



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

DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA

**INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* ASSOCIADA À DIETA
HIPERLIPÍDICA: RESPOSTA IMUNE, PATOLOGIA HEPÁTICA E
MICROBIOTA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS**

RECIFE
2017



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

DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA

**INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* ASSOCIADA À DIETA
HIPERLIPÍDICA: RESPOSTA IMUNE, PATOLOGIA HEPÁTICA E
MICROBIOTA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Co- orientador: Prof^º Dr^º Fábio André Brayner dos Santos

RECIFE
2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

O481 Oliveira, Danielly Cantarelli de.
Infecção pelo *Schistosoma mansoni* associada à dieta hiperlipídica: resposta imune, patologia hepática e microbiota intestinal em camundongos / Danielly Cantarelli de Oliveira. – 2017.
91 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.
Inclui referências e anexos.

1. Esquistossomose. 2. Dieta Hiperlipídica. 3. Imunidade. 4. Microbioma Gastrointestinal. I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-125)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA

**INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* ASSOCIADA À DIETA HIPERLIPÍDICA:
RESPOSTA IMUNE, PATOLOGIA HEPÁTICA E MICROBIOTA INTESTINAL EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 29/09/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Bruno Henrique Andrade Galvão (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Prof^ª. Dr^ª. Érika Michele Correia de Macêdo (Examinadora Externa)
Centro Acadêmico de Vitória (CAV/UFPE)

Prof^ª. Dr^ª. Vladia Maria Assis Costa (UFPE)

*Aos meus pais Leonardo e Mirene e ao meu
esposo Danilo, por todo amor, incentivo e apoio,
e à minha filha Clara, por ser a minha motivação
em busca do melhor...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua grandiosa presença em todos os momentos;

Aos meus pais, Leonardo e Mirene, por todo amor dedicado, pelo incentivo diário e pelos ensinamentos fundamentais na formação da minha personalidade, sempre prezando pela ética e responsabilidade;

Ao meu esposo Danilo, por todo o carinho, paciência, compreensão, incentivo e apoio.

À minha filha Clara, por simplesmente existir e transformar tudo em alegria, e por me motivar a ser a cada dia uma pessoa melhor;

À minha orientadora, Dr^a Célia Castro, pelas oportunidades, ensinamentos, confiança e apoio durante toda a minha formação acadêmica;

Ao meu co-orientador, Dr^o Fábio Brayner, pelas suas contribuições fundamentais ao sucesso da pesquisa;

Ao meu grande amigo André Aires, por sua imensurável ajuda no planejamento e execução dos experimentos, e pela amizade cheia de amor, carinho, risos e descontração, que deixaram o caminho mais leve;

Ao meu grande amigo Bruno Galvão, pelo imenso apoio, companheirismo e incentivo nos momentos mais difíceis, sempre com palavras entusiastas para que eu seguisse em frente com foco nos objetivos e pela amizade irrestrita, com muita cumplicidade, carinho, atenção e amor;

À Dr^a Virgínia Lorena, por toda a docura e disponibilidade nas análises Imunológicas;

À Dr^a Débora Pitta, por toda a disponibilidade e contribuição nas análises histológicas;

À Dr^a Maria Helena, pela grande ajuda durante os experimentos;

À Fátima Diniz, por todo ensinamento e ajuda nas análises microbiológicas;

Aos meus professores da pós-graduação em Medicina Tropical, que tanto me ensinaram e maravilharam com os seus conhecimentos;

A todos os colegas de turma, especialmente à Érica, Lilian, Armando e André, pela valiosa troca de conhecimentos e amizade além da sala de aula;

Aos colegas do LIKA, pela ajuda com os animais e na execução dos experimentos;

Aos funcionários do Biotério do CPQAM/Fiocruz, pela atenção e cooperação;

Ao apoio financeiro da FACEPE (Bolsa de doutorado e financiamento do projeto).

A todos que contribuíram para a realização desse estudo, muito obrigada!

*“Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos
gigantes”
Isaac Newton*

RESUMO

Desordens nutricionais e doenças tropicais negligenciadas tem representado um impasse na saúde pública devido a afetar populações vulneráveis. O *Schistosoma mansoni* é um parasita que possui grande dependência pelo metabolismo do hospedeiro, sendo sua patogênese fortemente influenciada pelo padrão alimentar do indivíduo. Estudos demonstram mudanças significativas no curso da esquistossomose em hospedeiros com alimentação hiperlipídica e/ou hipercalórica. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica na produção de citocinas (IL-6, TNF- α , IFN- γ), perfil lipídico, histopatologia hepática e microbiota intestinal de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Foram formados quatro grupos experimentais: camundongos alimentados com dieta hiperlipídica infectados (DHI) ou não infectados (DHNI) e camundongos com dieta padrão infectados (DPI) ou não infectados (DPNI). Os animais foram infectados percutaneamente com cercárias de *S. mansoni* após 10 semanas de administração das respectivas dietas. Aos 45 dias de infecção, foram confeccionadas lâminas parasitológicas pela técnica de Kato-katz para determinação da infecção e contagem de ovos nas fezes. Na fase aguda da infecção (60 dias), foram coletadas amostras de sangue cardíaco para análise da produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IFN- γ) e perfil lipídico. Coletou-se fragmentos do fígado para análise histopatológica e histomorfométrica dos granulomas hepáticos, fezes na região distal do intestino para análise microbiológica e realizou-se perfusão porta-hepática para determinação da carga parasitária através da recuperação de vermes adultos. Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos por média \pm DP e os resultados das variáveis qualitativas, por frequências absolutas e relativas. A significância estatística para análise das hipóteses foi de 5%. Com relação à produção de citocinas, os grupos DHI e DPI apresentaram elevação na concentração sérica das citocinas IL-6 e IFN- γ quando comparado aos controles. As concentrações de TNF- α foram maiores no grupo DPI nas comparações com os demais. Na comparação com o DPI, o grupo DHI apresentou maior densidade de ovos nas fezes ($p=0,02$), maior recuperação total de vermes ($p<0,001$) e de vermes fêmeas ($p=0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas na área média dos granulomas entre os grupos DHI e DPI, enquanto a contagem de granulomas mostrou-se elevada no DHI ($p<0,001$). Quanto às análises microbiológicas, a ordem das frequências das bactérias aeróbias encontradas foi a seguinte: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium sp.* O grupo DHI apresentou o maior percentual de bactérias Gram negativas (50%), seguido pelo DHNI (42,86%). Conclui-se que a dieta hiperlipídica promoveu elevação da carga parasitária e induziu uma maior concentração de granulomas hepáticos, no entanto não houve diferenças significativas quanto à produção de citocinas e histomorfometria dos granulomas. Quanto à microbiota entérica, os grupos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maiores percentuais de bactérias Gram negativas quando comparados aos respectivos controles.

Palavras-chave: Esquistossomose. Dieta Hiperlipídica. Imunidade. Microbioma Gastrointestinal.

ABSTRACT

Nutritional disorders and neglected tropical diseases have been a deadlock in public health due to affecting vulnerable populations. *Schistosoma mansoni* is a parasite that is highly dependent on host metabolism, its pathogenesis being strongly influenced by the nutritional status of the individual. Studies have demonstrated significant changes in the course of schistosomiasis in hosts with hyperlipidic and/or hypercaloric feeding. The aim of the present study was to evaluate the effects of a hyperlipidic diet on the production of cytokines (IL-6, TNF- α , IFN- γ), hepatic histopathology and intestinal microbiota of mice infected with *S. mansoni*. Four experimental groups were studied: infected mice fed a high-fat diet (IHFC) or standard chow (ISC), uninfected mice fed a high-fat diet (HFC) or standard chow (SC). The animals were infected percutaneously with *S. mansoni* cercariae after 10 weeks of administration of the respective diets. Body weights were evaluated weekly. At 45 days of infection, parasitological blades were prepared by the Kato-katz technique for infection determination and egg count in the faeces. In the acute phase of infection (60 days), cardiac blood samples were collected for analysis of cytokine production (TNF- α , IL-6 and IFN- γ) and lipid profile. Liver fragments were collected for histological and morphometric analysis of hepatic granulomas, stool in the distal region of the intestine for microbiological analysis and hepatic perfusion was performed to determine the parasite load through the recovery of adult worms. The results of the quantitative variables were expressed as mean \pm SD and the results of the qualitative variables, by absolute and relative frequencies. The statistical significance for analysis of the hypotheses was 5%. The IHFC group had higher faecal egg density ($p = 0.02$), higher total recovery of worms ($p < 0.001$) and female worms ($p = 0.01$) when compared to the ISC group. Regarding the production of cytokines, the IHFC and ISC groups showed elevated serum concentrations of IL-6 and IFN- γ cytokines when compared to controls. TNF- α concentrations were higher in the ISC group in comparisons with the others. The uninfected groups (HFC and SC) did not differ in relation to the production of the cytokines evaluated. No significant differences were found in the mean area of the granulomas between the ISC and IHFC groups. Already, the granuloma count was elevated in the IHFC group ($p < 0.001$). As for the microbiological analyzes, an order of frequencies of the aerobic bacteria found for the following: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium sp.* The IHFC group presented the highest percentage of Gram negative bacteria (50%), followed by HFC (42.86%). It was concluded that the hyperlipid diet promoted increased parasitic load and induced a higher concentration of hepatic granulomas, however there were no significant differences regarding cytokine production and granuloma histomorphometry. As for the enteric microbiota, the groups submitted to the hyperlipid diet presented higher percentages of Gram negative bacteria when compared to the respective controls.

