma mansoni* em humanos (FARAH et al., 2000).

Modelos induzidos por dietas provaram benefícios para a avaliação das alterações fisiológicas que ocorrem na patogênese de doenças. Obesidade, fatores

dietéticos e distúrbios relacionados à obesidade são algumas das alterações que buscam respostas frente a ensaios controlados em camundongos, visto que a obesidade também é preditiva de fibrose no fígado, potencialmente progredindo para doenças avançadas (WYNN, 2005).

Nesse contexto, descobre-se que a patologia EM é muito abrangente e de fonte inesgotável para estudo. Nos moldes atuais, onde o Brasil ainda é um país endêmico, fazem-se necessários maiores estudos referente à temática.

As alterações hepáticas encontradas na EM serão avaliadas frente a novas mudanças em seu metabolismo, a obesidade, em um modelo animal, a fim de verificar alterações em seus processo fisiopatológico e observar a evolução dos granulomas hepáticos, fonte dos processos patológicos decorrentes da doença. A obesidade pode alterar os processos inflamatórios frente à EM, desta forma, modificando a reação granulomatosa hepática característica da patologia.

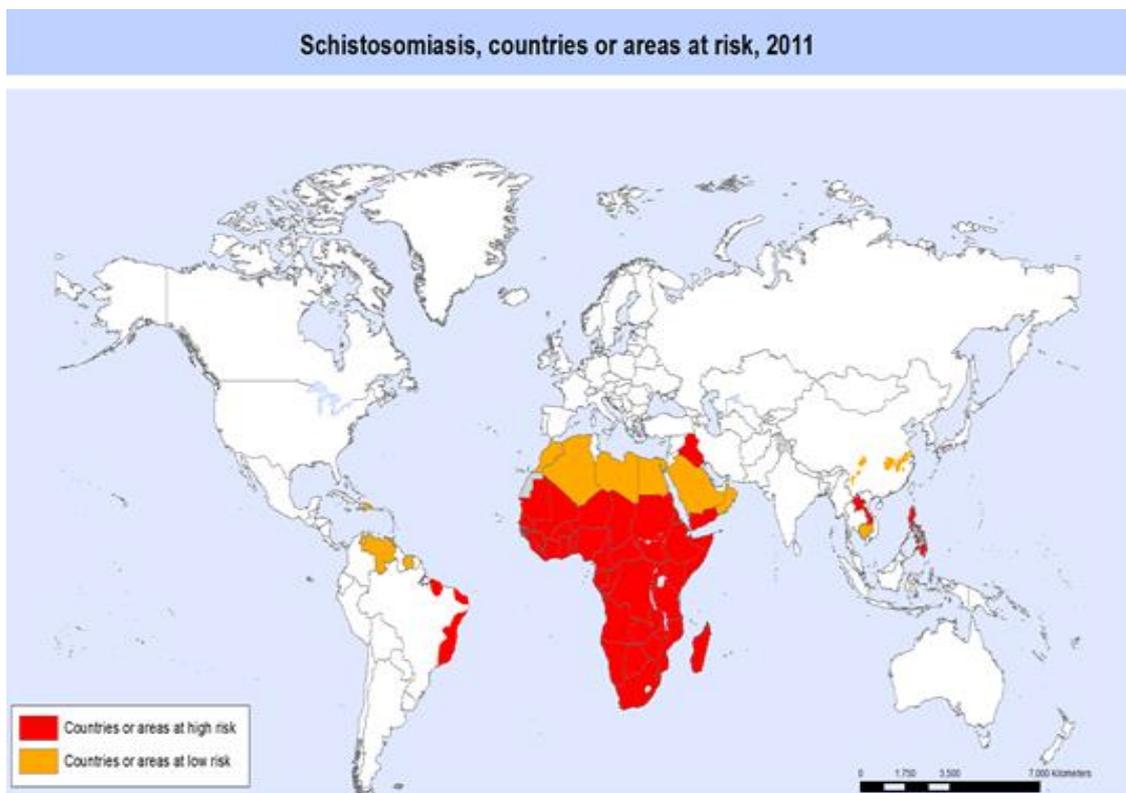
Pelas razões acima citadas justifica-se avaliar as alterações que podem ocorrer nos órgãos hepáticos mediante novos estresses metabólicos, como a obesidade em modelos experimentais com EM.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 – Aspectos Epidemiológicos

A EM é uma doença produzida por trematódeos do gênero *Schistosoma* que, para o homem, tem como principal agente etiológico as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Os primeiros registros dessa doença foram feitos nas bacias do rio Nilo, na África, e Yangtze, na Ásia. Destes pontos de origem, ela se dispersou para outros continentes, seguindo os fluxos migratórios. Essa propagação foi facilitada pela longevidade dos vermes adultos, grande capacidade de postura das fêmeas, existência de portadores eliminando ovos por muitos anos, caráter crônico da doença e ampla distribuição dos HD (NEVES, 2001).

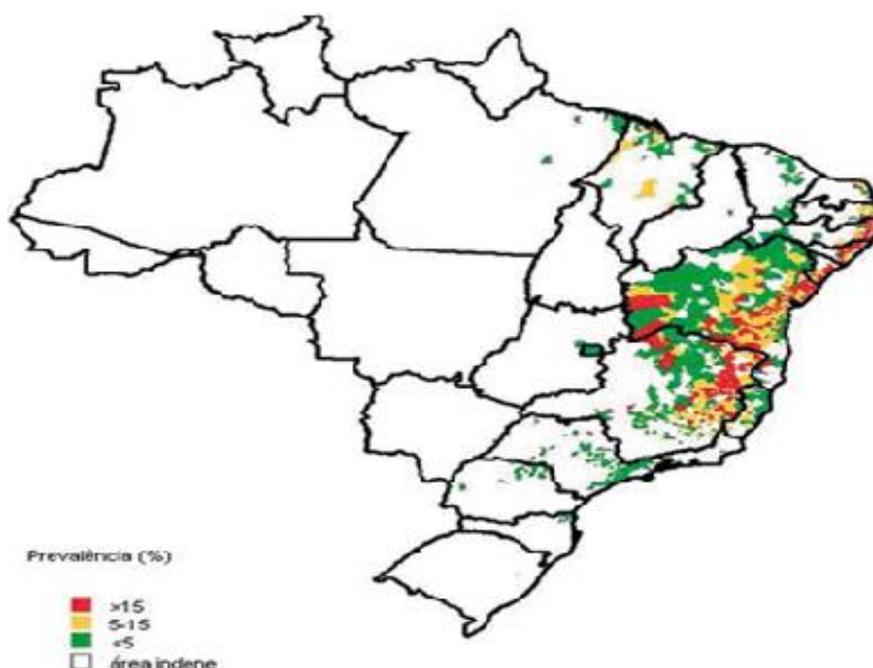
A doença é considerada endêmica (Figura 1) em áreas tropicais e com larga distribuição geográfica, encontrados em 78 países e territórios. As estimativas apontam 779 milhões de pessoas sob o risco de infecção e 207 milhões de infectados em todo o mundo (IBIKOUNLÉ et al. 2009).



**Figura 1:** Mapa de distribuição das áreas de risco da esquistossomose no mundo  
Fonte: [apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/sch/sch.html](https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html)

No Brasil, a doença foi trazida pelos escravos africanos e inicialmente detectada pelo médico Augusto Pirajá da Silva no estado da Bahia e atualmente está presente nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo que nesta última permeia pelos nove estados (Figura 2). Contudo os estados com maior incidência são Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, devido as suas prevalências serem superior a 5%. É considerada uma endemia e estima-se que no território brasileiro existam cerca de 6 milhões de indivíduos infectados, 25 milhões expostos ao risco de contraí-la e 1500 internados por ano vítimas dessa doença, existindo uma estreita relação entre questões biológicas sociais e culturais que facilitam a transmissão (BRASIL, 2013; CARVALHO et al, 2008).

No Brasil a esquistossomose mansônica atinge entre 2,5 a 6 milhões de indivíduos sendo que 25 milhões de pessoas vivem em área de risco (BRASIL, 2010). No nordeste brasileiro esta parasitose atinge índices hiperendêmicos nos Estados de Pernambuco, Bahia, Alagoas e Sergipe. O fator principal que contribui para a manutenção do seu processo de transmissão é a contaminação das coleções hídricas por fezes humanas fruto das deficiências de infra-estrutura sanitária e ambiental (KATZ; PEIXOTO, 2000 e RESENDES et al., 2005).



**Figura 2:** Prevalência da esquistossomose por área no Brasil, 2010.

Fonte: <http://prezi.com/jwdyvbl3pkd9/esquistossomose-mansonica/>

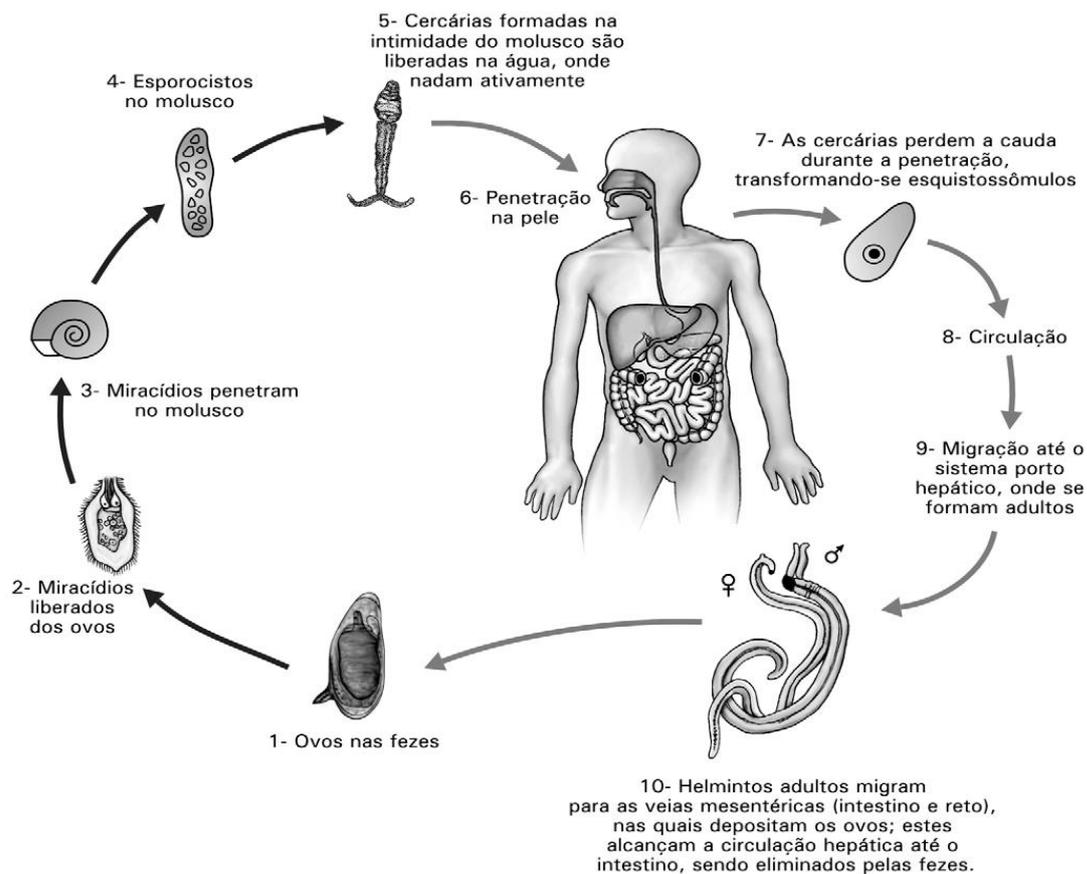
Segundo a Organização mundial de Saúde (OMS) os dados sobre o tratamento são coletados para medir os progressos realizados no sentido de atingir metas estabelecidas por resoluções da Assembleia Mundial de Saúde para atingir 75% de todas as crianças em idade escolar que estão em risco de morbidade da EM. Dos 78 países considerados endêmicos para a esquistossomose, apenas 52 têm populações que necessitam de quimioterapia preventiva. O número total de pessoas que necessitaram de remédios preventivos a nível global em 2012 foi de 249 milhões, dos quais 114,3 milhões eram crianças em idade escolar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

No Brasil, antes da implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), ocorrido nos anos 1996 e 1997, a esquistossomose atingia entre dez e doze milhões de pessoas, sendo considerada uma das mais importantes áreas de ocorrência da doença (BRASIL, 2013).