Keywords: Schistosomiasis. Diet, High-Fat. Immunity. Gastrointestinal Microbiome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010-2015.	17
Figura 1.	Curvas ponderais de camundongos da 1ª até a 18ª semana de experimentação. DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média \pm DP. (n=9-12)	44
Figura 1.	Curvas ponderais de camundongos da 1ª até a 18ª semana de experimentação. DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média \pm DP.	57
Figura 2.	Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> . O esquema mostra as etapas do ciclo, no meio aquático, no hospedeiro intermediário e finalmente no hospedeiro vertebrado	19
Figura 2.	Níveis séricos de citocinas de camundongos por grupo de experimentação. DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média \pm DP.	58
Figura 3.	Figura 3 – Distribuição dos grupos de camundongos submetidos a análises.	34
Figura 3.	Granulomas hepáticos de camundongos esquistossomóticos. A. Grupo DPI - Granuloma E/EP isolado; B. Grupo DHI - Granulomas coalescidos; C. Grupo DPI -Granuloma com moderado grau de fibrose. D. Grupo DHI -Granulomas coalescidos com grau de fibrose intensa. A e B. Coloração HE. C e D. Coloração TM.	59
Figura 4.	A. Moluscos da espécie <i>B. glabrata</i> infectados, em meio aquático e sob exposição da luz artificial. B. - Camundongos anestesiados e expostos à suspensão cercariana, por via percutânea, e luz artificial	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição das dietas	33
Tabela 1.	Composição das dietas	42
Tabela 1.	Composição das dietas	54
Tabela 2.	Ganho total de massa corpórea dos camundongos por grupo	44
Tabela 2.	Dados biométricos e parasitológicos de camundongos alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica	58
Tabela 3.	Lipídios séricos segundo os grupos de comparação (mg/dL)	45
Tabela 3.	Número médio e área de granulomas hepáticos	60
Tabela 4.	Frequência absoluta e relativa das bactérias isoladas da microbiota intestinal de camundongos	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DH	Dieta Hiperlipídica
DHI	Dieta hiperlipídica infectado
DHNI	Dieta hiperlipídica não infectado
DP	Dieta Padrão
DPI	Dieta padrão infectado
DPNI	Dieta padrão não infectado
HDL	Lipoproteína de alta densidade
ICAM	molécula de adesão celular
IFN- γ	Interferon gama
IL-	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
NO	Óxido Nítrico
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
ROS	espécies reativas de oxigênio
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Esquistossomose mansônica	16
2.1.1	Aspectos epidemiológicos	16
2.1.2	Ciclo biológico	18
2.1.3	A doença	19
2.1.4	Imunopatologia	21
2.2	Obesidade	26
2.2.1	Obesidade e sistema imune	27
2.2.2	Obesidade e microbiota intestinal	29
2.2.3	Obesidade e esquistossomose	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Desenho do estudo	32
4.2	Animais, dietas e formação dos grupos de estudo	32
4.3	Avaliação da evolução ponderal	34
4.4	Obtenção das cercárias e infecção dos camundongos	34
4.5	Contagem de ovos	35
4.6	Coleta de amostras	35
4.7	Estudo da microbiota intestinal	36
4.8	Níveis de citocinas	36
4.9	Estudo histopatológico e morfométrico	37
4.10	Considerações éticas	38
4.11	Análise estatística	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Artigo 1 - Dieta hiperlipídica e esquistossomose mansônica: efeitos no perfil lipídico e na microbiota intestinal de camundongos	39
5.2	Artigo 2 - Efeitos de dieta hiperlipídica na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) e histopatologia hepática em	51

camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*

6	CONCLUSÕES	64
	REFERENCIAS	65
	ANEXO A – Certificado de aprovação do CEUA	89
	ANEXO B – Carta de submissão do artigo 1	90
	ANEXO C – Carta de submissão do artigo 2	91

1 INTRODUÇÃO

Desordens nutricionais e doenças tropicais negligenciadas tem representado um impasse na saúde pública devido a afetar populações vulneráveis (SILVA et al., 2012). O *Schistosoma mansoni* é um parasita que possui grande dependência pelo metabolismo do hospedeiro (SAULE et al., 2005), sendo sua patogênese fortemente influenciada pelo padrão alimentar do indivíduo (SOUZA et al., 2011). Estudos demonstram mudanças significativas no curso da esquistossomose em hospedeiros com alimentação hiperlipídica e/ou hipercalórica (Alencar et al., 2012; SILVA et al., 2012; HUSSAARTS et al., 2015).

Os países em desenvolvimento iniciaram uma transição nutricional, caracterizada pela redução da prevalência da desnutrição e pelo avanço da obesidade (AMUNA; ZOTOR, 2008). A obesidade é considerada um problema de saúde mundial e o aumento de sua incidência, riscos e consequências são cada vez mais preocupantes (SILVEIRA et al., 2009). Caracterizada por gerar prejuízos ao estado normal do hospedeiro, modificando funções vitais como a endócrina e imune (ALVES, 2006), pode acarretar prejuízos à competência imunológica, com aumento da susceptibilidade a infecções e inflamações (SILVEIRA et al., 2009).

Poucos estudos avaliam a associação da esquistossomose com a obesidade. Alencar et al. (2009), avaliando efeitos de dieta hiperlipídica em camundongos submetidos à infecção esquistossomótica, observaram uma maior infectividade, superior carga parasitária, com elevação da postura e viabilidade de ovos nas fezes, bem como da densidade de ovos nos tecidos, sugerindo uma maior agressividade da infecção nesse grupo de animais, quando comparados aos controles alimentados com dieta normolipídica (Neves et al., 2007; Alencar et al., 2009).

Outro trabalho, desenvolvido por Neves et al. (2007), não apontou diferenças significativas quanto à infectividade entre os grupos de camundongos alimentados com dietas hipercalórica ou normocalórica, entretanto a contagem de ovos nas fezes e nos tecidos, assim como a diversidade morfológica de granulomas hepáticos, foram superiores no grupo de animais obesos, evidenciando que a dieta com elevado teor lipídico produz efeitos na infecção pelo *S. mansoni*.

A obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica. Os níveis circulantes de muitas citocinas e proteínas de fase aguda associadas à inflamação apresentam-se elevados em pacientes obesos. O aumento da concentração das adipocinas pró-inflamatórias, destacando-se a IL-6, o TNF- α e a leptina, impacta em diversas funções corporais como

balanço energético, sistema imune, metabolismo lipídico e homeostase corporal (PRADO et al., 2009).

Na fase aguda da doença esquistossomótica a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1, observando-se a presença de células mononucleares de sangue periférico produzindo grandes quantidades de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (De JESUS et al., 2002; COURA, 2004). Apesar dos fortes indícios de que a sobreposição da obesidade à esquistossomose possa promover uma reação inflamatória mais exacerbada, não são encontrados trabalhos que avaliem o comportamento imune frente a essa associação.

Zhang et al. (2010) demonstram que a composição dietética também exerce papel determinante na modulação da microbiota intestinal, influenciando em 57% a variação da microbiota. Em ratos obesos com dieta rica em gordura observa-se mudança na microbiota intestinal (DE LA SERRE et al., 2010), com aumento de *Firmicutes* em relação aos *Bacterioides* (FLEISSNER et al., 2010). Andrade et al. (2015), após revisão sistemática da literatura, corroboram a hipótese da maior prevalência de *Firmicutes* na microbiota de obesos. Perturbações na microbiota normal podem acarretar doenças pela eliminação de organismos necessários ou por permitir o crescimento de micro-organismos inapropriados (MURRAY, 2017).

As interações entre a microbiota intestinal e a dieta são relevantes para os processos de doenças inflamatórias experimentais em modelos animais (HUFELDT et al., 2010). Lima et al (2012) observaram modificações na microbiota intestinal de camundongos esquistossomóticos, que apresentaram maior variedade e quantidade de colônias bacterianas nas coproculturas quando comparados ao grupo controle não infectado. Contudo não são encontrados estudos que avaliem a microbiota intestinal de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e expostos a uma alimentação rica em gordura.

Em virtude do contingente de pacientes obesos encontrados em áreas endêmicas para esquistossomose, torna-se relevante o desenvolvimento de estudos que visem o entendimento de mecanismos imunopatogênicos gerais desencadeados durante a infecção pelo *S. mansoni* associada a dietas indutoras de obesidade. Logo, pretende-se com esse estudo avaliar os efeitos do consumo de uma dieta com elevado teor lipídico em parâmetros da função imune, histopatologia hepática e microbiota intestinal em camundongos infectados pelo *S. mansoni*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esquistossomose mansônica

2.1.1 Aspectos epidemiológicos

A esquistossomose, doença negligenciada de grande importância e repercussão sócio-econômica, é considerada endêmica em áreas tropicais e com larga distribuição geográfica, sendo encontrada em 78 países e territórios (IBIKOUNLÉ et al. 2009). As estimativas apontam 779 milhões de pessoas sob o risco de infecção e 207 milhões de infectados em todo o mundo (OMS, 2015). As doenças infecciosas negligenciadas afetam principalmente as populações que vivem em extrema pobreza e causam sofrimento, incapacidade permanente e morte.

A doença foi trazida para o Brasil pelos escravos africanos, sendo inicialmente detectada pelo médico Augusto Pirajá da Silva no estado da Bahia, estando atualmente presente nas regiões Sudeste e Nordeste. Antes da implantação do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) no Brasil, ocorrido nos anos 1996 e 1997, a esquistossomose atingia entre dez e doze milhões de pessoas, sendo o país considerado uma das mais importantes áreas de ocorrência da doença (BRASIL, 2013).

Dados recentes do Ministério da Saúde (2013) avaliam uma prevalência de 6 milhões de indivíduos acometidos distribuídos pelos estados brasileiros, e 1,5 milhões de pessoas vivendo em áreas sob o risco de contrair a doença. São registradas em média 1500 internações por ano de vítimas da doença, ocorrendo uma estreita relação entre questões biológicas sociais e culturais que facilitam a sua disseminação (BRASIL, 2013; CARVALHO et al, 2008).

Em virtude da grande diversidade geográfica, climática, econômica e social que se reflete na imensa variedade de parasitos encontrados no Brasil, a esquistossomose mansônica é uma das endemias parasitárias mais significativas, ocupando o segundo lugar depois da malária. A doença é observada em todas as regiões do país, com a maioria dos casos ocorrendo nos estados das regiões Nordeste e Sudeste. Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais e Bahia compreendem as áreas endêmicas de maior importância entre as 19 unidades federativas acometidas pela esquistossomose mansoni (BRASIL, 2015) (FIGURA 1).

Pernambuco possui uma área endêmica para esquistossomose mansônica que corresponde a 17,5% da área total do Estado, onde, apenas entre os anos de 2006 a 2016, foram

notificados 89.928 casos da parasitose (SINAN, 2017). Nesse Estado, a doença é historicamente endêmica na região rural, apresentando-se, predominantemente, sob forma crônica, acometendo pessoas de baixa renda e tendo como vetor principal o caramujo *Biomphalaria straminea* (COUTINHO et al., 1997). O principal fator que contribui para a manutenção da 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)

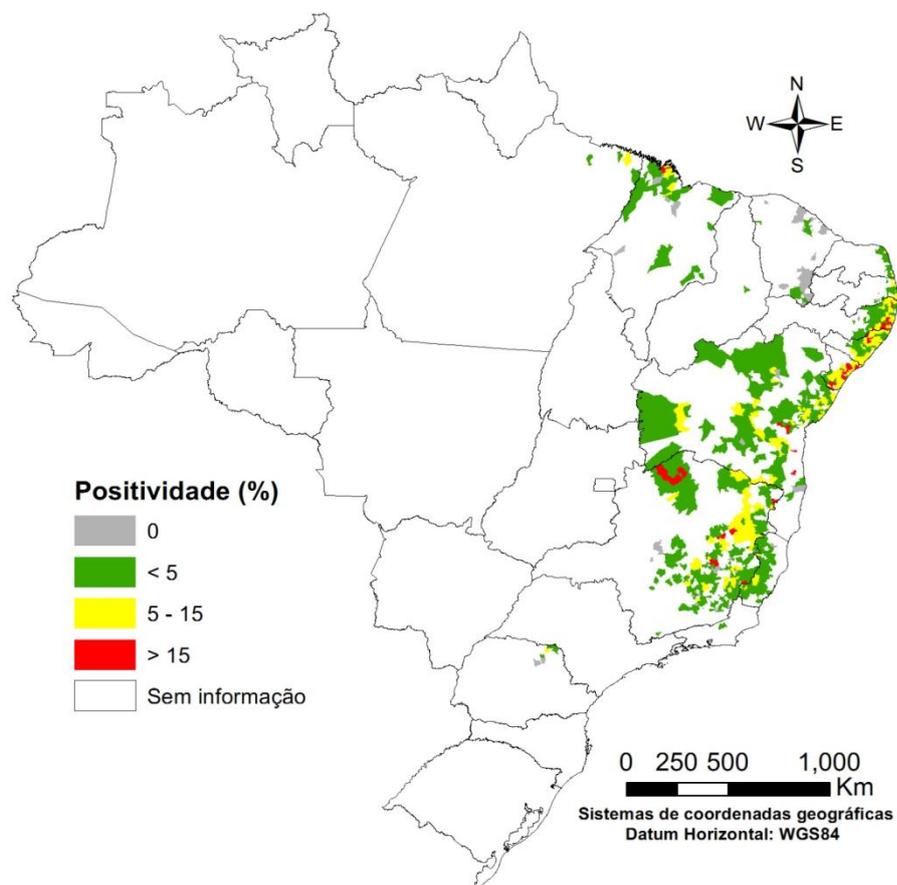


Figura 1 – Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2010-2015.

2.1.2 Ciclo biológico

O *S. mansoni* tem um ciclo evolutivo complexo, que envolve um molusco aquático pulmonado de água doce (do gênero *Biomphalaria*) e um hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos) (FIGURA 2). As formas evolutivas consistem em ovo, miracídio, esporocistos, cercária, esquistossômulo e verme adulto, sendo o miracídio e a cercária as duas formas larvárias de vida livre no meio aquático.

Os vermes adultos habitam preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário inferior e as ramificações das veias mesentéricas do hospedeiro vertebrado, especialmente a mesentérica inferior, onde migram para submucosa intestinal, e a fêmea faz a oviposição. Cada fêmea põe, em média, 300-400 ovos/dia, os quais levam cinco dias para amadurecer (REY, 2001; NEVES et al., 2005). Parte dos ovos atravessa a parede dos vasos, a lâmina própria do epitélio intestinal, chegando à luz do intestino, em um período de 6 dias, e é eliminada junto com as fezes. No momento em que as fezes entram em contato com coleções de água, os ovos maduros eclodem, liberando o miracídio, que nada ativamente ao encontro do hospedeiro invertebrado. Ao penetrar nas partes moles do caramujo, o miracídio sofre uma reorganização celular, dando origem aos esporocistos, que por poliembrionia, origina os esporocistos-filhos, e estes tem a capacidade de originar outros esporocistos-filhos e cercárias (REY, 2001; KATZ & ALMEIDA, 2003).

Em condições favoráveis de temperatura, luminosidade e oxigenação da água, cerca de 4-6 semanas após a infecção, os moluscos iniciam a eliminação das cercárias, as quais nadam ativamente e penetram pela pele ou mucosas íntegras do hospedeiro susceptível, fazendo uso da ação lítica de enzimas e pela ação mecânica de seus movimentos. Após atravessarem a pele, os corpos cercarianos passam por uma série de mudanças morfológicas, bioquímicas e antigênicas, passando a ser chamado de esquistossômulos, último estágio larvário do parasito. Os esquistossômulos penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos e aqueles que não forem eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro migram para os pulmões, de onde são distribuídos para os outros órgãos. A maioria deles alcança o fígado, onde atinge a maturidade sexual no sistema venoso portal. Neste local, os vermes acasalam e migram para as veias mesentéricas onde iniciam a oviposição, completando assim, o ciclo evolutivo do *S. mansoni* (REY, 2001; WILSON et al., 2006).

O ciclo completo ocorre em cerca de 80 dias. No hospedeiro definitivo, a fase sexuada dura, em média, 40 dias e vai desde a penetração das cercárias até a eliminação dos ovos nas

fezes. No hospedeiro intermediário, o ciclo é assexuado, e a duração é aproximadamente a mesma da fase sexuada (KATZ & ALMEIDA, 2003).

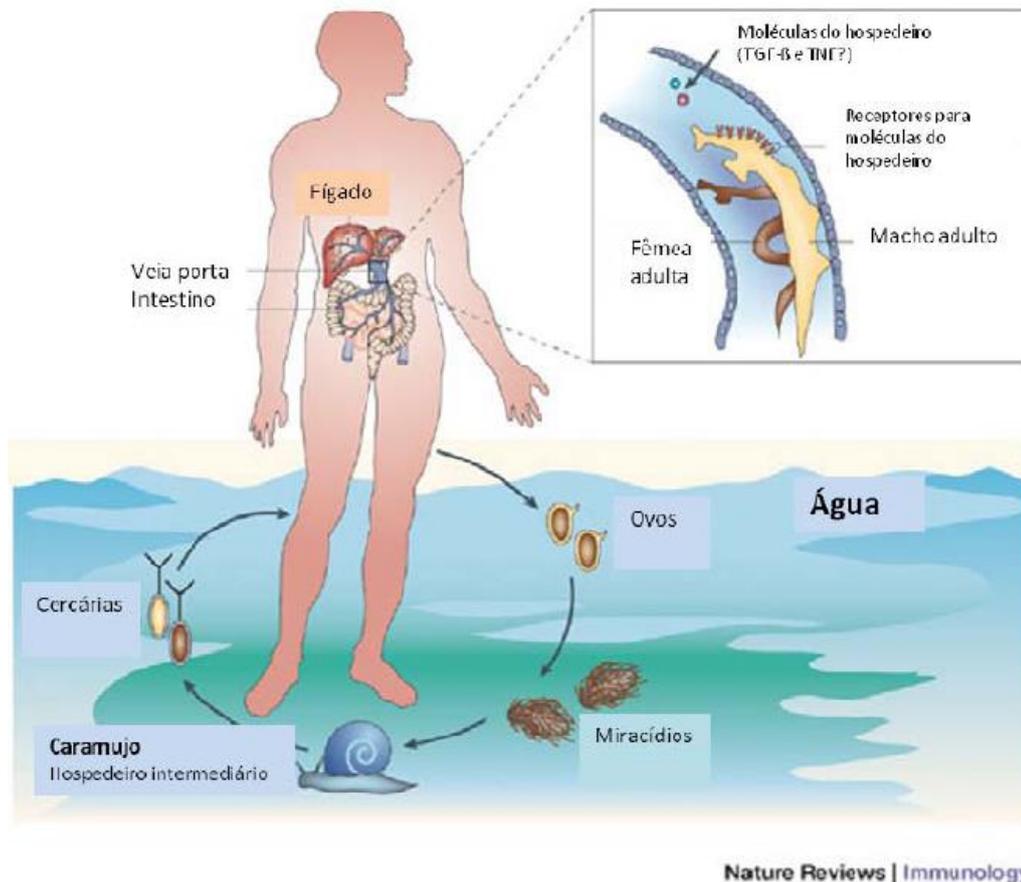


Figura 2 – Ciclo de vida do *S. mansoni*. O esquema mostra as etapas do ciclo, no meio aquático, no hospedeiro intermediário e finalmente no hospedeiro vertebrado (PEARCE & McDONALD, 2002)

2.1.3 A doença

Fatores como cepa do parasito, carga parasitária, idade, estado nutricional e resposta imune do paciente influenciam a forma de apresentação da esquistossomose (NEVES et al., 2005). Esta se desenvolve em duas fases, aguda e crônica, com a fase crônica podendo apresentar três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (REY, 2001).

Na fase aguda, alguns indivíduos se queixam de manifestações pruriginosas na pele, caracterizando a chamada dermatite cercariana, fenômeno decorrente da morte de até metade das cercárias que penetraram na pele. As manifestações clínicas são micropápulas eritematosas

e pruriginosas, com intensidade geralmente pequena e duração de cerca de 24-72 horas pós-infecção, podendo estender-se por até 15 dias (LAMBERTUCCI, SILVA & VOIETA, 2005). O desaparecimento dos sinais cutâneos corresponde ao período de incubação, que pode durar de quatro a oito semanas, quando há o desenvolvimento dos esquistossômulos (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994).

Após quatro a oito semanas, o paciente pode desenvolver febre alta, mal estar, astenia, urticária, tosse, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaléia e diarreia. Em virtude desses sintomas também ocorrerem em várias outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não sugerir o diagnóstico. O exame físico pode detectar abdome distendido e doloroso, com fígado e baço aumentados (REY, 2001). Essas manifestações da fase aguda podem não ser evidenciadas em moradores de áreas endêmicas, que apresentam a forma assintomática da doença (LAMBERTUCCI et al., 2000). A fase aguda pode durar, em média, trinta a sessenta dias, desaparecendo quando o paciente é submetido a tratamento específico ou podendo evoluir para a fase crônica, caso não haja tratamento (KATZ & ALMEIDA, 2003).

A fase crônica é decorrente principalmente de inflamação eosinofílica e reação granulomatosa, que gradativamente dá lugar a depósitos fibróticos, provocadas pelos ovos que se prendem aos tecidos durante a migração peri-intestinal ou após embolização do fígado, baço, pulmões e sistema cérebro-espinhal (CHEEVER et al., 2000). A doença resulta da deposição maciça de colágeno nos espaços periportais, induzindo a Fibrose de Symmers. Quando há comprometimento das funções e aumento do volume do fígado e do baço, ocorre a forma hepatoesplênica da doença, na qual são observadas alterações anatômicas, fisiopatológicas e clínicas, resultantes das lesões teciduais provocadas pelos ovos do parasito (MELO; COELHO, 2005). Nessa fase, há pacientes que permanecem na sua forma clínica estacionária ou compensada, conservando um bom estado geral, com sintomatologia de pequena intensidade. Outros, porém, evoluem para as formas mais graves ou descompensadas, apresentando bloqueio da circulação pré-sinusoidal, causados pelo grande número de depósitos fibróticos, o que reduz o fluxo sanguíneo do território drenado pela veia porta. O baço aumenta de volume, em grande parte devido à congestão da veia esplênica do sistema porta, bem como devido à hiperplasia das células do sistema macrófagico-linfocitário, com diferenciação plasmocitária e produção de imunoglobulinas, em virtude da presença de grande quantidade de substâncias antigênicas (REY, 2001).

A doença ainda pode acarretar lesões cardiopulmonares como arteriolite obstrutiva, insuficiência pulmonar direita e hipertensão pulmonar provocada por obstrução vascular

induzida pelos ovos, vermes mortos ou imunocomplexos Ag-Ac. O depósito de complexos imunes nas áreas mensagiais também pode levar a glomerulonefrite (BARSOU, 1993). Lesões no aparelho reprodutor de homens e de mulheres também ocorrem em áreas endêmicas, facilitando a transmissão sexual de outras doenças e podendo induzir infertilidade (POGGENSEE; FELDMIEIER, 2001). E, lesões do sistema nervoso central e entérico, decorrentes de inflamação ao redor de vermes ou os ovos, localizados ectopicamente, podem envolver danos fibróticos irreversíveis se não forem tratados (FERRARI et al., 2004; ABDU, 2009).

2.1.4 Imunopatologia

A desintegração dos ovos, a excreção de seus produtos e os antígenos liberados pelos vermes adultos do *Schistosoma mansoni* estimulam a resposta imune do hospedeiro definitivo (PESSOA; MARTINS, 1988) e a interação entre os produtos estranhos do parasita e os componentes imunológicos do hospedeiro pode resultar, dependendo do tipo e intensidade da resposta, em imunopatologia ou proteção imune (ABBAS, MURPHY; SHER, 1996).