## **2.2 – Agente Etiológico e seu Ciclo Biológico**

Conforme Neves e colaboradores (2010) a esquistossomose é uma doença infecto parasitária causada por platelmintos da classe Trematoda, família Schistomatidae, dividida em duas subfamílias: Brilharzielinae e Schistosomatinae. A família Brilharzielinae apresenta sexos separados, sendo a primeira subfamília sem dimorfismo sexual, parasitando os vasos sanguíneos de aves e alguns mamíferos, então, sem interesse médico. A segunda subfamília, por sua vez, inclui os vermes com nítido dimorfismo sexual, com espécie que parasitam o homem e animais, além de possuir diferentes estágios de desenvolvimentos (vermes adultos, miracídeos, esporocístos, cercárias e esquistossômulos), sendo que, cada um deles possuem características morfofuncionais distintas, a depender de seu ciclo patogênico.

O *S. Mansoni* é a única espécie do gênero *Schistosoma* descrita no Brasil, em virtude da existência de moluscos (HI), suscetíveis ao helminto além do ambiente propício para o seu desenvolvimento. O verme, em seu ciclo de vida, possui dois estágios diferentes que alternam sua morfologia dependendo do seu hospedeiro. Três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* são os HI do parasita no Brasil (REY, 2002).



**Figura 3:** Ciclo de Transmissão da Esquistossomose Mansônica  
 Fonte: SOUZA et al, 2011

A EM advém do contágio do ambiente quando o indivíduo entra em contato direto com água contaminada (Figura 3), sendo este, abrigando formas larvares e infectantes do *S. mansoni*, chamados de cercarias. Ao alcançarem a epiderme do homem, as mesmas fixam-se entre os folículos pilosos, com as duas ventosas e uma substância muco proteica secretada por suas glândulas e procuram de forma ativa a penetração cutânea, sendo que através de sua posição vertical apoiada por suas ventosas orais, movimentos vibratórios fortes e o uso da enzima proteolítica elatase conseguindo penetrar por entre a barreira dérmica. Ao penetrar, as cercarias perdem suas caudas bifurcadas, dando origem aos esquistossômulos que migram para o tecido subcutâneo e entram nos capilares e vasos sanguíneos (NEVES et. al., 2010; SOUZA et. al., 2011).

Os vermes adultos vivem acasalados no sistema porta-hepático, com a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho, por período médio de 2 a 5 anos. Esse

processo de pareamento resulta na completa maturação dos vermes (PESSOA & MARTINS, 1982; DAMIAN, 1984). Nas veias mesentéricas, a fêmea inicia a oviposição, produzindo cerca de 300 ovos por dia. Parte dos ovos atravessam a parede do intestino, caem na luz intestinal e são eliminados nas fezes do hospedeiro. Quando entram em contato com a água, os ovos eclodem e uma larva ciliada de vida livre, o miracídio, é liberada. A penetração do miracídio no caramujo é ativa, auxiliada por enzimas proteolíticas. Dentro do hospedeiro intermediário, através de um processo assexuado de poliembrionia, o miracídio transforma-se em esporocisto primário em cerca de 8 a 10 dias, posteriormente em esporocisto secundário e finalmente em cercaria, estágio infectante para o hospedeiro vertebrado. Cerca de 30% dos ovos produzidos pelos vermes adultos ficam retidos na mucosa intestinal e capilares do sistema porta-hepático do hospedeiro vertebrado, sendo alvo de reações imunológicas intensas (COUTINHO, 1979).

As cercarias saem através de vesículas que aparecem no tegumento dos moluscos que se rompem e liberam estas formas larvárias. Chegam à água nas horas mais quentes e luminosas do dia, principalmente das 11 às 17 horas, sendo a luminosidade o fator, aparente, mais importante. A sua sobrevivência é limitada por cerca de dois dias, sendo que, algumas chegam a morrer horas após sua liberação do HI. Aos ficarem livres na água, nadam ativamente até a chegada do HD que nem sempre é o homem, podendo aderir-se a mamíferos e aves. Contudo, se encontrar a espécie preferida, faz a penetração em aproximadamente em 15 minutos, levando a uma irritação cutânea (rush cutâneo), porém a forma percutânea não é exclusiva do parasito que também utiliza a mucosa como forma de penetração (SOUZA, 2011).

## **2.3 – História Natural da Esquistossomose**

### **2.3.1– Dermatite Cercariana (DM)**

Logo após o contato do parasita na forma de cercaria com o HD começa a DM que se caracteriza por manifestações pruriginosas na pele, de duração transitória cedendo espontaneamente decorrente da morte na pele de metade das cercarias penetrantes possuindo a característica micropapilar eritematosa e edemaciada (LAMBERTUCCI, 1996). A intensidade, duração e o aspecto

dermatológico desta fase variam, sendo geralmente de pequena intensidade, onde suas manifestações clínicas duram entre 24 a 72 horas, podendo chegar até 15 dias.

### **2.3.2 – Forma Aguda (FA)**

A DM é uma reação local imediata, onde, após a penetração dos restantes das cercarias que sobreviveram às barreiras naturais de defesa do HD ocorre a incubação desenvolvendo-se a forma imatura do parasita (Esquistossômulo) até sua liberação para a corrente sanguínea, período este que pode se estender por 40 a 60 dias (SOUZA, 2011).

Esse período evolui de forma inaparente ou assintomática na maioria dos indivíduos, destarte, na evolução do parasita ocorre a oviposição (fase postural) podendo surgir como manifestações clínicas: febre elevada, calafrios, sudorese, astenia, mal estar, tosse não produtiva, anorexia, náuseas e vômitos, podendo ser intensos, incluindo mialgia e cefaleia associadas a diarreias (BOROS e WHITFIELD, 1999).

Os distúrbios ocasionados na FA geralmente não são exuberantes e depende da carga parasitaria de individuo a individuo e da reatividade do HD. Desta forma, na maioria dos doentes a EM dura aproximadamente de quatro a oito semanas (SOUZA et al, 2011).

### **2.3.3 – Forma Crônica (FC)**

Conforme Huggins et al (1998) a FC da doença pode apresentar-se de maneira polimórfica caracterizada por modulações do granuloma. Pode compreender as formas digestivas (FD), os distúrbios vasculares pulmonares (DVP), as formas pseudoneoplásicas (FPN), a nefropatia esquistossômica (NE) e as lesões ectópicas (LE).

A FD apresentar-se nas formas Intestinais e Hepatointestinais, considerada a forma mais branda da EM, sendo geralmente associadas, na medida em que a última nada mais é do que a forma intestinal em conjunto com a hepatomegalia. Outra forma, esta mais grave, é a hepatoesplênica, que fica inserida nesse cenário a junção do baço a todo um contexto generalizado provocado pelos granulomas e consequentes fibroses periportais (SANTOS, et al, 2011).

Nos DVPs está inserida o envolvimento pulmonar, que segundo Carvalho e Coelho (1960), são mais comuns do que se imagina. Estudos realizados em necropsias têm mostrado prevalências de 20 a 30% de comprometimento pulmonar, mesmo sem queixas clínicas. Esta forma não se apresenta isolada, é comum sua associação à forma hepatoesplênica.

Algumas vezes a esquistossomose pode ser confundida com formas tumorais, simulando um adenocarcinoma de colón, forma esta conhecida como pseudoneoplásica. A FPN é bastante rara e apresenta-se como pólipos únicos ou múltiplos, estenoses ou vegetações tumorais crescendo para a luz do intestino, quadro este característico de enterorragia e dor abdominal intensa (MEIRA, 1977).

O envolvimento renal na esquistossomose é uma importante causa de elevação da incidência de doenças nefrética no estágio final, aumentando o impacto socioeconômico da patologia. Conforme Rodrigues et al (2010) ainda não existe um consenso comum sobre a incidência no Brasil, mas, estudos apontam para que 15% dos pacientes com esquistossomose na forma hepatoesplênica também evoluem com NE.

O mecanismo fisiopatogênico difere das demais formas clínicas da EM, onde, o granuloma em torno dos ovos desencadeia o principal papel patogênico. Na NE, a formação de imunocomplexos, mediados geralmente por Iga, IgE e IgM e sistema complemento, ficam depositados nos glomérulos desencadeando os princípios patogênicos renais. A lesão se mostra progressiva e a doença evolui, indiferentemente de tratamento, para a insuficiência renal (OTONI, TEIXEIRA e VOIETA, 2014).

A LE é classificada de acordo com sua localização, quando encontrada fora do sistema porto cava, habitat natural do helminto, elementos parasitários como ovos ou vermes adultos sendo a neuroesquistossomose a forma mais grave e frequente da LE (SOUZA et al, 2011).

#### **2.4 – Granulomas**

Raso (1978) relatou que não é recente o conhecimento de que granuloma é causado pelos ovos do *S. mansoni* e apresenta estrutura diversa em consequência

de pelo menos dois fatores: sua fase evolutiva (o tempo ou período de sua evolução) e o estado de reatividade do organismo. Esse é resultado de reações inflamatórias granulomatosas localizadas no tecido e apresenta efeito acumulativo de lesões principalmente no fígado.

Os ovos excretam um antígeno solúvel responsável pelo desencadeamento de um complexo fisiopatológico reacional que promove a reação do granuloma. As formas severas da doença, com aumento do fígado e do baço, estão correlacionadas ao número maior de ovos do *Schistosoma mansoni* eliminados nas fezes (LEHMAN et al, 1976; SLEIGH et al, 1986). Embora vários órgãos possam ser afetados, fígado, baço e intestinos são invariavelmente atingidos. Do ponto de vista patológico, o fígado é o órgão alvo, atingido em vários graus de intensidade (COUTINHO, 1979), com granulomas epitelióides que surgem nos espaços periportais em resposta à presença dos ovos do parasito.

Os granulomas formados funcionam como barreiras que previnem a dispersão dos antígenos dos ovos do *S. mansoni*, e a consequente lesão do parênquima hepático. Porém, quando ocorre a deposição de grande número de ovos, o processo pode evoluir para fibrose grave, o que leva à interrupção do fluxo sanguíneo normal do sistema venoso para os sinusóides resultando em hipertensão portal, hepatoesplenomegalia, formação de varizes esofágicas e gástricas que podem evoluir para hemorragia e até mesmo o óbito (CHEEVER, ANDRADE, 1967; BAPTISTA, ANDRADE, 2005; WYNN, 2007).

## **2.5 – Dieta Hiperlipídica e o Sistema Imunológico**

Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo, além de ter função de armazenamento de reservas energéticas em forma de triglicérides, tem importantes funções como órgão endócrino ao produzir diversos hormônios e moléculas de sinalização. Algumas das moléculas secretadas estão ativamente implicadas na regulação da função imune. Um exemplo já conhecido é a Leptina (LP) (AHIMA, FLIER, 2000). Há uma evidência crescente de que a LP, além de seus efeitos centrais no controle da ingestão e nas reservas de energia, está envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular (OTERO et al., 2005). O peptídeo Adiponectina (Acrp30) é também secretado pelo adipócito e participa na resposta imune atuando como protetor da inflamação (RUDIN, BARZILAI, 2005). As

Interleucinas, como a Interleucina-6 (IL- 6) e a Interleucina-8 (IL-8), e o Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- $\alpha$ ) são os componentes de participação direta no sistema imune que são também secretados pelos tecidos adiposos (OTERO et al, 2005).

A LP e as citocinas IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  secretadas pelo tecido adiposo, com função pró-inflamatória, encontram-se em concentrações maiores em indivíduos obesos. O contrário sucede com a proteína Acrp30, também secretada pelo adipócito, mas com função antiinflamatória. Estas substâncias formam parte da dinâmica da resposta imunológica e o problema ocorre quando suas concentrações estão alteradas. Essas repercussões imunológicas associadas a complexa interação que existe entre elas levam o indivíduo obeso a modificar sua resposta imune, tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida (ALVEZ, 2006).

A resposta imunológica frente às agressões agudas e crônicas na obesidade está afetada devido às alterações destas concentrações de mediadores inflamatórios, de populações linfocitárias, de células fagocitárias, apresentadoras de antígenos, pela ativação do sistema de complemento, etc. Portanto, a suscetibilidade de adquirir infecções, a probabilidade de desenvolver doenças autoimunes e desenvolver doenças crônicas inflamatórias, estão elevadas nos indivíduos obesos (ALVEZ, 2006).



### 3.1 GERAL

- Avaliar a influencia da dieta hiperlipídica no tecido hepático em um modelo experimental de esquistossomose mansônica.

### 3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar avaliação ponderal corporal dos animais sob diferentes condições experimentais;
- Observar as principais alterações histológicas no tecido hepático de camundongos submetidos às condições experimentais com dieta hiperlipídica e/ou infecção pelo *Schistosoma mansoni*;
- Realizar estudo morfométrico comparativo dos granulomas hepáticos de camundongos com dieta lipídica e infectados com os grupos de dietas padrão e não infectados;
- Identificar e comparar o padrão de distribuição das fibras colágenas no tecido hepático entre os grupos experimentais.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais e infecção**

Foram utilizados camundongos fêmeas, *Swiss Webster*, pesando entre 28-30 gramas, com 28 dias de idade, mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) de acordo com condições padronizadas de criação. Para a infecção dos camundongos foi utilizado a cepa de *Schistosoma mansoni*, Belo Horizonte – Minas Gerais (BH), mantida pelo Laboratório de Imunologia de Doenças Parasitárias e de Esquistossomose Experimental – LIKA - UFPE, através de passagens sucessivas da cepa em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Após obtenção de suspensão cercariana, os camundongos foram infectados via percutânea com 50 cercárias (OLIVIER, STIREWALT, 1952).

### **4.2 Formação dos grupos experimentais**

Estudos indicam que a fase crônica da infecção esquistossomótica em camundongos é estabelecida a partir da 12ª semana após a infecção (FALLON, 2000a; PEARCE, MCDONALD, 2002). Para o presente estudo, foi estabelecido que o tempo decorrido entre a infecção e eutanásia seria de 90 e 120 dias para avaliação da fase intermediária e crônica, respectivamente, contudo, não obtivemos sucesso para os grupos da fase crônica devido a sucessivas mortes dos animais, independente da dieta utilizada, o que sugere ser provavelmente pela infecção. Desta forma, foram avaliados apenas os grupos da fase intermediária.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a ingestão da dieta e infecção, e estes, formado por dez animais em cada grupo. Contudo, houve perda de animais no decorrer do experimento, de acordo com o quadro abaixo:

**QUADRO 1** - Definição dos grupos experimentais e esquema de dieta.

GRUPO	NÚMEROS	ESQUEMA DE DIETA HIPERLIPÍDICA	ESQUEMA DE DIETA PADRÃO
GRUPO EXPERIMENTO (H+I) Dieta Hiperlipídica + Infectados	09	Administrada a partir do desmame até o 90º dia após a infecção	Administrada a partir do desmame até o 90º dia após a infecção
GRUPO INFECTADO (I)	07		
GRUPO DIETA HIPERLIPÍDICA (H)	09		
GRUPO CONTROLE (C) Dieta Padrão + Não Infectados	10		

A dieta normocalórica (Padrão) consiste de ração comercial para camundongos Presence (Purina®), contendo por peso: 19,0% de proteína, 56,0% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais, totalizando 17,03kJ/g. A dieta hiperlipídica, previamente padronizada (ESTADELLA et al., 2004), consiste de uma mistura de ração padrão Presence (Purina®), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maizena na proporção 3:2:2:1. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de péletes, contendo por peso: 20% de proteína, 48,0% de carboidrato, 20,0% de lipídeos, 4,0% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais. O conteúdo energético da dieta hiperlipídica é de 21,40kJ/g.

Os animais dos grupos controle, livre de infecção e com dieta padrão, foram submetidos às mesmas condições que os demais grupos experimentais. Decorrido o tempo de tratamento de cada grupo, os animais foram eutanasiados utilizando anestesia (tiopental 200 mg.kg<sup>-1</sup>), seguindo as recomendações da publicação NIH n.85-23.

### **4.3 Estudo histopatológico e morfométrico**

Fragmentos de fígado de cada animal foram fixados em formaldeído a 10% tamponado em PBS (tampão fosfato salino) e processados para inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura. Para cada amostra de tecido hepático foram confeccionadas duas laminais histológicas, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) (Junqueira; Bignolos and Brentani, 1979). A coloração de TM foi empregada para mensuração do diâmetro médio dos granulomas viáveis (com ovo, ou vestígio de ovo central) e do número médio de granulomas capturados em cinco campos aleatórios (área total de campo = 12.234 µm<sup>2</sup>, área total visualizada = 61.170µm<sup>2</sup>) em amostras histológicas de cada animal por subgrupo. Para obtenção das imagens das amostras foi utilizado microscópio óptico acoplado a câmera digital e sistema computadorizado com linguagem orientada para leitura de imagem pelo software Motic Images Plus 2.0 ML<sup>®</sup>.

### **4.4 Número de granulomas**

A determinação da média do número de granulomas foi verificada nas lâminas coradas com HE. A contagem de granulomas foi realizada em cinco campos selecionados aleatoriamente, por animal.

### **4.5 Volume dos granulomas**

O diâmetro de todos os granulomas viáveis (contendo ovo ou vestígio de ovo) encontrados em 10 campos aleatórios foi mensurado em cada animal. Ao atribuir uma forma esférica aos granulomas, os raios obtidos a partir de seus diâmetros foram aplicados à fórmula utilizada para calcular o volume da esfera, obtendo assim, o volume dos granulomas.

$$V = R^3 \times \text{Pi} \times 4/3$$

R = raio

Pi = 3,14

### **4.6 Evolução dos Granulomas**

Para obtenção das fases granulomatosas pré-estabelecidas foi adotado o modelo proposto por Lenzi et al (1998) que divide em três estágios: a Fase Pré-

Granulomatosa (FPG), caracterizada pela pouca quantidade e desorganização de eosinófilos na periferia do ovo; a Fase Granulomatosa (FG) que corresponde a organização e aumento no número de eosinófilos peri-granuloma; e a Fase de Cura por Fibrose (FCF) observada pela diminuição dos eosinófilos, mas aumento na quantidade de colágeno na região próximas ao granuloma.

#### **4.7 Determinação do percentual de colágeno**

A fibrose foi determinada morfometricamente por meio da medição da intensidade em 15 imagens digitais obtidas das lâminas coradas com Tricrômico de Masson de cada animal. A intensidade de fibrose foi quantificada utilizando-se um software de manipulação de imagens (GIMP 2.8.10).

O software permite a marcação do tecido fibrose diferenciado em cor azul pelo Tricrômico de Masson, que é seletivo para as fibras colágenas, e em seguida fornece automaticamente o percentual de tecido marcado.

#### **4.8 Análise Estatística**

Foram utilizados testes e programas estatísticos específicos (GraphPad Prism 6.0) para comparar diferenças entre os grupos e subgrupos com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os casos.



AHIMA SR, FLIER JS. **Adipose Tissue as an Endocrine Organ**. Trends Endocrinol Metab. v.8, p.327-32, 2000.

AKPOM, C.A. **Supression of granuloma formation around Schistosoma mansoni eggs in severe protein malnutrition: the role of the egg**. Trans.roy Soc.trop. Med.Hyg. v.75, p.444-6, 1981.

ALVES OLIVEIRA LF, MORENO EC, GAZZINELLI G, MARTINS-FILHO OA, SILVEIRA AM, GAZZINELLI A, MALAQUIAS LC, LOVERDE P, LEITE PM AND CORREA- OLIVEIRA R. **Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans**. Infect Immun. v.74, n.2, p.1215-1221, 2006.

ANDRADE, Z. A.; **Schistosomiasis and liver fibrosis**. Parasite Immunology. v 31, p 656-663, 2009.

BOOTH, M.; MWATHA, J. K.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; Et al. **Periportal Fibrosis in Human Schistosoma mansoni Infection Is Associated with Low IL-10, Low IFN- $\gamma$ , High TNF , or Low RANTES, Depending on Age and Gender**. J. Immunol. v. 172, p 1295-1303, 2004.

BOROS, D.L.; WHITFIELD JR. **Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic response in murine schistosomiasis mansoni**. Infect Immun. v 67(3), p 1187-1193, 1999.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica**. [serial on the Internet]; 7.ed. Brasília, DF; 2009 [citado:2013,Set,2].Disponívelem:[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf).

BRASIL. **Secretaria de Executiva. Departamento de Informática do SUS. Esquistossomose**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 20, agosto, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Sergipe [serial on the Internet] Brasília-DF, 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/se.pdf>.

BRUNETTO, M. A. et al. **Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais.** Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 35, supl. 2, p. 203-232, 2007.

CALDAS, I. R.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; OLIVEIRA, L. F.; SILVEIRA, A. M. S.; Et al. **Human Schistosomiasis Mansonii: Immune Responses During Acute and Chronic phases of the infection.** Acta Tropical. v. 108, p. 109-117, 2008.

CARVALHO, J.A.M.; COELHO, R.B.; Incidência da esquistossomose pulmonar em Pernambuco. **An Fac Med Univ Fed Pernambuco.** v 20, p 361, 1960.

CARVALHO, O.S.; AMARAL, R.S.; et al. **Distribuição espacial de B. glabrata, B. straminea e B. tenagophila, hospedeiros intermediários de Schistosoma mansoni no Brasil.** In: **Carvalho, O.S.; Coelho, P.M.Z.; Lenzi, H.L.; Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008, p.393 - 418.

CHIARAMONTE, M. G., A. W. CHEEVER, J. D. MALLEY, D. D. DONALDSON, AND T. A. WYNN. **Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis.** Hepatology. v.34, p.273–282, 2001.

CHIARAMONTE, M. G., M. MENTINK-KANE, B. A. JACOBSON, A. W. CHEEVER, M. J. WHITTERS, M. E. P. GOAD, A. WONG, M. COLLINS, D. D. DONALDSON, M. J. GRUSBY, AND T. A. WYNN. **Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response.** J. Exp. Med. v.197, p.687–701, 2003.

COLLEY, D. G.; GARCIA, A. A.; LAMBERTUCCI, J. R., PARRA, J. C.; KATZ, N.; ROCHA, R. S.; GAZZINELLI, G. **Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease.** Am. J. Trop. Med. Hyg. v 35, p 793-802, 1986.

CONLON, C. P. **Schistosomiasis Medicine.** v. 31, p 64-67, 2005

COUTINHO A. **Fatores relacionados com o desenvolvimento das formas clínicas da esquistossomose Mansônica.** Rev Ass Med Bras. v.25, p.185-188, 1979.

CHEEVER, A. W. et al. **Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with Schistosoma mansoni.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 37, p. 85-97, 1987

CHEEVER, A. W. M. E.; WILLIAMS, T. A.; WYNN, F. D.; FINKELMAN, R. A.; SEDER, T. M. COX, S. HIENY, P. CASPAR, AND A. SHER. **Anti-IL-4 treatment of Schistosoma mansoni-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis.** J. Immunol. v.153, p.753–759, 1994.

COELHO, R. B. **Patologia da Esquistossomose Mansônica: Comportamento do ovo do Schistosoma Mansone.** Inst. Ageu Magalhães, v. 4, p 61-71, 1955.

COUTINHO A. **Fatores relacionados com o desenvolvimento das formas clínicas da esquistossomose Mansônica.** Rev Ass Med Bras, v.25, p.185-188, 1979.

COUTINHO, E. M et al. **Pathogenesis of schistosomal pipestem fibrosis in mice.** International Journal of Experimental Pathology, Oxford. v.78, p.337-342, 1997.

CRENN P. **Dénutrition-malnutrition: principes du traitement.** Revue Française des Laboratoires. v.334, p.29-35, 2001.

DAMIAN, R. T. **Immunity In Schistosomiasis: A Holistic View**. Contemp. Top. Immunobiol. v. 12, p 359, 1984.

DE JESUS AR, MAGALHAES A, MIRANDA DG, MIRANDA RG, ARAUJO MI, DE JESUS AA, SILVA A, SANTANA LB, PEARCE E AND CARVALHO EM. **Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection**. Infect Immun. v.72, n.6, p.3391-7, 2004.

ESTADELLA D, OYAMA LM, DÂMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, n.2, p.218-24, 2004.