Alguns autores tem demonstrado que diversos mecanismos, dentre eles a resposta de subpopulações T CD4+ Th1 e Th2, estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da doença ou resistência à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*. (JAMES; SHER, 1990; SMYTHIES et al., 1992; WYNN et al., 1995). O perfil Th1 está relacionado à secreção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ e IL-2), estando envolvida na formação de infiltrado rico em neutrófilos polimorfonucleares, ativação de macrófagos, proteção contra bactérias intracelulares, eliminação de vírus e fungos, além da formação de granulomas. Por outro lado, no perfil Th2 são produzidas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que estão implicadas, essencialmente, nas respostas imunológicas alérgicas, proteção contra infecções helmínticas, e caracteriza-se por infiltrados ricos em eosinófilos, mastócitos e por aumento da síntese da IgE (STOCKINGER; BOURGEOIS KASSIOTIS; 2006; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O tipo de imunidade encontrada em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* apresenta variações nos perfis Th1/Th2, com a evolução da doença. A resposta imune celular na esquistossomose mansônica pode ser diferenciada em três fases. A primeira abrange o período de três a cinco semanas após a infecção, sendo caracterizada pela exposição do hospedeiro às cercárias e aos esquistossômulos que migram pelo tecido (CHEEVER et al, 2000). Nesta fase, a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1, observando-se a presença de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) produzindo grandes

quantidades de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (De JESUS et al., 2002; COURA, 2004). À medida que essas formas imaturas se desenvolvem, copulam e produzem ovos, ocorre uma alteração considerável na resposta imunológica. A resposta que era predominantemente Th1 é substituída pelo predomínio da resposta Th2, induzida principalmente por antígenos do ovo de *S mansoni*. A então predominante resposta Th2 é a responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (FLORES-VILLANUEVA et al., 1993; CHEEVER et al., 2000).

Durante a fase crônica, o perfil observado é caracterizado por uma baixa produção de IFN- γ e produção aumentada de citocinas com padrão Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000). A resposta inflamatória ao redor dos ovos diminui principalmente devido à modulação da resposta imunológica mediada pela IL-10, que desempenha um papel crucial nesse processo (ARAÚJO et al., 1996; MALAQUIAS et al., 1997; MONTENEGRO et al., 1999). A IL-10, produzida principalmente pelos clones Th2, foi associada à supressão da resposta Th1, sendo, portanto o perfil da resposta Th2 associado com a proteção e a geração de cronicidade das infecções esquistossomóticas por controlar a resposta granulomatosa ao redor dos ovos (FINKELMAN et al., 1991; STADECKER; FLORES VILLANUEVA, 1992).

Os granulomas formados em função da reação imunológica em resposta aos antígenos solúveis dos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro são os principais desencadeantes da patologia da esquistossomose (MATHEW; BOROS, 1986). Em modelos experimentais, o estágio inicial de formação do granuloma envolve a participação de moléculas de adesão, principalmente entre a molécula de adesão celular-I (ICAM-I) e o seu receptor, denominado antígeno funcional de leucócitos-1 (LFA-1) (RITTER; MCKERROW, 1996). O aumento da expressão de ICAM-I é induzido por IL-1, IFN- γ ou TNF- α (DUSTIN et al., 1986). Logo, TNF- α e IFN- γ participam da ativação de linfócitos e, conseqüentemente, na formação dos granulomas.

Posteriormente, os linfócitos T CD4+ ativados secretam citocinas que promovem a formação e a regulação do granuloma (WEINSTOCK; BLUM, 1987). Em modelos experimentais, as citocinas mais abundantes são IL-2 e IL-4 (YAMASHITA & BOROS, 1992). Nesta etapa, o granuloma é predominantemente celular, formado principalmente por eosinófilos, macrófagos, linfócitos, alguns neutrófilos e células gigantes multinucleadas (RASO & NEVES, 1965; WEINSTOCK, 1992), sendo as migrações desses diversos tipos celulares para o sítio de inflamação, controladas por citocinas e também quimiocinas (BOROS, 1989; PEARCE & MACDONALD, 2002).

Na segunda etapa de formação do granuloma, onde o seu diâmetro é maior, há um predomínio das citocinas IL-4 e IL-5 (CHENSUE et al., 1993). A IL-4 desempenha um papel regulador na formação do granuloma (YAMASHITA & BOROS, 1992), enquanto IL-5 aumenta o recrutamento de eosinófilos e a proliferação e diferenciação de células B (SHER et al., 1990; WEINSTOCK, 1992). A resposta imunológica frente aos ovos de *S. mansoni* resulta na formação de granulomas hepáticos e intestinais que podem desencadear um quadro de fibrose nesses tecidos. Apesar dos granulomas serem por si só patogênicos, eles também protegem o hospedeiro, sequestrando moléculas hepatotóxicas liberadas pelo ovo e prevenindo o dano hepático (PATTON et al., 2001). Após a fase aguda da doença, o granuloma diminui de tamanho, resultante da redução da inflamação ao redor dos ovos, sendo esse processo denominado modulação (ANDRADE; WARREN, 1964).

A maioria dos pacientes infectados pelo *S. mansoni*, residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose, desenvolvem a forma crônica intestinal. Vários estudos têm demonstrado que os pacientes apresentando essa forma clínica desenvolvem mecanismos que estão envolvidos na modulação da resposta imunológica contra a infecção. Diversos mecanismos envolvidos nesse controle já foram descritos, dentre eles podemos citar a modulação da resposta de células T por anticorpos anti-idiotipos (LIMA et al., 1986; PARRA et al., 1991), a participação de células T CD8⁺ (DOUGTHY et al. 1982) e a regulação mediada por IL-10 (MALAQUIAS et al., 1997; ARAUJO et al., 1996; MONTENEGRO et al., 1999).

A modulação da resposta imunológica durante a fase crônica da esquistossomose reduz drasticamente a resposta do tipo Th1, passando a existir o predomínio da resposta do tipo Th2, prevalecendo eosinofilia, produção de anticorpos e citocinas relacionadas a esse tipo de resposta, como IL-5 e IL-10 (COLLEY, 1975; PEARCE; MACDONALD, 2002). Araújo (1997), avaliando o fenômeno de imunossupressão específica em esquistossomóticos crônicos, constatou que PBMC de 64% dos pacientes apresentaram baixa resposta linfoproliferativa, e nenhum deles produziu IFN- γ em resposta aos antígenos do *Schistosoma* “*in vitro*”. Por outro lado, os PBMC produziram IL-4, IL-5 e IL-10 em resposta ao antígeno de verme adulto, demonstrando expansão dos linfócitos Th2.

Dados da literatura indicam que a IL-10, ao atuar sobre a resposta Th1 e desviá-la para Th2, se opõe à síntese de IFN- γ e IL-2, que são importantes para a proliferação de células T e a ativação de macrófagos. A inibição da síntese dessas citocinas pela IL-10 parece ser indireta, ou seja, ela age sobre as células apresentadoras de antígenos, especialmente monócitos e macrófagos, inibindo a expressão de moléculas do complexo de

histocompatibilidade principal do tipo II (MHC classe II) e co-estimulatórias como B7-2, o que resultaria na ausência, ou diminuição, da apresentação dos antígenos e, por conseguinte, falta de ativação celular e ausência na produção de IL-2 e IFN- γ (FIORENTINO et al. 1989; MOORE et al. 1990; FIORENTINO et al. 1991).

Outro mecanismo relacionado à inibição da síntese de IFN- γ por IL-10 é que esta citocina é capaz de inibir a síntese de IFN- γ pelas células *Natural Killers*, mecanismo essencial para a derivação da resposta imunológica para o tipo Th1 (KOS; ENGLEMAN, 1996).

Em humanos, a detecção de altos níveis de IL-10 está correlacionada com o desenvolvimento de formas menos graves da esquistossomose (ARAÚJO et al., 1996; MALAQUIAS et al., 1997). Em modelos murinos, a ausência desta citocina foi correlacionada com aumento de fibrose hepática e esplenomegalia (BOSSHARDT et al., 1997). Em contra partida, altos níveis de TNF- α e baixos níveis de IL-5 estão associados com a forma clínica hepatoesplênica da esquistossomose mansônica humana (MWATHA et al. 1998).

Silveira et al. (2004), avaliando o efeito da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-13 por PBMCs de indivíduos residentes em área endêmica para o *S. mansoni*, observaram que os níveis de IFN- γ produzidos por PBMCs diminuem gradualmente com o aumento da intensidade de infecção, e que esta intensidade de infecção é decisiva para a produção de IL-10 e dominância de uma resposta imunológica Th2. Estes autores não encontraram diferença estatisticamente significativa nos níveis de IL-13 entre o grupo de pacientes ovo-negativo e o grupo de pacientes com exame parasitológico de fezes positivo para *S. mansoni*. Grzych et al. (1991) demonstraram, em modelo murino, que a presença dos ovos foi o principal estímulo para o desenvolvimento de uma resposta Th2, o que também sugere a influência da intensidade de infecção no estabelecimento de uma resposta predominantemente Th2.

Um estudo longitudinal realizado com alunos colegiais no Gabão sugeriu o envolvimento da IL-10 como fator de risco para a reinfecção pelo *S. haematobium*, uma vez que as crianças com maior risco de reinfecção foram aquelas que apresentaram os níveis mais altos de IL-10 específica contra antígenos do ovo (VAN DEN BIGGEALAAR et al. 2002). Estes altos níveis de IL-10 devem provocar uma diminuição mais vigorosa na resposta Th1 nestas crianças quando comparadas com as que produziram níveis menores desta citocina. Assim, a menor capacidade de montar uma resposta protetora Th1 contra a invasão cercariana pode resultar em um maior risco de reinfecção. Contudo, a falha na via imunológica de

proteção, mediada por IL-10, ainda não está esclarecida (VAN DEN BIGGEALAAR et al. 2002).

Outro estudo longitudinal, realizado no Quênia, investigou a resposta mediada por células em dois grupos de indivíduos: um de 9 a 13 anos e outro de 14 a 35 anos. A resposta blastogênica e a produção de citocinas foram medidas antes e após o tratamento. Ambos os grupos se reinfectaram depois do tratamento, porém com intensidades diferentes. O grupo mais jovem apresentou intensidade de infecção mais alta, sendo, portanto, denominado suscetível, enquanto o grupo mais velho, com carga parasitária mais baixa, foi considerado resistente. Observou-se uma correlação inversa entre a resposta de proliferação celular a antígenos de vermes adultos e esquistossômulos, e a subsequente intensidade de reinfeção nos indivíduos mais velhos. Observou-se, ainda, que a citocina IL-5 apresentava-se mais elevada nos indivíduos resistentes, e que ela possuía relação inversa com os níveis de IFN- γ (MORVEN et al. 1993).