FALLON, P.G., RICHARDSON, E. J., MCKENZIE, G. J., MCKENZIE, A. N.; **Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent**. J. Immunol. v 164, p 2585–2591, 2000.

FARAH, I. O., et all. **Hepatic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs in BALB/c mice and olive baboons (*Papio cynocephalus Anubis*)**. Journal of comparative pathology. v 123, p 7-14, 2000.

GAZZINELLI, G.; LAMBERTUCCI, J. R.; KATZ, N.; ROCHA, R. S.; LIMA, M. S.; COLLEY, D. G. **Immune responses during human *schistosomiasis mansoni***. J. Immunol. v 135, p 2121–2127, 1985.

GRYSEEIS, B.; POLIMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. **Human Schistosomiasis**. Lancet. v. 368, p 1106-1118, 2006.

HUGGINS, D.W.; MEDEIROS, L.B.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; et al. **Evolução clínica**. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). Esquistossomose mansoni. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; 1998. p. 56-74.

IBIKOUNLÉ, M.; MOUAHID, G; et al. **Freshwater snail diversity in Benin (West Africa) with a focus human Schistosomiasis**. Acta Tropica. v. 111 (1), p 28-34, 2009.

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

KAVIRATNE M., HESSE M., LEUSINK M., CHEEVER A. W., DAVIES S. J., MCKERROW J. H., WAKEFIELD L. M., LETTERIO J. J. AND WYNN T. A. **IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGFbeta independent**. J Immunol. v.173, n.6, p.4020-9, 2004.

LAMBERTUCCI JR; SILVA, L.C.S.; VOIETA, I. Esquistossomose Mansônica. In: Coura, JR, (editor). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 931-46, 2005

LEHMAN JS, MOTT KE, MORROW JRRH, MUNIZ TM, BOYER MH. Schistosoma mansoni in a rural community in northeast Brazil. **Am J Med Hyg** v.25, p.285, 1976.

LENZI, H. L. et al. **Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 93 (I), p 141-151, 1998.

LINS, R. A. B.; CAVALCANTI, C. B. L.; FILHO, J. L. S. A. et al. **A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução dos granulomas hepáticos em camundongos infectados pelo Schistosoma mansoni**. . Rev. Soc. Bra. Med. Trop, 41 (2), 173-178, 2008.

MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v. 37, p 1-15, 1995.

MONTENEGRO, S. M. L.; Et al. **Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens.** J. Infect. Dis. v 179, p 1502-1514, 1999.

MONTESANO, M. A.; COLLEY, D. G.; ELOI-SANTOS, S.; FREENAN, G. L.; SECOR, W. E. **Neonatal idiotypic exposure alters subsequent cytokine, pathology and survival patterns in experimental Schistosoma mansoni infections.** J. Exp. Med. v 189, p 637–645, 1999.

MEIRA, J. A. **Classificação Clínico-Patológico da Esquistossomose Mansônica, da Nefropatia na Esquistossomose Mansônica e sua Posição na Classificação Clínico-Patológico Desta Doença.** Revista Soc. Bra. Med. Trop. v 11, p 87-111, 1977.

METWALI, A., D. ELLIOTT, R. MATHEW, A. BLUM, AND J. V. WEINSTOCK. **IL-2 contributes to the IL-5 response in granulomas from mice infected with Schistosoma mansoni.** J. Immunol. v.150, p.536–542, 1993.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana.** São Paulo: Editora Atheneu, 11ª edição. 2010. 494 pg.

NEVES, R.H., et al. **Morphological aspects of Schistosoma mansoni adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 96 (7), p 1013-1016, 2001.

OLIVEIRA L.F.A.; MORENO E.C.; GAZZINELLI G., MARTINS-FILHO O.A.; SILVEIRA A.M.; GAZZINELLI A; MALAQUIAS L.C.; LOVERDE P.; LEITE P.M.; CORREA- OLIVEIRA R. **Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans.** Infect Immun. v.74, n.2, p.1215-21, 2006.

OLIVER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Shistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v.38, p.19-23, 1952

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Schistosomiasis**. Fact Sheet nº 115, February, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/schisto/index.html>>. Acesso em 4, Setembro, 2013.

OTERO M, LAGO R, LAGO F, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C, GÓMEZ-REINO JJ, et al.. **Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights**. FEBS Lett, v.579, n.2, p.295-301, 2005.

OTONI, A.; TEIXEIRA, A. L.; VOIETA, I. et al. **Chemokine profile in the serum and urine of patients with glomerulonephritis schistosomiasis**. J. Trop. Med, v 90(1), p 48-53, 2014.

PEARCE, E. J; MACDONALD, A. S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews, Immunology**, v.7, n.2, p.499-511, 2002.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, (1982).

RASO, P., BERNARDES, R. C., TAFURI, W. L., BOGLIOLO, L., NEVES, J. **As dimensões do granuloma causado pelos ovos do Schistosoma Mansonii no fígado humano**. Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v 12, p 1-6.1978.

RESENDES, A. P. C. et al. **Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.21, n.5, p.1392-1401, set./out. 2005.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 379.

ROGRIGUES, V. L. et al. **Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v 43(6), p 638-642, 2010.

RODRIGUES, V. L.; OTONI, A.; VOIETA, I.; Et Al. **Glomerulonephritis in Schistosomiasis Mansoni: A Time to Reappraise**. Rev. Soc. Bra. Med. Trop, v. 43(6), p 638-642, 2010.

RUDIN E, BARZILAI N. Inflammatory peptides derived from adipose tissue. **Immun Ageing**, v.2, n.1, p. 1, 2005.

SANTOS, W. L. C., DOCE, G. M. M.; OLIVEIRA, M. B.; ROCHA, P. N. **Glomerulopatia Esquistossômica e mudanças na distribuição dos padrões histológicos de doenças glomerulares em Bahia, Brasil**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v 106 (7), p 901-904, 2011.

SLEIGH AC, MOTT KE, HOFF R, MAGUIRE JH, SILVA JTP. **Manson's schistosomiasis in Brazil: 11-Year evaluation of successful disease control with oxamniquine**. Lancet, 1: 635-637, 1986.

SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; JUNIOR, F. C. F.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. **Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural**. Rev. Bras. Clin. Med. v 9 (4), p 300-307, 2011.

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

TAMAI K, ISHIKAWA H, MAUVIEL A AND UITTO J. **Interferon-gamma coordinately upregulates matrix metalloprotease (MMP)-1 and MMP-3, but not tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP), expression in cultured keratinocytes.** J Invest Dermatol. v.104, n.3, p.384-90, 1995.

TIGGELMAN AM, BOERS W, LINTHORST C, SALA M AND CHAMULEAU RA. **Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma.** J Hepatol. v.23, n.3, p.307-17, 1995.

WARREN, W. D., J. J. FOMON, M. VIAMONTE, AND R. ZEPPA. **Preoperative assessment of portal hypertension.** Ann. Surg. v. 165, p.999–1012, 1967.

WYNN, T. A. **Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm.** Nat. Rev. Immunol. v. 4, p. 583–594, 2004.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. **Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis.** Current Opinion in Immunology, v. 7, p 505-511, 1995.

WYNN, T.A. **“Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.”** J Clin Invest. v. 117, n.3, p.524-9, 2007.



## ARTIGO ORIGINAL

### **Titulo: Efeitos da Dieta Hiperlipídica Sobre o Sistema Hepático na Esquistossomose Mansônica Experimental**

Autor: Glauber Melo de Araújo

Artigo a ser enviado para Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

#### **Abstract**

Schistosomiasis (MS) remains a serious public health issue and still belongs to the list of neglected diseases in Brazil with a significant socio-economic impact. It is estimated that 207 million people are infected, 500 thousand die annually and 120 million are asymptomatic. The characteristic pathological process is the presence of hepatic granuloma characterized as the body's defense reaction to egg insulation and protection against the release of their antigens. The aim of the study was to evaluate the influence of high fat diet on liver tissue in an experimental model of schistosomiasis mansoni using 35 female mice divided into 4 groups: fat diet and Infected - H + I (n = 9), Infected - I (n = 7), high fat diet - H (n = 9) and control - C (n = 10). Tissue specimens were fixed and made histological and morphometric studies as numbers, volumes and granulomas developments, as well as quantification of collagen density. The prevailing characterization of granulomatous phase (FG) was observed in group I than H + I, along with a better collagen formation in the H + I group compared to the other groups. During the study we observed the absence of steatosis in H + I group. The study showed that the presence of fat diet alters some rearrangements in granulomatous formation, leading to the need for more intense observations about the theme.

Keyword: granulomas, Schistosomiasis, Collagen, Evolutionary Features.

## Introdução

A Esquistossomose Mansônica (EM) ainda permanece sendo um grave problema de saúde pública no país. Há diversas áreas no Brasil que são consideradas endêmicas para a moléstia, como alguns estados do nordeste e sudeste, que vão desde o Rio Grande do Norte até Minas Gerais, tendo focos isolados espalhados pelo Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, constituindo importante causa de morbidade e mortalidade da população (LINS, CAVALCANTI, FILHO, 2008).

Ela está incluída na Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças negligenciadas e tem um impacto sócio - econômico significativo. Estima-se que 779 milhões de pessoas estão em constante risco de infecção e 207 milhões são infectados, dos quais 120 milhões são sintomáticos, 20 milhões desenvolvem a forma crônica e mais de 500 mil morrem a cada ano (STEINMANN et al, 2006)

O sítio anatômico predileto dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* é a vasculatura mesentérica. Os ovos são evacuados no trato intestinal junto com as fezes, podendo ficar presos principalmente na parede do intestino ou no fígado, por onde chegam através da circulação porta. Caracterizando-se, portanto, como uma doença hepato-intestinal (LAMBERTUCCI, SILVA, VOIETA, 2005).

A doença desenvolve-se principalmente devido à deposição dos ovos do verme nos tecidos do hospedeiro. O antígeno do ovo induz a formação de granuloma e fibrose, principalmente no intestino e sistema portal hepático (BOOTH, 2004; CALDAS, 2008).

Tal doença é resultante da reação inflamatória granulomatosa aos ovos do parasita localizados nos tecidos e apresenta efeito acumulativo de lesões principalmente no fígado. Os ovos excretam um antígeno solúvel responsável pelo desencadeamento de um complexo fisiopatológico reacional que promoverá a formação do granuloma. Diariamente, cada casal de *Schistosoma mansoni* pode levar, à formação de cerca de 200 granulomas: ovo + reação granulomatosa que o envolve. Estes podem apresentar-se em pontos isolados ou difusos no intestino grosso e fígado (ANDRADE, 2009).

Modelos induzidos por dietas provaram benefícios para a avaliação das alterações fisiológicas que ocorrem na patogênese de doenças. Obesidade, fatores

dietéticos e distúrbios relacionados à obesidade são algumas das alterações que buscam respostas frente a ensaios controlados em camundongos, visto que a obesidade também é preditiva de fibrose no fígado, potencialmente progredindo para doenças avançadas (WYNN, 2005).

Nesse contexto, descobre-se que a patologia EM é muito abrangente e de fonte para estudo inesgotável. Nos moldes atuais, onde o Brasil ainda é um país endêmico, fazem-se necessários maiores estudos referente à temática.

As alterações hepáticas encontradas na EM serão avaliadas frente a novas mudanças em seu metabolismo, a obesidade, em um modelo animal, a fim de verificar alterações em seus processos fisiopatológicos e observar a evolução dos granulomas hepáticos, fonte dos processos patológicos decorrentes da doença. A obesidade pode alterar os processos inflamatórios frente à EM, desta forma, modificando a reação granulomatosa hepática característica da patologia.

Pelas razões acima mencionadas, justifica-se avaliar as alterações que podem ocorrer nos órgãos hepáticos mediante novos estresses metabólicos como a obesidade em modelos experimentais com EM.

## **Material e métodos**

### **➤ Animais e infecção**

Foram utilizados camundongos fêmeas, *Swiss Webster* com pesos entre 28-30 gramas, com 28 dias de idade, mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE) de acordo com condições padronizadas de criação. Para a infecção dos camundongos foi utilizado a cepa de *Schistosoma mansoni*, Belo Horizonte – Minas Gerais (BH), mantida pelo Laboratório de Imunologia de Doenças Parasitárias e de Esquistossomose Experimental – LIKA - UFPE, através de passagens sucessivas da cepa em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*. Após obtenção de suspensão cercariana, os camundongos foram infectados via percutânea com 50 cercárias (OLIVIER, STIREWALT, 1952).

### ➤ Formação dos grupos experimentais

Estudos indicam que a fase crônica da infecção esquistossomótica em camundongos é estabelecida a partir da 12ª semana após a infecção (FALLON, 2000a; PEARCE, MCDONALD, 2002). Para o presente estudo, foi estabelecido que o tempo decorrido entre a infecção e eutanásia seria de 90 e 120 dias para avaliação da fase intermediária e crônica, respectivamente, contudo, não se obteve sucesso para os grupos da fase crônica devido a sucessivas mortes dos animais, independente da dieta utilizada, o que sugere ser provavelmente pela infecção. Assim, foram avaliados apenas os grupos da fase intermediária.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a ingestão da dieta e infecção, formado por dez animais em cada grupo. Contudo, houve perda de animais no decorrer do experimento, conforme quadro abaixo:

**QUADRO 1** - Definição dos grupos experimentais e esquema de dieta.

GRUPO	NÚMEROS	ESQUEMA DE DIETA HIPERLIPÍDICA	ESQUEMA DE DIETA PADRÃO
GRUPO EXPERIMENTO (H+I) Dieta Hiperlipídica + Infectados	09	Administrada a partir do desmame até o 90º dia após a infecção	Administrada a partir do desmame até o 90º dia após a infecção
GRUPO INFECTADO (I)	07		
GRUPO DIETA HIPERLIPÍDICA (H)	09		
GRUPO CONTROLE (C) Dieta Padrão + Não Infectados	10		

A dieta normocalórica (Padrão) foi à ração comercial para camundongos tipo Presence (Purina®), com: 19,0% de proteína, 56,0% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais, totalizando 17,03kJ/g. A dieta hiperlipídica, previamente padronizada (ESTADELLA et al., 2004), obtida de uma mistura de ração padrão tipo Presence (Purina®), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maizena na proporção 3:2:2:1. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de péletes, com: 20% de proteína, 48,0% de

carboidrato, 20,0% de lipídeos, 4,0% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais. O conteúdo energético da dieta hiperlipídica foi de 21,40kJ/g, sendo oferecida desde o desmame (28 dias) até o seu sacrifício (90 dias). Os animais dos grupos controle, livres de infecção e com dieta padrão, foram submetidos às mesmas condições que os demais grupos experimentais. Decorrido o tempo de tratamento de cada grupo, os animais foram eutanasiados utilizando anestesia (tiopental 200 mg.kg<sup>-1</sup>), seguindo as recomendações da publicação NIH n.85-23.

#### ➤ **Estudo histopatológico e morfométrico**

Fragmentos (quatro em média) de fígado de cada animal foram fixados em formaldeído a 10% tamponado em PBS (tampão fosfato salino) e processados para inclusão em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura. Para cada amostra de tecido hepático foram confeccionadas duas lâminas histológicas, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) (JUNQUEIRA; BIGNOLOS e BRENTANI, 1979). A coloração de TM foi empregada para a mensuração do diâmetro médio dos granulomas viáveis (com ovo, ou vestígio de ovo central) e do número médio de granulomas capturados em cinco campos aleatórios (área total de campo = 12.234 µm<sup>2</sup>, área total visualizada = 61.170µm<sup>2</sup>) em amostras histológicas de cada animal por subgrupo. Para obtenção das imagens das amostras foi utilizado microscópio óptico acoplado a câmera digital e sistema computadorizado com linguagem orientada para leitura de imagem pelo software Motic Images Plus 2.0 ML®.

#### ➤ **Número de granulomas**

A determinação da média do número de granulomas foi desempenhada nas lâminas coradas com HE. A contagem de granulomas foi realizada em cinco campos selecionados aleatoriamente, por animal.

#### ➤ **Evolução dos Granulomas**

Para obtenção das fases granulomatosas pré-estabelecidas foi adotado o modelo proposto por Lenzi et al (1998) que divide em três estágios: A Fase Pré-Granulomatosa (FPG), caracterizada pela pouca quantidade e desorganização de eosinófilos na periferia do ovo; a Fase Granulomatosa (FG) que corresponde à organização e aumento no número de eosinófilos peri-granuloma; e a Fase de Cura

por Fibrose (FCF) observada pela diminuição dos eosinófilos, mas aumento na quantidade de colágeno na região próximas ao granuloma.

➤ **Volume dos granulomas**

O diâmetro de todos os granulomas viáveis (contendo ovo ou vestígio de ovo) encontrados em 10 campos aleatórios foi mensurado em cada animal. Ao atribuir uma forma esférica aos granulomas, os raios obtidos a partir de seus diâmetros foram aplicados à fórmula utilizada para calcular o volume da esfera para obtenção dos granulomas, o volume dos granulomas.

$$V = R^3 \times \text{Pi} \times 4/3$$

R = raio

Pi = 3,14

➤ **Determinação do percentual de colágeno**

A fibrose foi determinada morfometricamente por meio da medição da intensidade de fibrose em 15 imagens digitais obtidas das lâminas coradas com Tricrômico de Masson de cada animal. A intensidade de fibrose foi quantificada com a utilização de um software de manipulação de imagens (GIMP 2.8.10).

O software permite a marcação do tecido fibrótico diferenciado em cor azul pelo Tricrômico de Masson que é seletivo para as fibras colágenas, e em seguida fornece automaticamente o percentual de tecido marcado.

➤ **Análise Estatística**

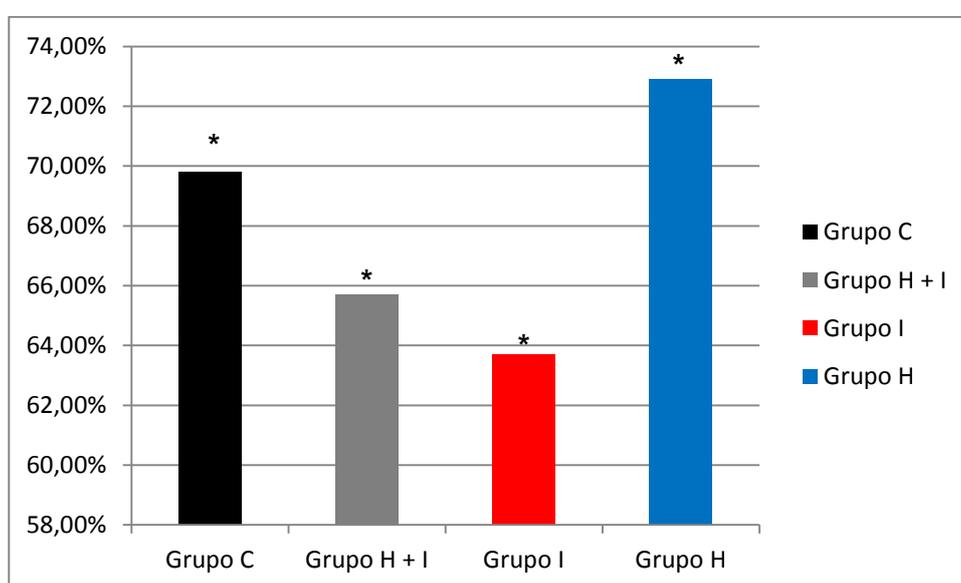
Foram utilizados testes e programas estatísticos específicos (GraphPad Prism 6.0) para comparar diferenças entre os grupos e subgrupos com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para todos os casos.

## Resultados e Discussão

No decorrer do estudo ocorreram algumas perdas de animais, independente dos grupos, o que justifica o período de escolha da infecção esquistossômica na fase intermediária (90 dias de infecção).

### Análise Ponderal

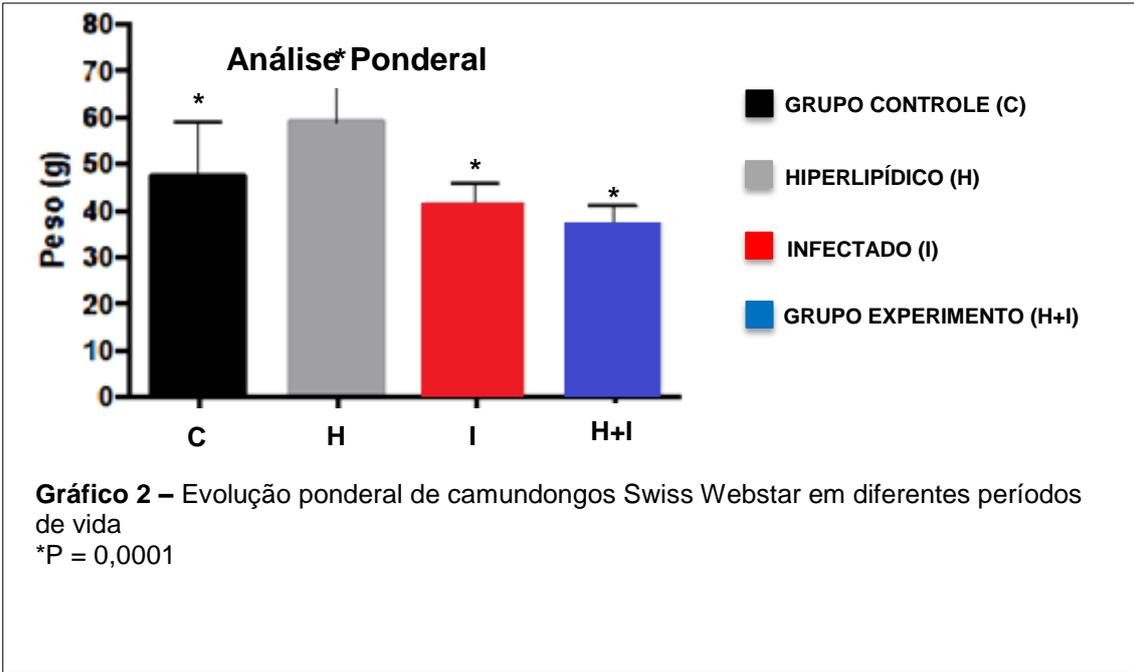
Foi realizada verificação semanal dos pesos dos grupos separados conforme tipo específico de dieta e infecção (Gráfico 1).



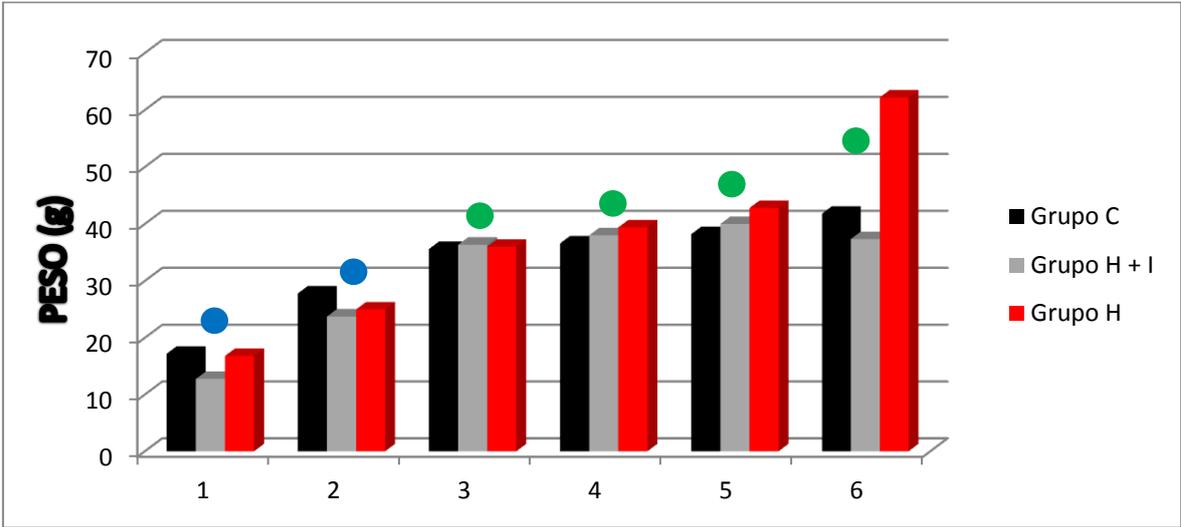
**Gráfico 1:** Análise da porcentagem do ganho de peso final entre os grupos.  
\*Média de peso inicial e final (data do Sacrifício).