Cheever, Hoffmann e Wynn (2000), ao estudarem animais deficientes em IL-10 após vinte semanas de infecção, observaram que a morbidade e a mortalidade na esquistossomose murina crônica estavam associadas diretamente com o desenvolvimento de uma resposta Th2 por induzir a formação de lesões fibróticas nos tecidos do hospedeiro. Por outro lado, Stadecker (1992) e Fallon (2000) analisaram a esquistossomose murina, e diferentemente concluíram que as respostas Th2 são protetoras, agindo como mediadores anti-inflamatórios e as Th1 estariam relacionadas com a formação do granuloma. Parte dessa divergência se deve ao fato de que, embora a formação do granuloma e a fibrose periportal sejam características da patologia esquistossomótica crônica, são fenômenos regidos por diferentes mecanismos. Além disso, Cheever, Hoffmann e Wynn (2000) destacaram que a resposta Th1 pode estar elevada nas fases finais da doença humana possivelmente para corrigir os danos causados durante anos da exposição a citocinas Th2 indutoras de colágeno. Por sua vez, a polarização Th1 na fase aguda da esquistossomose murina induz a imunopatologia letal devido a ausência de granulomas bem formados e exposição a hepatotoxinas derivadas do ovo do parasita.

É importante mencionar que os mecanismos envolvidos na indução das respostas Th1 e Th2 na esquistossomose ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns estudos na esquistossomose experimental revelam a existência de interações complexas entre tipos celulares e demonstram a importância de moléculas acessórias além das citocinas no direcionamento dessas respostas (PACHECO; LENZI, 1997; JACOBS et al, 1998; HERNANDEZ et al, 1999). Sendo assim, torna-se de grande importância o estudo dos

padrões de resposta na evolução da esquistossomose murina, a fim de melhor compreender a imunopatologia da esquistossomose humana.

2.2 Obesidade

Fisberg (2004) descreve a obesidade como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido gorduroso, regionalizado ou em todo o corpo, caracterizando-se como uma das doenças não transmissíveis que mais cresce em todo o mundo, pois, nas últimas décadas, tem se apresentado nas diversas faixas etárias. A obesidade pode ser descrita como a “Nova Síndrome Mundial” (NAMMI et al., 2004), sendo uma condição complexa, com dimensões sociais e psicológicas sérias, afetando a indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos (WHO, 2012).

A obesidade é considerada um problema de saúde mundial e o aumento de sua incidência, riscos e consequências são cada vez mais preocupantes. Segundo o World Health Organization (WHO, 2012), existem cerca de 1,4 bilhões de adultos com sobrepeso e 500 milhões de adultos com obesidade em todo o mundo, com a projeção de que em 2015 esses valores cheguem a 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos.

No Brasil, dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008/2009 (Instituto brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2009) mostram que, uma em cada três crianças de 5 a 9 anos está acima do peso recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e que o excesso de peso está presente em 50,1% dos homens e em 48% das mulheres na faixa etária acima de 20 anos. Esse padrão se reproduz, com poucas variações, na maioria dos grupos populacionais analisados no País.

A obesidade é uma doença multifatorial que tem em sua origem fatores genéticos, psicossociais, nutricionais, metabólicos e endócrinos (WHO, 2012). O surgimento e a manutenção da obesidade contam com a contribuição de fatores que atuam na regulação da ingestão de alimentos através de um complexo sistema de sinais centrais e periféricos que interagem para modular a ingestão de nutrientes de forma individual (VALASSI et al., 2008) e no armazenamento de energia (BOUCHARD, 2000). Assim, a principal causa da obesidade e o desequilíbrio entre a quantidade de energia consumida e o gasto desta, levando a um acúmulo no organismo. Esse armazenamento tem como consequência o excesso de massa gordurosa que se traduz não apenas em um depósito de energia, mas também em um órgão endócrino (GARRUTI et al., 2008).

O tecido adiposo é conhecido por possuir várias funções, entre elas: armazenamento de energia, regulação hormonal dos sistemas homeostáticos, termogênese e proteção de impacto contra as vísceras. Além disso, tem uma importante função endócrina, pois secreta uma variedade de proteínas sintetizadas e liberadas pelos adipócitos, denominadas adipocinas. Essas adipocinas tem diferentes funções, como: regulação de apetite e balanço energético, imunidade, sensibilidade à insulina, angiogênese, inflamação e resposta de fase aguda, pressão sanguínea e metabolismo de lipídeos (MAFRA; FARAGE, 2006). Dentre as adipocinas mais conhecidas e estudadas no ambiente científico estão: leptina, adiponectina e resistina. Não é fácil descrever a unidade funcional dessas adipocinas, porém, pode-se afirmar que muitas dessas adipocinas são ligadas à imunidade e inflamação, uma vez que foram estabelecidos paralelos (relações) entre os adipócitos e as células imunológicas (FANTUZZI, 2005).

2.2.1 Obesidade e sistema imune

Os processos imunológicos envolvidos na defesa do organismo são afetados pelo estado nutricional. Assim, um desequilíbrio crônico entre ingestão e gasto energético conduz a situações de obesidade, que podem influenciar de forma inespecífica e específica nas respostas imunes humoral e celular (WOMACK et al., 2007).

Segundo Alves (2006), essas repercussões imunológicas, mais a complexa interação que existe entre elas, levam o indivíduo obeso a modificar sua resposta imune, tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida. A resposta imunológica, frente às agressões agudas e crônicas na obesidade, está afetada devido às alterações das concentrações de mediadores inflamatórios, de populações linfocitárias, de células fagocitárias, de células apresentadoras de antígenos, pela ativação do sistema de complemento, etc.

Os adipócitos possuem propriedades inflamatórias intrínsecas, são sensíveis a agentes infecciosos e a sinais inflamatórios mediados por citocinas, além disso, essas células expressam receptores que são capazes de detectar a presença de patógenos e de mediadores inflamatórios (RAMALHO & GUIMARÃES, 2008). Os adipócitos podem reagir a vários mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IFN- γ e diversos componentes da parede celular de microrganismos (BERG & SCHERER, 2005). Os receptores ao serem estimulados ativam diversos sinais de transdução da cascata inflamatória, induzindo assim, a expressão e secreção de proteínas de fase aguda e mediadores da inflamação como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, fatores B e C3 do complemento, prostaglandina E2, entre outros, e

ainda moduladores inflamatórios como a adiponectina, resistina e leptina (BERGH & SCHERER, 2005).

A obesidade em indivíduos adultos tem sido associada com elevada concentração de leptina circulante devido a sua produção quase exclusiva no tecido adiposo correlacionando-se com a massa adiposa, e a tendência ao ganho de peso em populações não obesas com altos níveis basais de leptina podendo sugerir uma resistência a leptina nesses indivíduos (LISSNER et al., 1999). Assim, quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior a concentração de leptina produzida e liberada na circulação, uma vez que o percentual de gordura influencia nessa liberação (FONSECA *et al.*, 2006).

Sugere-se que a leptina possui um papel modulador da resposta imune, atuando em processos inflamatórios e patologias imuno-mediadas (LA CAVA & MATARESE, 2004). A leptina aumenta a produção de citocinas, a adesão e a fagocitose em macrófagos, além de estimular a proliferação das células T (FONSECA et al., 2006; ALVES, 2006). Em monócitos e macrófagos, a leptina aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12, e estimula a ativação de neutrófilos e a proliferação de monócitos *in vitro* circulantes (FANTUZZI, 2005). O Óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidos pela leptina, também induzem a ativação, proliferação e migração de monócitos circulantes (FANTUZZI, 2005).

Um estudo experimental sobre a influência da obesidade na resposta imune em uma população adulta indica que a obesidade está relacionada com a elevação de leucócitos e linfócitos, que foram acompanhadas de maior fagocitose por mais monócitos e granulócitos (NIEMAN et al., 1999). Os autores deste estudo sugerem que o colesterol sérico, triglicérides e glicemia podem estar relacionados a prejuízos em vários aspectos da imunidade.

A hiperleptinemia causada pela obesidade está associada a uma resistência à leptina, onde se observam prejuízos variáveis na resposta imune (ALVES, 2006). Nesse contexto, de acordo com Juge-Aubry et al. (2002), a insensibilidade do receptor de leptina é identificada pelas células T como um estado de deficiência de leptina, o que induz a uma disfunção do sistema imunológico similar a produzida pela desnutrição.

Silveira et al. (2009) sugerem que o aumento dessa adipocina encontrado em indivíduos obesos causaria um comprometimento na resposta imunológica, fazendo com que esses sejam mais suscetíveis a doenças infecciosas e inflamações do que indivíduos eutróficos. Esta susceptibilidade aumentada a infecções, é causada por alterações nas subpopulações de células T, com um desbalanço entre as respostas Th1 e Th2, com uma diminuição e aumento respectivamente. (MUÑOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004).

2.2.2 Obesidade e microbiota intestinal

Estudos tem associado a microbiota intestinal ao estado inflamatório que ocorre na obesidade (CANI E DELZONE, 2007). Em 2005, Ley et al. mostraram que camundongos obesos tinham em sua microbiota 50% menos bacterioides quando comparados a camundongos magros. Quando submetidos à dieta para perda de peso, a microbiota desses camundongos se tornava muito semelhante à dos camundongos magros, sugerindo uma possível associação.

Outro estudo, desenvolvido por Turnbaugh et al. (2006), evidenciou que a colonização de camundongos “*germ free*” com microbiota de camundongos obesos resultava em aumento significativo da massa gorda, em comparação a uma colonização feita com microbiota de camundongos magros. De maneira geral, os estudos sugerem que a microbiota intestinal participaria da digestão de polissacarídeos, aumentando a quantidade de glicose no fígado e, portanto, a lipogênese.

Além da influência na massa corpórea, camundongos colonizados também parecem ter mais marcadores inflamatórios, maior intolerância à glicose e resistência à insulina, quando comparados aos “*germ free*” (BACKHED et al., 2004). Autores propuseram que uma alimentação rica em gorduras gera uma alteração negativa da microbiota intestinal, com aumento de bactérias gram negativas e redução de *Bifidobacterias*, o que acarretaria alteração da permeabilidade intestinal, com maior absorção de LPS (lipopolissacarídeos bacterianos), caracterizando um quadro de endotoxemia metabólica. Essas modificações estimulariam a secreção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para desordens metabólicas (CANI; DELZENNE, 2007; CANI; DELZENNE, 2009).

A relação entre microbiota e obesidade é clara, porém muitos mecanismos ainda precisam ser elucidados e estudos precisam ser realizados, principalmente quando há associação com outras enfermidades.

2.2.3 Obesidade e esquistossomose

A obesidade está a tornar-se um motivo de preocupação em pacientes criticamente doentes. Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a incidência e a gravidade de doenças infecciosas são maiores em indivíduos obesos quando comparados a pessoas magras (FASOL et al., 1992; GOTTSCHLICH et al., 1993; MOULTON, 1994; STALLONE, 1994).

De acordo com Coutinho, Gentil e Toral (2008), muitos países de baixa e média renda estão agora a enfrentar uma "dupla carga" de doença: enquanto eles continuam a lidar com os problemas das doenças infecciosas e desnutrição, ao mesmo tempo estão experimentando um rápido surto de fatores de risco de doenças crônicas tais como obesidade e sobrepeso.