Observou-se o ganho de peso dos animais com dieta hiperlipídica e a perda de peso nos animais infectados comparando-se todos os períodos dos estudos, antes e após infecção.

O peso médio dos grupos (Gráfico 2) foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) quando comparados o grupo C ao H+I, que obteve ganho de peso inicial equivalente aos demais até a iniciação da dieta hiperlipídica. Identificou-se diferença estatística maior ( $P > 0,05$ ) entre os grupos I e C (6) e H+I e I (4) e significativamente menor ( $P < 0,05$ ) entre H e C (12), H+I e C (10), I e H (18) e H+I e H (22).



O ganho de peso para os grupos com dietas hiperlipídica H e H+I seguiu padrões normais na evolução do experimento diminuindo a curva de evolução ponderal do grupo H+I após uma semana de infecção, não seguiu a mesma evolução do grupo H (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Amostra ponderal semanal entre os períodos pré-infecção e pós-infecção.  
● Pré-infecção  
● Pós-Infecção

Os presentes achados demonstraram que a dieta hiperlipídica causou sobrepeso e esteatose nos camundongos. O fígado desempenha várias funções essenciais para o organismo, incluindo absorção de gordura da dieta.

A consequência metabólica da ingestão de uma dieta hiperlipídica é o desenvolvimento de doença hepática gordurosa ou esteatose, uma condição histopatológica caracterizada pelo acúmulo excessivo de lipídios, principalmente triglicerídeos, dentro dos hepatócitos (BERTOLANI e MARRA, 1998).

Obesidade induzida por dieta causa diminuição do gasto de energia associado a uma baixa sensibilidade à leptina o que poderia explicar os presentes resultados de ganho de massa corporal (DUAN, 2013).

Estudos demonstraram que a leptina está positivamente associada ao peso corporal total e ao acúmulo de gordura nos órgãos em ratos (HANDJIEVA-DARLENSKA, 2009). O papel da leptina na regulação do acúmulo de gordura está bem estabelecido (AHREN et al, 1997; BECK et al, 2002; COOLING et al, 1998; FAM et al, 2007; STRICKER-KONGRAD et al, 1998).

### **Estudo Histológico**

Os camundongos não infectados e alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram acúmulo de lipídios que causou danos aos hepatócitos e consequente perda da identificação dos sinusoides hepáticos, o que não foi possível visualizar nos camundongos infectados alimentados com dieta hiperlipídica e nos alimentados com dieta padrão, independente da infecção. Os fígados dos grupos infectados I e H+I exibiram granuloma esquistossomótico (Figura 4).

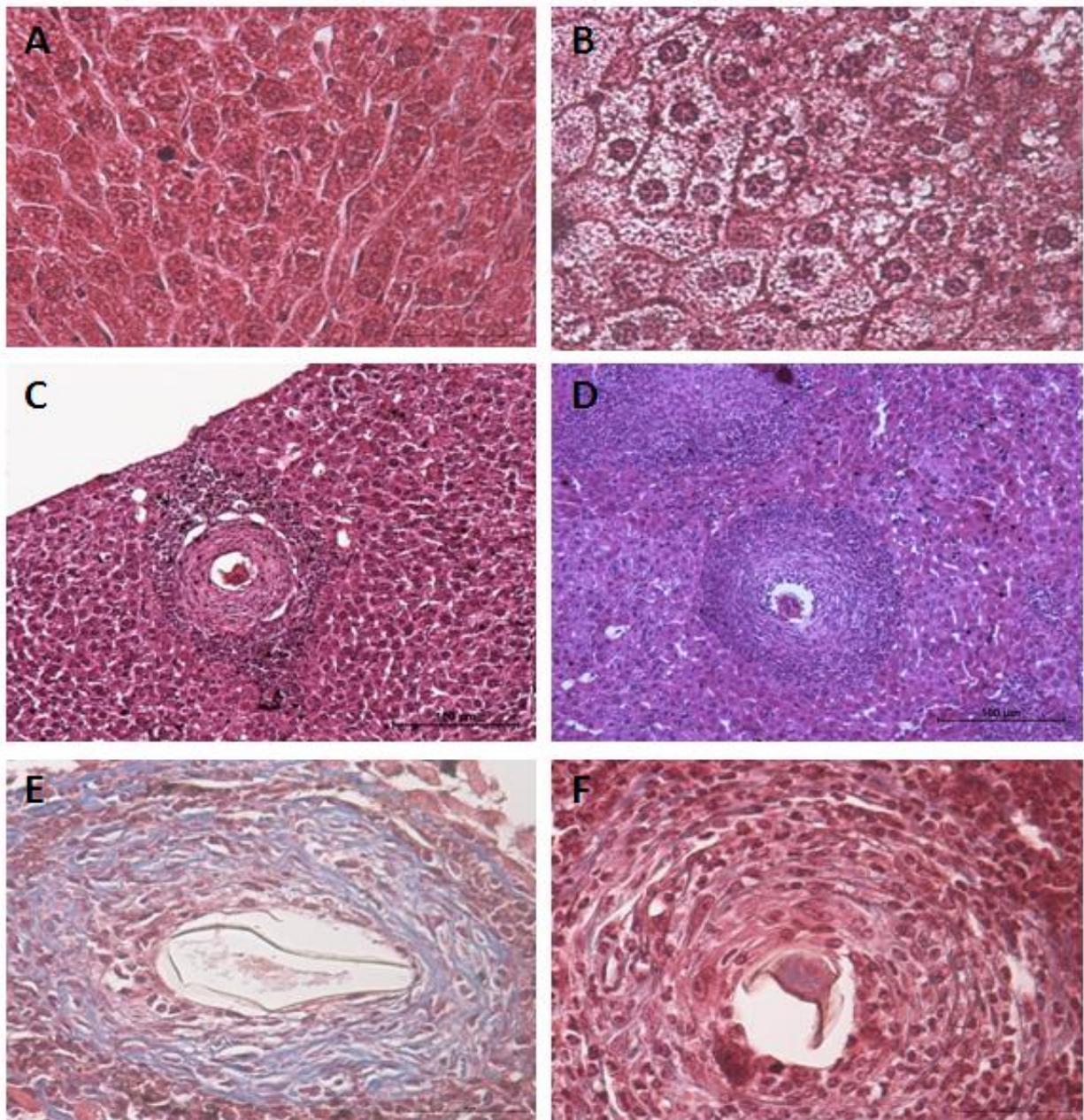
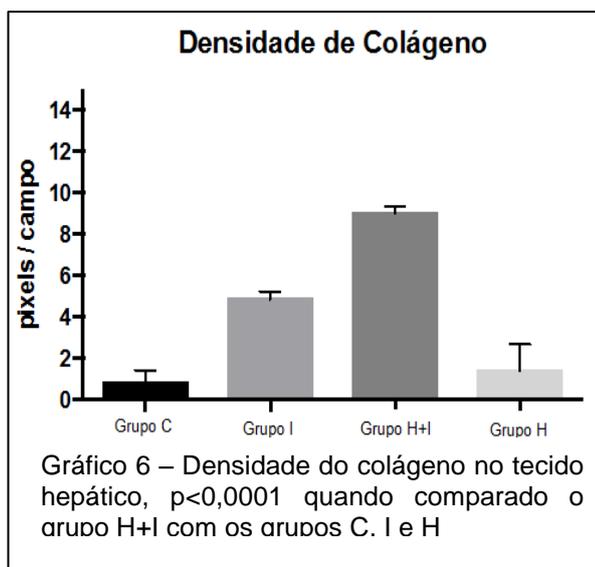
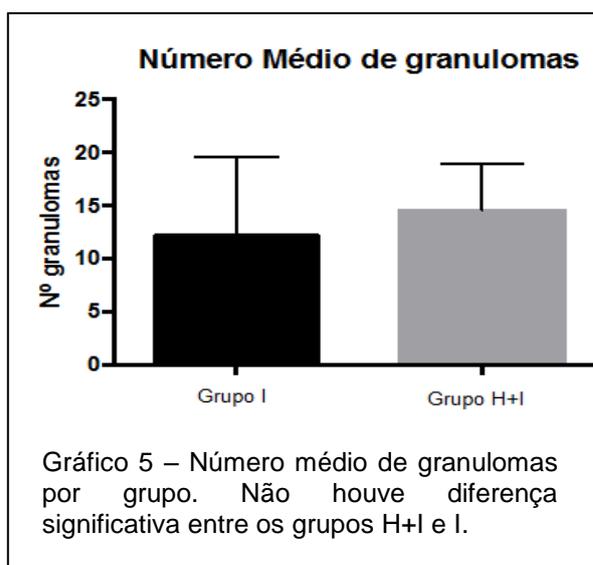
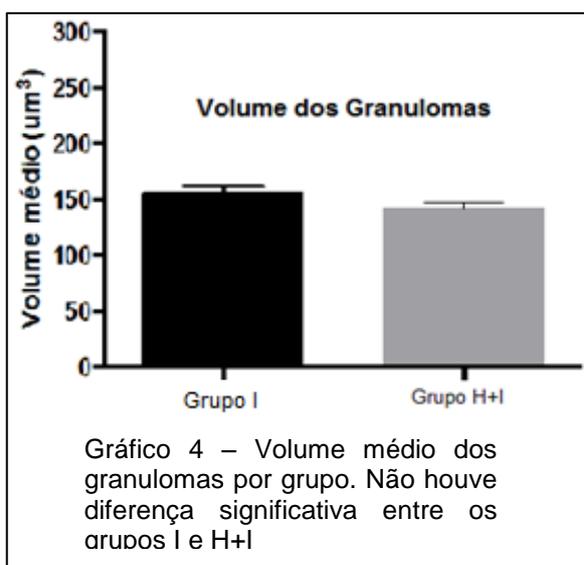


Figura 4 – Microfotografias do tecido hepático dos animais alimentados com dieta padrão (A, D e F) ou dieta hiperlipídica (B, C e E), coradas com hematoxilina-eosina (C e D) e Tricrômico de Masson (A, B, E e F). **A:** visão do fígado dos camundongos não infectados alimentados com dieta padrão (grupo SD), mostrando hepatócitos e os sinusoides hepáticos entre eles; **B:** visão do fígado dos camundongos não infectados alimentados com dieta hiperlipídica (grupo H). Os hepatócitos estão mais pálidos e maiores devido a esteatose micro e macrovesicular; **C:** visão de um granuloma circundando o ovo do *Schistosoma mansoni*. Apesar da dieta hiperlipídica, os camundongos do grupo H+I não demonstrou alto grau de esteatose como o grupo H. **D:** visão do granuloma esquistossomótico do grupo C; **E:** visão do granuloma esquistossomótico do grupo H+I rodeado por fibras colágenas coradas pelo Tricrômico de Masson; **F:** visão do granuloma esquistossomótico do grupo C, mostrando uma quantidade bem menor de fibras colágenas em comparação ao grupo H+I.

## Estudo dos Granulomas

Não houve diferença significativa no número e volume dos granulomas entre os grupos H+I e I ( $p > 0,05$ ) (Gráfico 4 e 5).

O percentual de colágeno aumentou significativamente ( $p < 0,0001$ ) nos camundongos infectados alimentados com dieta hiperlipídica (H+I), quando comparado aos camundongos infectados alimentados com dieta padrão (I) e aos outros grupos (Gráfico 6).



Os parâmetros morfométricos analisados aos 90 dias de infecção (número e volume dos granulomas) não diferiram estatisticamente entre os camundongos infectados alimentados com dieta hiperlipídica e os camundongos infectados

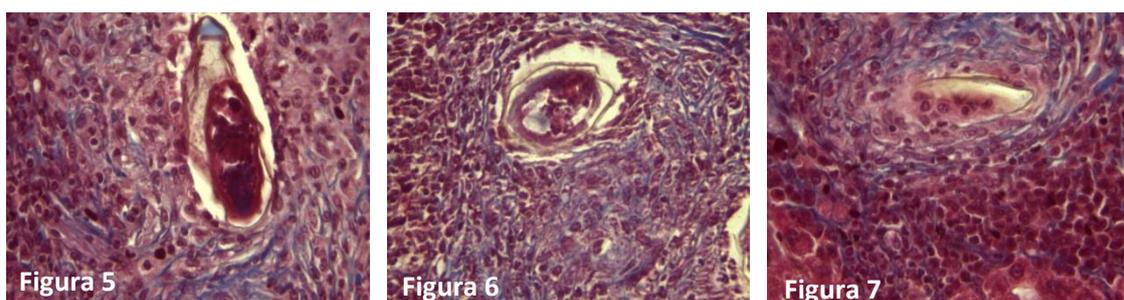
alimentados com dieta padrão. Nesse estudo, esses parâmetros apresentaram uma alta variabilidade dentro de cada grupo, o que pode ter contribuído para a semelhança entre eles.