Achados na literatura mostram que dietas ricas em gordura causam dislipidemia, obesidade e lesão hepática em ratos (MOHR et al., 2004), com um ganho acentuado de gordura no fígado (LI et al., 2005). Ocorre hipercolesterolemia devido a uma elevação da síntese de colesterol hepático e diminuição do *clearance* de LDL, da conversão de colesterol em ácidos biliares e da secreção de colesterol na bile (MOHR et al., 2004). A obesidade também é fator preditivo para fibrose, podendo progredir potencialmente para doença hepática avançada (FESTI et al., 2004). Por conseguinte, uma outra doença hepática concomitante pode fornecer uma combinação sinérgica de esteatose, adaptação celular e dano oxidativo, o que agrava as lesões hepáticas (POWELL et al., 2005).

A esquistossomose mansônica pode sobrecarregar a lesão hepática, com base em uma situação patológica já existente. Neves et al. (2006), avaliando efeitos da obesidade sobre lesões hepáticas de camundongos com esquistossomose na fase aguda, verificaram que a concomitâncias dos dois quadros patológicos promoveu intensas alterações quantitativas na estrutura hepática, contribuindo para um aumento na sua regeneração, sugerindo que dieta rica em gordura associada à esquistossomose causa danos ainda maiores na estrutura do fígado.

Neves et al. (2007), avaliando efeitos de dieta hiperlipídica em camundongos submetidos à infecção esquistossomótica, verificaram que a contagem de ovos nas fezes e nos tecidos e a diversidade morfológica de granulomas hepáticos, foram superiores no grupo de animais alimentados com dieta rica em gordura, quando comparados aos que receberam uma dieta padrão. O estudo não apontou diferenças significativas quanto à infectividade entre os grupos de camundongos alimentados com dietas hiper ou normocalórica. Em contrapartida, outro estudo, desenvolvido por Alencar et al.(2009), encontrou uma maior infectividade, uma superior carga parasitária, com elevação da postura e viabilidade de ovos nas fezes, e da densidade de ovos nos tecidos, além de um aumento de volume hepático e esplênico nos animais obesos, quando comparados aos eutróficos, sugerindo uma maior agressividade da infecção no grupo de animais submetidos à obesidade.

São escassos na literatura estudos que avaliem aspectos da associação entre esquistossomose e obesidade, não existindo nenhum que avalie características do ponto de vista imunopatológico. Desta forma, é de grande relevância que sejam realizados estudos a

respeito do papel da obesidade do hospedeiro no desenvolvimento da imunidade e das lesões hepáticas esquistossomóticas, em virtude do contingente de pacientes obesos encontrados nas áreas endêmicas para esquistossomose e da série de prováveis complicações decorrentes da sobreposição das referidas morbidades.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ , histopatologia e histomorfometria hepática, perfil bioquímico do sangue e microbiota intestinal na infecção aguda pelo *Schistosoma mansoni*, em camundongos BALB/c submetidos à dieta hiperlipídica.

3.2 Objetivos específicos

◆ Em camundongos fêmeas BALB/c, submetidos à dieta hiperlipídica ou normolipídica, infectados ou não pelo *S. mansoni*, objetiva-se:

- Determinar a evolução ponderal;
- Avaliar a produção das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ pela determinação dos seus níveis séricos;
- Mensurar os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e HDL;
- Comparar as frequências absolutas e relativas de componentes da microbiota entérica.

◆ Em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, submetidos à dieta hiperlipídica ou normolipídica, objetiva-se:

- Avaliar a intensidade da infecção através da carga parasitária pela quantificação do número de ovos nas fezes e do número de parasitos recuperados após a perfusão;
- Estudar a morfologia hepática em relação à formação dos granulomas e suas características, bem como ao desenvolvimento de fibrose, e caracterizar, morfometricamente, parâmetros relacionados aos granulomas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, a fim de avaliar os níveis séricos das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ , histopatologia e histomorfometria hepática, perfil bioquímico do sangue e microbiota intestinal na infecção aguda pelo *Schistosoma mansoni*, em camundongos BALB/c submetidos à dieta hiperlipídica. A escolha do desenho metodológico deve-se à grande comparabilidade entre os grupos em termos de variáveis de confundimento e facilidade na formação dos grupos controles.

4.2 Animais, Dietas e formação dos grupos de estudo

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, saudáveis, recém-desmamados (21-23 dias), cedidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz. Os camundongos foram mantidos em uma mesma sala e em condições ambientais similares, alojados em gaiolas especiais de propileno (5 a 6 por gaiola), com tampas de arame zincado, em camas de maravalha (anteriormente autoclavada), a uma temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro, com livre acesso à ração e água estéril *ad libitum*.

As dietas administradas aos animais durante todo o período experimental foram obtidas comercialmente da PragSoluções (Jau – SP, Brasil) e as composições estão especificadas na Tabela 1. A Dieta Padrão (DP) trata-se de uma dieta normolipídica e normocalórica, administrada para fins de eutrofia. A Dieta Hiperlipídica (DH) foi utilizada como modelo de obesidade induzida, havendo sido previamente validada no estudo de WHITE et al. (2013), que confirmaram a obesidade após 10 semanas de uso.

Tabela 1. Composição das dietas

Ingredientes	DP		DH	
	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Amido de milho	415,0	1.660	14,3	57,2
Farelo de soja	305,0	1.281	410,0	1.722
Sacarose	80,0	320	80,0	320
Maltodextrina	70,0	280	70,0	280
Banha	0,0	0	302,0	2.718
Óleo de soja	0,0	0	0,0	0
Ác. graxo soja	50,0	350	50,0	350
Celulose microcrista	31,7	0	25,4	0
L-cistina	1,8	7,2	1,8	7,2
Cloreto colina	1,5	0	1,5	0
Butil-hidroxitolueno	0,014	0	0,028	0
Mix min. mod 50 gps	35,0	0	35,0	0
Mix vitamina	10,0	40	10,0	40
Total	1000,0	3.938	1000,0	5.494

Dieta padrão (DP): 73,9% de carboidratos, 14,8% de proteínas e 9,8% de lipídios. Dieta hiperlipídica (DH): 26,13% de carboidratos, 14,4% de proteínas e 57,6% de lipídios. (WHITE et al, 2013)

As ninhadas recém-desmamadas foram inicialmente divididas em dois grupos: Grupo DP, constituído por 20 animais alimentados com dieta padrão e Grupo DH, constituído por 23 animais mantidos com dieta hiperlipídica. Ao final das 10 semanas de administração das dietas (WHITE et al., 2013), parte dos camundongos foi submetida à infecção pelo *S. mansoni*, cuja distribuição deu origem aos seguintes grupos: DPI – Dieta padrão infectado (n=10), DPNI – Dieta padrão não infectado (n=10), DHI – Dieta hiperlipídica infectado (n=11) e DHNI – Dieta hiperlipídica não infectado (n=12) (Figura 3). As respectivas dietas continuaram a ser administradas até o final do período experimental, visando manter os animais nas condições nutricionais desejadas.

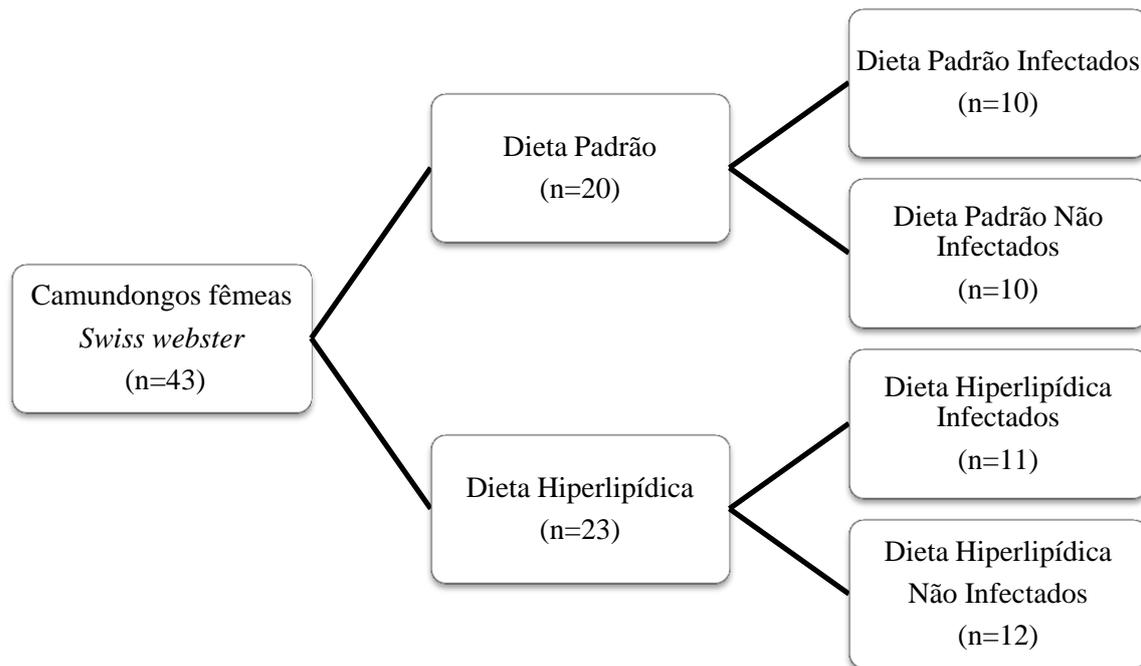


Figura 3 – Distribuição dos grupos de camundongos submetidos a análises.

4.3 Avaliação da evolução ponderal

O estado nutricional dos animais de todos os grupos foi avaliado através da análise das curvas ponderais, obtidas após registro semanal do peso corporal utilizando balança de precisão (BK3000, com sensibilidade de 0,01g).

4.4 Obtenção das cercárias e infecção dos camundongos

Para a infecção dos animais, foram utilizadas cercárias, da cepa São Lourenço da Mata (SLM), obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário da disciplina de Parasitologia, Departamento de Medicina Tropical (UFPE) pela equipe do Setor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

Os caramujos foram anteriormente postos em contato com miracídios, segundo STANDEN (1952), permanecendo expostos à luz e ao calor por aproximadamente duas horas. Após a infecção, os moluscos são postos em aquários com água desclorada e livres de exposição luminosa. De acordo com OLIVIER & STIREWALT (1952), após 30 dias de infecção os moluscos da espécie *B. glabrata* em meio aquático e sob exposição à luz artificial apresentam a capacidade de eliminar cercárias através de seus tecidos moles (FIGURA 4A).

Foi obtida uma suspensão cercariana e cada camundongo, após anestesiado com Ketamina e Xilazina, (dose 100-200 mg/kg + 5-16 mg/kg) por via intramuscular, foi submetido à infecção por via percutânea. Os animais anestesiados foram postos em decúbito dorsal, com as patas levemente presas por uma tira de fita esparadrapo, e a infecção foi executada através da adição de uma gota contendo uma fração da suspensão cercariana contendo, em média, 30 cercárias, na sua porção abdominal (FIGURA 4B). A suspensão permaneceu em contato com o animal durante 30 minutos, sendo então removida e os animais dispostos novamente em suas gaiolas. Os camundongos infectados foram mantidos em gaiolas separadas daqueles não infectados por *S. mansoni*.