A quantidade de fibrose foi maior nos camundongos infectados alimentados com dieta hiperlipídica, quando comparado com os camundongos infectados alimentados com dieta padrão o que pode ser explicado pelos níveis aumentados de leptina em camundongos que se alimentam de dieta hiperlipídica (PROCACCINI, 2010). A leptina, um hormônio de 16kDa secretado pelo tecido adiposo branco (PAZ-FILHO et al, 2010), foi a primeira adipocitocina diretamente associada com a fibrose hepática (DUAN et al, 2013; MARRA et al, 2011; BERTOLINI et al, 2010). No fígado, a leptina transmite propriedades fibrogênicas através de sua interação com as células estreladas do fígado ativadas, que, após ativação, é responsável pela fixação da matriz extracelular no Espaço de Disse no fígado (ZHOU et al, 2014). Possíveis mecanismos para o efeito fibrogênico da leptina são estímulo de citocinas específicas, como a TGF $\beta$ , modulação da resposta imune por células T e/ou estimulação direta de vias de sinalização celular resultando em modificações em fatores de transcrição que ativam a formação de colágeno (JAMES et al, 1998). Em resumo, leptina promove proliferação de fibroblastos, migração, vasoconstrição e secreção de moléculas da matriz extracelular, amplia a ação de citocinas profibrogênicas chaves, como a TGF $\beta$ , e regula positivamente o inibidor tecidual da metaloproteinase I (TIMP-I), tanto in vivo quanto in vitro. Entretanto, a leptina não é a única substância profibrogênica que possui essas propriedades.

Embora existam evidências de que a dieta hiperlipídica induz esteatose, inflamação e fibrose hepática, nossos resultados demonstraram que a dieta hiperlipídica por si só não foi capaz de levar a um quadro de fibrose hepática no período estudado, já que os camundongos não infectados alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram um pequeno percentual de deposição de colágeno, o que nos faz acreditar que as consequências do consumo de uma dieta hiperlipídica são mais prejudiciais quando há alguma lesão hepática associada, como a esquistossomose mansoni.

Ao analisar com detalhes os cortes histológicos perante a evolução do granuloma hepático e revisar a literatura, adotou-se neste trabalho uma classificação sugerida por Lenzi et al (1998) que divide os granulomas em fases evolutivas de infecções, características em todas as respostas imunológicas, que são assim divididas: Fase Pré-Granulomatosa (FPG), Fase Granulomatosa (FG) e Fase de Cura por Fibrose (FCF).

A morfologia de todas as fases é dependente da localização do ovo. Na FPG o antígeno atrai poucas células inflamatórias em sua volta e desorganizadas, montando todo um aparato inflamatório (Figura 5). Na FG as células estão bem dispostas e organizadas em grande densidade na periferia e no centro do granuloma (Figura 6) e na FCF forma-se uma faixa espessa de fibras entre o ovo e as células inflamatórias e os eosinófilos podem ser encontrados no centro, dentro ou ao redor do granuloma que pode involuir, desaparecer ou calcificar (Figura 7).



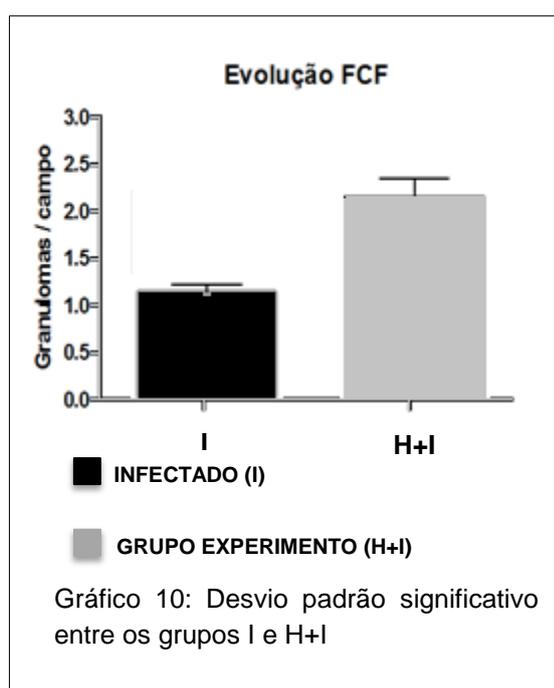
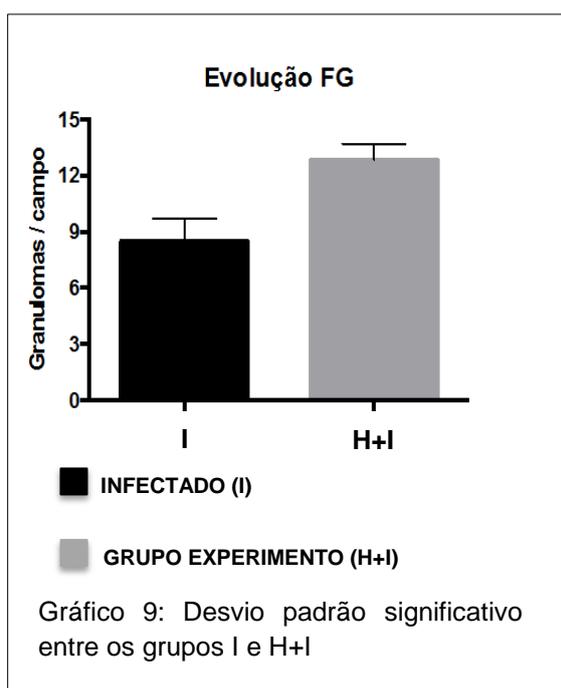
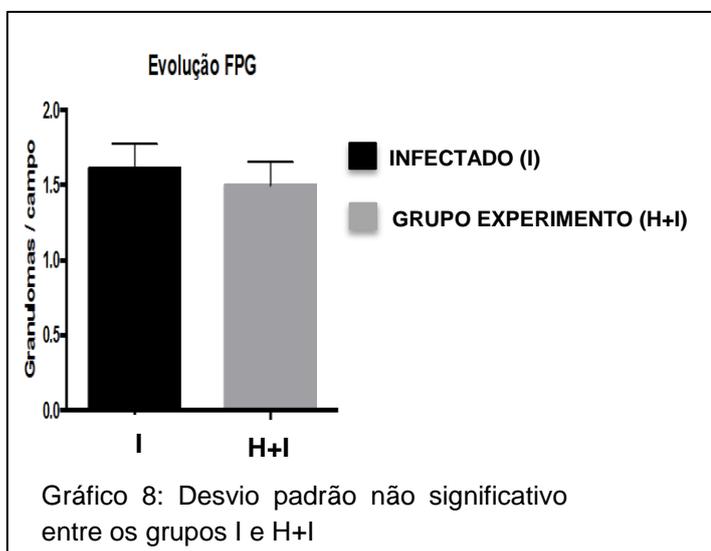
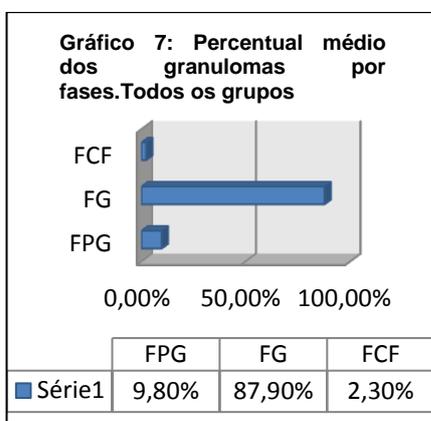
**Figura 5, 6 e 7:** Evolução dos Granulomas, 400x. Mostra as características morfofisiológicas dos aspectos dos granulomas em determinados períodos da infecção.

De acordo com Lenzi et al (1998) o principal papel da reação granulomatosa na esquistossomose é proteger os tecidos do hospedeiro, isolando as toxinas em potencial secretadas pelo ovo. Após a deposição dos ovos nos tecidos, eles são rapidamente cercados por infiltrados de células inflamatórias, resultando no granuloma. Esse é um processo dinâmico em que o tamanho e a composição celular das lesões variam com o tempo e é coordenado pela influência de uma rede de mediadores inflamatórios (COLLON, 2005; WYNN e CHEEVER, 1995).

No estudo a diferença significativa entre os grupos H+I e I a respeito da FPG apresentou um desvio padrão não significativo (Gráfico 8) justificado pelo fato do período de infecção característico dos grupos ser o intermediário e de seus quadros

nutricionais (um com dieta hiperlipídica e outro com dieta padrão). Em seu estudo, Mariano (1995) relatou que a FPG é muito evidenciada em experimentos com desnutrição, sendo observados poucos processos em evoluções com o grupo I e com H+I, correspondendo a 9,8% dos casos. Porém, o estudo revelou um predomínio na FG de 87,9% em ambos os grupos e de 2,3% na FCF (Gráfico 7).

Os granulomas da FG foram mais prevalentes no grupo H+I em relação ao grupo I (Gráfico 9) tendo desvio padrão significativo ( $p < 0,05$ ). Mesmo sendo poucos observados, os granulomas da FCF foram comuns no grupo H+I do que o I (Gráfico 10) tendo o desvio padrão significativo ( $p < 0,05$ ).



## Conclusões

Diante dos dados relatados, onde seu principal objetivo foi trabalhar a forma do granuloma e nutrição do HD que possui um novo paradigma atual, a dieta hiperlipídica que pode levar a obesidade, foi observado que os padrões já muito antes descritos continuam a seguir sua via normal de patogenicidade, contudo novos achados decorrentes do excesso de gordura alimentar foram encontrados.

O padrão de peso ponderal foi o esperado, sendo evidenciada a diminuição de peso para os animais do grupo H+I, característico da doença, em relação ao grupo H e I, porém, achados microscópicos dos granulomas podem sugerir algumas hipóteses visto que os animais foram induzidos a dieta hiperlipídica.

Lenzi et al (1998) descrevem a configuração das respostas imunológicas e consequente formação dos granulomas em camundongos desnutridos. Destarte, deparamos com achados diferentes deste estudo, onde foi encontrado um período evolutivo prevalente na FG em todos os grupos estudados e não predominante de FCF. O grupo H+I possui um total de média ponderal de granulomas na FG maior do que o grupo I evidenciando que a presença de dieta hiperlipídica corrobora com a formação do granuloma na fase intermediária da doença.

O estado morfométrico do granuloma evidenciou uma melhor formação de colágenos no grupo H+I em relação aos restantes dos grupos, o que reporta mais uma vez a presença de dieta hiperlipídica na ajuda da formação daqueles visto que o colágeno é muito importante na formação do tipo de granuloma, consequentemente, na não liberação dos antígenos liberados pelos ovos.

A FCF é caracterizada pelo aumento quantitativo de fibras colágenas (LENZI et al, 1998) e observou-se uma quantidade maior de colágeno no grupo H+I comparado ao grupo I, o que evolui de acordo com o trabalho.

Outro achado significativo foi à presença da esteatose nos fígados que estavam infectados e com dieta hiperlipídica dos que tinham a mesma dieta e não infectados. A não presença de vesículas gordurosas nos fígados dos grupos H+I pode ser observada em dois parâmetros: A doença retirou esse acúmulo de triglicerídeos dos hepatócitos ou o processo patológico em hospedeiros submetidos

a dietas hiperlipídicas atrapalha o acúmulo destas as células, portanto, sendo um aliado para a não formação de esteatose hepática, processo este que pode piorar a função hepática junto dos granulomas.

Os padrões para a formação dos granulomas hepáticos já é descrito e conhecido há tempos, conforme relata Coelho (1955) em seu estudo a cerca da formação granulomatosa que descreve o mesmo sendo uma estrutura que possui forma diversa dependendo de alguns fatores, entre eles estão: a sua fase evolutiva (tempo ou período de sua evolução) e estado de reatividade do organismo (Nutrição do hospedeiro definitivo - HD).