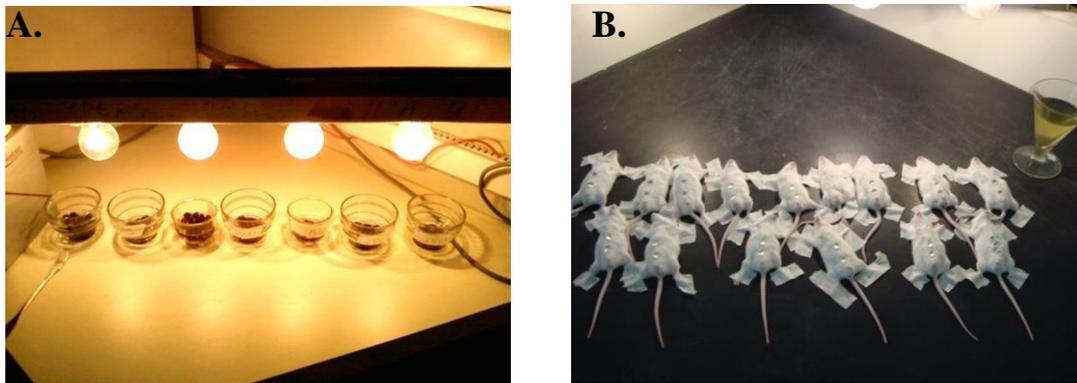


FIGURA 4 – A. Moluscos da espécie *B. glabrata* infectados, em meio aquático e sob exposição da luz artificial. B. - Camundongos anestesiados e expostos à suspensão cercariana, por via percutânea, e luz artificial.

4.5 Contagem de ovos nas fezes

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

4.6 Coleta de amostras

Ao fim do período experimental (60 dias após a infecção), os animais foram anestesiados com Quetamina + Xilasina (100-200 mg/kg + 5-16 mg/kg, via intramuscular), e foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca. A punção cardíaca foi realizada com o

animal deitado em decúbito dorsal sobre a mesa e com uma seringa de 3 mL. Foi inserida a agulha perpendicularmente à parede da caixa torácica, traçando uma linha imaginária que passa pelo cotovelo do animal, chegando a aproximadamente 0,5 cm abaixo do esterno. Penetrou-se 5 a 10 mm com a agulha e o sangue foi então coletado. A morte do animal anestesiado ocorreu por exsanguinação, e em casos contrários foi realizada a eutanásia rapidamente por dose excessiva de anestésico. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro destinado às dosagens bioquímicas (Colesterol total, HDL e Triglicerídeos) e imunológicas (Níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6).

Em seguida, procedeu-se à incisão mediana xifo pubiana com auxílio de tesoura cirúrgica, para coleta de fragmentos do fígado (análise histológica) e as fezes na porção distal do intestino (avaliação da microbiota). Após a coleta das amostras, os camundongos eutanasiados foram submetidos à perfusão porta-hepática. Esta técnica foi utilizada para avaliação do parasitismo através do número de vermes adultos. A coleta dos vermes foi feita durante a coleta das amostras e perfusão por observação direta dos vasos mesentéricos. Os vermes foram contados e classificados segundo o sexo.

4.7 Estudo da microbiota intestinal

As amostras fecais foram armazenadas inicialmente em solução salina estéril (NaCl 0,9%) qsp 10% (p/v). Após a homogeneização mecânica foi semeado o volume de 0,01mL em placas de Petri Contendo os meios de cultura (Agar Columbia + 5% sangue carneiro, Ágar EMB Levine Himedia®) para o crescimento de micro-organismos mesófilos aeróbios Gram positivos e Gram negativos, e as mesmas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas.

Observado o crescimento bacteriano, as colônias foram isoladas e cada colônia foi submetida a coloração de Gram. Foi observada o tipo de hemólise do grupo de bactérias Gram-positivas, que por conseguinte, foram submetidas ao teste da catalase (determinação do gênero), coagulase, sensibilidade a novobiocina, optoquina e bile-esculina e teste de salinidade. As bactérias Gram negativas foram submetidas aos testes de oxidase e de fermentação. Em sequência, foram identificadas por testes bioquímicos convencionais (Newprov® - Pinhais, Paraná, Brasil).

4.8 Níveis de citocinas

As dosagens dos níveis séricos de citocinas foram realizadas por citometria de fluxo, utilizando alíquotas do plasma obtido após centrifugação do sangue cardíaco, ao final do

período experimental. O Kit CBA (Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - BD®) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas IL-6, INF-g e TNF- α em uma mesma amostra, segundo as instruções do fabricante. Sete populações de *beads* com distintas intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). As populações de *beads* foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com: 50 μ L de amostra, 50 μ L da mistura de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção Th1/Th2/Th17 PE (Mouse Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent/1 vial, 4mL). O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão. Os tubos foram homogenizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

4.9 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 5 μ m de espessura. Para cada amostra de tecido hepático foram confeccionadas duas laminas histológicas, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) (Junqueira; Bignolos and Brentani, 1979). A coloração de HE foi empregada para mensuração da área média 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 μ m², área total visualizada = 61.170 μ m²). Os granulomas hepáticos foram avaliados de acordo com os componentes predominantes em: exsudativo (E), exsudativo/exsudativo produtivo (E/EP), exsudativo-produtivo (EP) e produtivo (P) (Alencar et al., 2012).

As lâminas coradas com TM foram utilizadas para avaliar o grau de fibrose, que foi classificado de acordo com o arranjo de fibras de colágeno como: leve (fibras de colágeno soltas), moderada (pequenas áreas isoladas de fibras comprimidas), ou intensa (extensas áreas de fibras de colágeno densamente comprimidas) (AIRES et al., 2014). As imagens foram obtidas usando um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (Motic Images Plus 2.0 MLTM).

4.10 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CPqAM/FIOCRUZ (protocolo 65/2014). Todos os procedimentos descritos para utilização dos animais foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelas normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

4.11 Análise estatística

Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos por média \pm DP e os resultados das variáveis qualitativas, por frequências absolutas e relativas. Na comparação entre os grupos realizou-se teste t, Mann-Whitney e análise de variância ANOVA, com post hoc de Tukey. O software utilizado foi o STATA versão 12 e a significância estatística para análise das hipóteses foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1 - Dieta hiperlipídica e esquistossomose mansônica: efeitos no perfil lipídico e na microbiota intestinal de camundongos

RESUMO

O consumo excessivo de gorduras pode modular a composição da microbiota intestinal, afetar a integridade da mucosa e prejudicar sua permeabilidade. As interações entre a microbiota intestinal e a dieta são relevantes para os processos de doenças inflamatórias, como a esquistossomose, cuja patogênese é fortemente determinada pelo padrão alimentar do hospedeiro. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica no perfil lipídico e microbiota intestinal de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Foram formados quatro grupos: camundongos alimentados com dieta hiperlipídica infectados (DHI) ou não infectados (DHNI) e camundongos com dieta padrão infectados (DPI) ou não infectados (DPNI). Os animais foram infectados com cercárias de *S. mansoni* após 10 semanas de consumo das dietas. Na fase aguda da infecção (60 dias), foram coletadas amostras de sangue cardíaco para análise do perfil lipídico e fezes na região distal do intestino para análise microbiológica. Os resultados das variáveis foram expressos por média \pm DP e por frequências absolutas e relativas. A significância estatística foi de 5%. O colesterol apresentou níveis menores no grupo DPI comparado ao DPNI. O grupo DHNI exibiu aumento nos triglicérides quando comparado ao DPNI e, embora o grupo DHI não tenha apresentado diferenças significativas, revelou uma tendência a valores maiores na comparação ao DPI. A ordem das frequências das bactérias aeróbias encontradas foi: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium sp.* O grupo DHI apresentou o maior percentual de bactérias Gram negativas (50%), seguido pelo DHNI (42,86%). Conclui-se que houve uma redução no colesterol dos animais infectados pelo *S. mansoni*, enquanto que a dieta hiperlipídica promoveu elevação dos triglicérides no grupo não infectado e uma tendência a aumento no grupo infectado. Quanto à microbiota, os grupos submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maiores percentuais de bactérias Gram negativas quando comparados aos respectivos controles.

Palavras-chave: Esquistossomose. Dieta Hiperlipídica. Microbioma Gastrointestinal.

INTRODUÇÃO

As bactérias que compõem a microbiota intestinal apresentam-se com grande variedade, exercendo distintas funções no hospedeiro, como a absorção de nutrientes e modulação do sistema imune. (MORAES et al., 2014). O conteúdo bacteriano intestinal é influenciado por diversos fatores, entre eles higiene pessoal, fármacos, exposição a toxinas ambientais e dieta (MURRAY, 2017). A qualidade da dieta é potencialmente capaz de modular a composição da microbiota intestinal, sobretudo no que se refere ao teor de gorduras, cujo excesso pode afetar a integridade da mucosa e prejudicar sua permeabilidade (CANI et al. 2009; ZHANG et al., 2010; MANI, HOLLIS e GABLER, 2013).

Zhang et al. (2010) demonstram que a composição dietética tem papel determinante na modulação da microbiota intestinal, influenciando em 57% a variação da microbiota, enquanto apenas 12% estariam relacionados a fatores genéticos. Karlsson et al. (2012) investigaram a microbiota intestinal de crianças com idade entre quatro e cinco anos, revelando maior concentração de enterobactérias em obesos. Em ratos obesos com dieta rica em gordura observa-se mudança na microbiota intestinal (DE LA SERRE et al., 2010), com aumento de *Firmicutes* em relação aos *Bacterioides* (FLEISSNER et al., 2010). Andrade et al. (2015), após revisão sistemática da literatura, corroboram a hipótese da maior prevalência de *Firmicutes* na microbiota de obesos. Perturbações na microbiota normal podem acarretar doenças pela eliminação de organismos necessários ou por permitir o crescimento de microorganismos inapropriados (MURRAY, 2017).

As interações entre a microbiota intestinal e a dieta são relevantes para os processos de doenças inflamatórias experimentais em modelos animais (HUFELDT et al., 2010). A esquistossomose é uma doença infecciosa cuja patogênese é fortemente determinada pelo padrão alimentar do hospedeiro (SOUZA et al., 2011). Mudanças no curso da infecção esquistossomótica são demonstradas em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Alencar et al. (2009) relatam superior carga parasitária, com elevação da postura e viabilidade de ovos nas fezes, bem como da densidade de ovos nos tecidos, sugerindo uma maior agressividade da infecção no grupo de animais submetidos à dieta com altos teores de lipídios.

Lima et al (2012) observaram modificações na microbiota intestinal de camundongos esquistossomóticos, que apresentaram maior variedade e quantidade de colônias bacterianas nas coproculturas quando comparados ao grupo controle não infectado. Contudo não são

encontrados estudos que avaliem a microbiota intestinal de camundongos infectados e expostos a uma alimentação rica em gordura. Logo, o presente artigo teve o objetivo de avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica associada à infecção esquistossomótica na microbiota intestinal de camundongos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 43 camundongos fêmeas, da linhagem BALB/c, saudáveis, recém-desmamados (21 a 23 dias), cedidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/Fiocruz. O protocolo experimental dessa pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do CPqAM/FIOCRUZ e aprovado sobre o protocolo 65/2014, seguindo a Declaração de Helsinki e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

No dia seguinte ao desmame, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo DP - alimentado com dieta padrão (normolipídica) (n=20) e Grupo DH – alimentado com dieta hiperlipídica (n=23). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco por gaiola), com água e alimentação “ad libitum”, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura na faixa de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento. A massa corpórea dos animais foi aferida semanalmente, para acompanhamento da evolução ponderal. O ganho total de peso dos animais foi calculado subtraindo-se a massa corpórea inicial da massa corpórea final.