Notoriamente, evidencia-se um avanço no conhecimento de novas temáticas para o estudo do granuloma hepáticos, comparados a temas que abordavam amostras desnutridas, sendo este estudo elaborado para uma nova vertente de evoluções patológicas – a dieta hiperlipídica – fruto da nova realidade de nossa população que cada vez mais vem aumentando seu peso e propensa a novas abordagens de pensamentos e estudos.

Contudo, faz-se necessária uma expansão das técnicas utilizadas no estudo utilizando métodos histoquímicos para abordagem de células e mediadores inflamatórios e comparações com amostras desnutridas e dietas hiperlipídicas.

## Referências

- AHREN, B., MANSSON, S., GINERRICH, R.L., HAVEL, P.J. (1997): **Regulation of plasma leptin in mice: Influence of age, high-fat diet, and fasting.** Am J Physiol, 42, R113-R120.
- ANDRADE, Z. A.; **Schistosomiasis and liver fibrosis.** Parasite Immunology. v 31, p 656-663, 2009.
- BECK, B., MUSSE, N., STRICKE R., KRONGRAD, A. (2002): **Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in Long-Evans rats.** Biochem Biophys Res Commun, 292, 1031-1035.
- BERTOLANI, C., MARRA, F. **Role of adipocytokines in hepatic fibrosis.** Curr. Pharm. Des. v. 16, 1929–1940, 1998.
- BOOTH, M.; MWATHA, J. K.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; Et al. **Periportal Fibrosis in Human Schistosoma mansoni Infection Is Associated with Low IL-10, Low IFN- $\gamma$ , High TNF , or Low RANTES, Depending on Age and Gender.** J. Immunol. v. 172, p 1295-1303, 2004.
- CALDAS, I. R.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; OLIVEIRA, L. F.; SILVEIRA, A. M. S.; Et al. **Human Schistosomiasis Mansoni: Immune Responses During Acute and Chronic phases of the infection.** Acta Tropical. v. 108, p. 109-117, 2008.
- CHEEVER, A. W. et al. **Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with Schistosoma mansoni.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 37, p. 85-97, 1987
- COELHO, R. B. **Patologia da Esquistossomose Mansônica: Comportamento do ovo do Schistossoma Mansone.** Inst. Ageu Magalhães, v. 4, p 61-71, 1955.
- COLLON, C. P. **Schistosomiasis Medicine.** v. 31, p 64-67, 2005.

COOLIN, J., BARTH, J., BLUNDELL, J. **The high-fat phenotype: is leptin involved in the adaptive response to a high fat (high energy) diet?** *Int J Obesity*, **22**, 1132-1135, 1998.

DUAN, X.F. et al. **Obesity, adipokines and hepatocellular carcinoma.** *Int. J. Cancer* **133**, 1776–1783, 2013.

ESTADELLA D, OYAMA LM, DÂMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, n.2, p.218-24, 2004.

FALLON, P.G., RICHARDSON, E. J., MCKENZIE, G. J., MCKENZIE, A. N.; **Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent.** *J. Immunol.* v 164, p 2585–2591, 2000.

FAM, B.C., MORRIS, M.J., HANSEN, M.J., KEBEDE, M., ANDRIKOPOULOS, S., PROJETTO, J., THORBURN, A.W. **Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity.** *Diab Obes Metab*, v. **9**, p 840-852, 2007

HANDJIEVA-DARLENSKA and N. BOYADJIEVA. **The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats.** *J Physiol Biochem*, v. **65** (2), 157-164, 2009.

JAMES, J.; POTTER, R.; LYNDIA R. T.; MEZEY, E. **Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration.** *Journal of Hepatology* **38**, p 281–288, 1998.

LAMBERTUCCI JR; SILVA, L.C.S.; VOIETA, I. Esquistossomose Mansônica. In: Coura, JR, (editor). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**; 2005. p. 931-46.

LENZI, H. L. et al. **Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 93 (I), p 141-151, 1998.

LINS, R. A. B.; CAVALCANTI, C. B. L.; FILHO, J. L. S. A. et al. **A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução dos granulomas hepáticos em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.** . Rev. Soc. Bra. Med. Trop, 41 (2), 173-178, 2008.

MARIANO, M. **The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v. 37, p 1-15, 1995.

MARRA, F. et al. **Modulation of liver fibrosis by adipokines.** Dig. Dis. v. 29, p 371–376, 2011.

OLIVER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Shistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v.38, p.19-23, 1952.

PEARCE, E. J; MACDONALD, A. S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews, Immunology**, v.7, n.2, p.499-511, 2002.

PROCACCINI, C. et al. **Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD.** Curr. Pharm. Des. v. 16, 1902–1912, 2010.

PAZ-FILHO, G. et al. **Congenital leptin deficiency: diagnosis and effects of leptin replacement therapy.** Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. v. 54, p 690–697, 2010.

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

STRICKER-KONGRAD, A., CUMIN, F., BURLET, C., BECK, B. **Hypothalamic neuropeptide Y and plasma leptin after long-term high-fat feeding in the rat.** *Neurosci Lett*, v. 254, p 157-160, 1998.

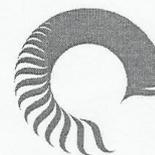
WYNN, T.A. **“Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.”** *J Clin Invest*. v. 117, n.3, p.524-9, 2007.

ZHOU, Q. et al. **GATA binding protein 2 mediates leptin inhibition of PPARgamma1 expression in hepatic stellate cells and contributes to hepatic stellate cell activation.** *Biochim. Biophys. Acta* v.1842, p 2367–2377, 2004.



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, 17 de julho de 2012.

Ofício nº 450/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Melissa Papaléo Rocha de Lima**  
Departamento Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde-LIKA-UFPE  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.021000/2012-15

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, "**Influência do álcool e da obesidade na inflamação granulomatosa hepática na Esquitossomose Mansonii Experimental**".

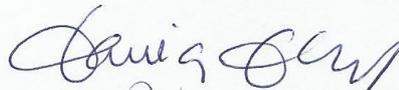
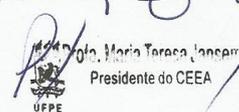
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals 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 LIKA-UFPE; Animais: Camundongos; Linhagem: Camundongos Albinos; Sexo: machos; Número de animais previsto no protocolo: 120 Camundongos; Peso: 28g; Idade: 28 dias.

Atenciosamente,

  
  
Presidente do CEEA

## **Normas para Publicação**

Escopo A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, multidisciplinar, com acesso aberto, que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados.

A preferência para publicação será dada a artigos que relatem pesquisas e observações originais. A revista possui um sistema de revisão por pares, para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. A Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é publicada em Inglês, com o título dos artigos, resumo e palavras-chaves em Inglês e Português. Política de avaliação Os manuscritos submetidos com vistas à publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria quanto à adequação às normas. Em seguida, serão encaminhados para, no mínimo, dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado (revisão por pares), os quais serão utilizados pelos editores para decidir sobre a aceitação, ou não, do mesmo. Em caso de divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado para um terceiro relator para fundamentar a decisão editorial final.

Tipos de Manuscrito A revista convida à publicação Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas ao Editor, Suplementos e Obituários.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico. Estes requisitos estão de acordo com BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)) e do Workshop ICTPR. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo e referências); resumo com até 250 palavras, estruturado com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões, contendo também em Português título, resumo e palavras-chaves. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e

não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Devem ter resumo com até 250 palavras, máximo de 3.500 palavras, cinco ilustrações (tabelas e figuras), com a mesma formatação do artigo original.

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, com título em português, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências. Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. Não deve exceder quatro páginas impressas, com no máximo 2.000 palavras, mesma formatação do artigo original, incluindo o resumo e abstract estruturados com os subitens introdução, métodos, resultados e conclusões, e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Um resumo com não mais que 100 palavras e até três palavras-chaves abaixo do resumo devem ser fornecidos. Não colocar no corpo do manuscrito os tópicos introdução, métodos, resultados, discussão e conclusões. Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras, com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo e abstract não estruturados e com no máximo 100 palavras, e de três palavras-chaves, contendo também título resumo e palavras-chaves em Português.

Colocar no corpo do manuscrito os tópicos Introdução, Métodos, Relato do Caso, Discussão e Referências. Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de experts. Será considerado, se formatado como um editorial. Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Apenas três autores e três referências (não citadas no texto) sem agradecimentos são permitidos.

O tamanho máximo é de 250 palavras com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras também em português. Suplementos: podem ser anais de um simpósio ou um congresso. Propostas relacionadas com a adequação do tema, organização do programa e a produção devem ser feitas por escrito para o Editor e / ou Editor Convidado. Obituários: devem ser escritos por um colega de profissão, e destacar o

perfil científico e a contribuição do profissional falecido. Preparação do Manuscrito Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores se reservam o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções. Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão on-line .

A carta de apresentação deve conter uma declaração assegurando que o material não foi publicado ou está sob consideração por outro periódico científico. O autor deve escolher dentro do item Diretriz para Submissão (item 3.7) uma categoria para o manuscrito (Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Obituários e Cartas ao Editor, ou outros quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas).

A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores. Edição da Pré-Submissão: se a sua primeira língua não é o Inglês, para garantir que o conteúdo científico de seu manuscrito será compreendido pelos editores da revista e revisores, todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deve ser em Inglês. A escrita e os custos de edição de texto será de responsabilidade dos autores.

Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de região diferente da dos autores. Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 70 caracteres. Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser

subdivido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. Palavras-chaves: 3 a 6 itens devem ser listados em Inglês e Português, imediatamente abaixo do resumo estruturado. Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado.

Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância. Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas. Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações. Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa. Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo. Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa. Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados).

Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, separado por vírgula (Ex.: Mundo<sup>1,2,3</sup>; Vida<sup>30,42,44-50</sup>). As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>).

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no “Index Medicus” (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>). Alguns exemplos de referências: Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. In vitro enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998;55:697-701. Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-80. Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998. Figuras: devem preferencialmente ser submetidas em alta resolução no formato TIFF. As figuras devem ser colocadas em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (ex.: Figura 1; Figura 2). Certifique-se que as mesmas têm uma resolução mínima de 300dpi. Fotografias: devem ser enviadas com boa resolução (mínimo de 300dpi) no formato TIFF, preferencialmente, preparadas utilizando o Adobe Photoshop. Gráficos: criados usando Microsoft Word ou Excel, devem ser salvos com a extensão original (.doc ou .xls). Eles não devem ser copiados ou colados de um programa para o outro. Mapas e Ilustrações: devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os softwares CorelDraw ou Illustrator em alta resolução, e suas dimensões não devem ter mais que 21,5 x 28,0cm.

Imagens: produzidas em software estatístico devem ser convertidas para o formato Excel ou PowerPoint. Caso não seja possível, converter o arquivo para o formato TIFF com resolução de 300dpi, e enviar juntamente com o arquivo no formato original. Legendas: nas figuras, as legendas devem ser digitadas juntas com espaçamento duplo em uma folha separada e no final do manuscrito. Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores. Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento duplo, com um título curto e descritivo e submetido

online em um arquivo separado. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo, com notas de rodapé logo abaixo. Tabelas devem ter no máximo 17cm de largura. Processo de Envio: a partir de 21 de Outubro de 2009, os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://submission.scielo.br/index.php/rsbmt/login>, seguindo as instruções no topo de cada tela.

A partir desta data o processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica. Sobre Re-envio e revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores. Re-envio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito. Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito. Após a aceitação: quando o trabalho for aceito para publicação, os autores devem fornecer: Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, assinado pelo autor correspondente. Provas: serão enviadas ao autor correspondente para que o texto seja cuidadosamente conferido. Mudanças ou edições ao manuscrito editado não serão permitidas nesta etapa do processo de edição. Os autores deverão devolver as provas corrigidas dentro de quatro dias após serem recebidas. Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo o cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.

Os artigos aceitos remanescentes a cada número da revista serão disponibilizados on line enquanto aguardam a prioridade para publicação na versão impressa. Re-impressões: a revista fornece ao autor, gratuitamente, excertos do artigo em formato PDF, via e-mail. Custos de Publicação: Não haverá custos de

publicação. A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução, são de responsabilidade dos autores. A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não fornece qualquer tipo de serviço de tradução. Custos de publicação de imagens coloridas, são de responsabilidade dos autores.