A dieta selecionada para o estudo foi previamente validada por White et al. (2013) como modelo de obesidade induzida. As dietas foram obtidas comercialmente da PragSoluções (Jau – SP, Brasil), cujas composições estão especificadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas

Ingredientes	DP		DH	
	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Amido de milho	415,0	1.660	14,3	57,2
Farelo de soja	305,0	1.281	410,0	1.722
Sacarose	80,0	320	80,0	320
Maltodextrina	70,0	280	70,0	280
Banha	0,0	0	302,0	2.718
Óleo de soja	0,0	0	0,0	0
Ác. graxo soja	50,0	350	50,0	350
Celulose microcrista	31,7	0	25,4	0
L-cistina	1,8	7,2	1,8	7,2
Cloreto colina	1,5	0	1,5	0
Butil-hidroxitolueno	0,014	0	0,028	0
Mix min. mod 50 gps	35,0	0	35,0	0
Mix vitamina	10,0	40	10,0	40
Total	1000,0	3.938	1000,0	5.494

*Dieta padrão (DP): 73,9% de carboidratos, 14,8% de proteínas e 9,8% de lipídios. Dieta hiperlipídica (DH): 26,13% de carboidratos, 14,4% de proteínas e 57,6% de lipídios. (WHITE et al, 2013)

Ao final das 10 semanas de administração das respectivas dietas (WHITE et al., 2013), parte dos animais de cada grupo, após anestesiados com Ketamina e Xilazina, (dose 100-200 mg/kg + 5-16 mg/kg - via intramuscular), foram infectados por via percutânea com 30 cercárias de *S. mansoni* (cepa SLM), obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário do Departamento de Parasitologia (UFPE) pela equipe do Setor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Formaram-se quatro grupos: DPI – Dieta padrão infectado (n=10), DPNI – Dieta padrão não infectado (n=10), DHNI – Dieta hiperlipídica não infectado (n=11) e DHI – Dieta hiperlipídica infectado (n=12).

Aos 60 dias da infecção, os animais foram novamente anestesiados com Ketamina e Xilazina e coletou-se sangue por punção cardíaca. A partir das amostras de sangue, foram avaliados os níveis séricos de colesterol total (Colesterol Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A.,

Brasil), HDL-colesterol (HDL LE, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), e triglicerídeos (Triglicérides Liquiform, Labtest Diagnóstica S.A., Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a coleta de sangue dos animais, procedeu-se a eutanásia por dose excessiva de anestésico. Foi realizada incisão mediana xifo pubiana e a coleta das fezes da porção distal do intestino delgado, sob condições assépticas, para análise da microbiota do trato entérico. As amostras fecais foram armazenadas inicialmente em solução salina estéril (NaCl 0,9%) qsp 10% (p/v). Após a homogeneização mecânica foi semeado o volume de 0,01mL em placas de Petri Contendo os meios de cultura (Agar Columbia + 5% sangue carneiro, Ágar EMB Levine Himedia®) para o crescimento de micro-organismos mesófilos aeróbios Gram positivos e Gram negativos, e as mesmas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas.

Observado o crescimento bacteriano, as colônias foram isoladas e cada colônia foi submetida a coloração de Gram. Foi observada o tipo de hemólise do grupo de bactérias Gram-positivas, que por conseguinte, foram submetidas ao teste da catalase (determinação do gênero), coagulase, sensibilidade a novobiocina, obtoquina e bile-esculina, e teste de salinidade. As bactérias Gram negativas foram submetidas ao teste de oxidase e de fermentação de carboidratos. Em sequência, foram identificadas por testes bioquímicos convencionais (Newprov® - Pinhais, Paraná, Brasil).

Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos por média \pm DP e os resultados das variáveis qualitativas, por frequências absolutas e relativas. Na comparação entre os grupos realizou-se teste Mann-Whitney e análise de variância ANOVA, com *post hoc* de Tukey. O software utilizado foi o STATA versão 12 e a significância estatística para análise das hipóteses foi de 5%.

RESULTADOS

A figura 1 representa as curvas de evolução ponderal dos camundongos da primeira até a última semana de experimentação. Da primeira a 10ª semana, os grupos DH apresentaram pesos corporais mais elevados quando comparados aos grupos DP ($p < 0,01$). A partir da 11ª semana, o grupo DHI não diferiu significativamente do grupo DPI. As massas corporais dos grupos DH mostraram-se equivalentes. Da 14ª semana em diante, os pesos do

grupo DHI passaram a se comportar inferiores ao grupo DHNI ($p < 0,05$). Na comparação dos pesos entre os grupos DPI e DPNI não foram encontradas diferenças significativas durante todo o período.

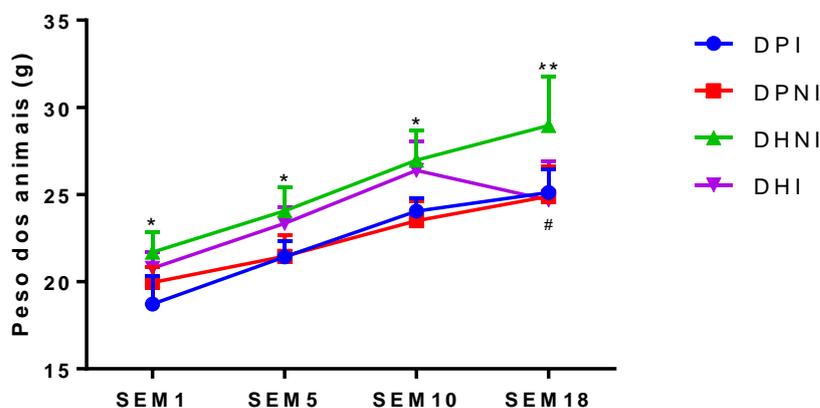


Figura 1 – Curvas ponderais de camundongos da 1ª até a 18ª semana de experimentação. DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média \pm DP. (n=9-12).

* Diferença entre os grupos DH e DP ($p < 0,01$);

Diferença entre os grupos DHI e DHNI ($p < 0,05$) - Teste de ANOVA com Post Hoc de Tukey.

O ganho total de peso dos animais do grupo DHI revelou-se menor comparando-o ao grupo DPI ($p = 0,023$). O grupo DHNI demonstrou maior ganho de massa corpórea do que os grupos DPNI ($p = 0,011$) e DHI ($p = 0,001$). Entre os grupos DHNI e DPI não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2 – Ganho total de massa corpórea dos camundongos por grupo

Grupos	Ganho total de peso (g)
DPI	$6,39 \pm 1,04$ *
DPNI	$4,95 \pm 1,34$
DHNI	$7,26 \pm 1,91$ **
DHI	$4,27 \pm 1,82$

DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média \pm DP. (n=9-12)

* Diferença entre DPI e DHNI ($p = 0,023$); ** Diferença entre DHNI e DPNI ($p = 0,011$) e entre DHNI e DHI ($p = 0,001$); Teste de ANOVA com Post Hoc de Tukey.

A tabela 3 apresenta os níveis séricos de lipídios dos animais. O colesterol apresentou níveis elevados no grupo DPNI quando comparado aos grupos DPI ($p < 0,01$). Os triglicerídeos apresentaram-se elevados no grupo DHNI, quando comparado ao DPNI ($p = 0,002$), mas não diferiu significativamente no grupo DHI quando confrontado aos demais, embora exista uma tendência a maiores valores na comparação ao DPI ($p = 0,058$). Com relação ao HDL, os valores foram menores nos grupos DHI e DPI quando comparado ao e ao DHNI ($p < 0,05$) e DPNI ($p < 0,001$). Entre os grupos não citados não houve diferenças significativas para os parâmetros analisados.

Tabela 3 – Lipídios séricos segundo os grupos de comparação (mg/dL)

	DPI	DPNI	DHNI	DHI
Colesterol Total	97,94 ± 40,28	185,65 ± 28,96 ¹	169,05 ± 52,43 ²	129,53 ± 22,75
Triglicerídeos	69,15 ± 19,85	78,82 ± 12,86	100,44 ± 12,64 ³	95,55 ± 28,79
HDL	27,25 ± 13,07	51,04 ± 7,55 ⁴	61,24 ± 26,64 ⁵	24,38 ± 7,03

DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média ± DP. (n=9-12).

¹Diferença entre os grupos DPNI e DPI ($p < 0,01$) e entre DPNI e DHI ($p = 0,001$); ²Diferença entre os grupos DHNI e DPI ($p < 0,01$); ³Diferença entre os grupos DHNI e DPNI ($p = 0,002$) e entre DHNI e DPI ($p = 0,003$); ⁴Diferença entre os grupos DPNI e DHI ($p < 0,01$) e entre DPNI e DPI ($p < 0,01$); ⁵Diferença entre os grupos DHNI e DHI ($p < 0,05$) e entre DHNI e DPI ($p < 0,05$); - Teste de Mann Whitney.

A distribuição das bactérias isoladas da microbiota intestinal dos camundongos está disposta na Tabela 4. A ordem das frequências das bactérias aeróbias encontradas foi a seguinte: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterococcus sp.*, *Serratia sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium sp.* O grupo DHI apresentou o maior percentual de bactérias Gram negativas (50%), seguido pelo DHNI (42,86%). O percentual de bactérias Gram positivas foi maior nos grupos DPNI (68,75%) e DPI (63,3%).

Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa das bactérias isoladas da microbiota intestinal de camundongos

Micro-organismos	Grupos			
	DPI	DPNI	DHNI	DHI
<i>Bacillus sp.</i>	2 (33,3)	4 (66,7)	2 (33,3)	5 (83,3)
<i>S. saprophyticus</i>	3 (50,0)	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0,0)
<i>E. coli</i>	2 (33,3)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)
<i>Klebsiella sp</i>	0 (0,0)	3(50,0)	0 (0,0)	2 (33,3)
<i>Enterococcus sp.</i>	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (16,7)
<i>Serratia sp.</i>	0 (0,0)	1 (16,7)	2 (33,3)	0 (0,0)
<i>S. aureus</i>	0 (0,0)	3(50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Corynebacterium sp.</i>	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado.(n=6)

DISCUSSÃO

O aumento da incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas na população mundial tem sido associado ao crescimento da obesidade. Dentre os fatores que contribuem para a gênese da obesidade em humanos, destaca-se a inatividade física e o consumo de dietas inadequadas (Rosini, Silva e Moraes, 2012). Em animais de laboratório, a obesidade comumente é induzida com mutações genéticas, contudo a adoção de dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas oferece maior semelhança a grande parte da obesidade humana (CESARETTI E JUNIOR, 2006; ROSINI, SILVA e MORAES, 2012; MALAFAIA et al., 2013). Nesse intuito, foi utilizado no presente estudo um modelo de obesidade exógena, onde foi oferecido ao animal um maior aporte calórico através a administração de uma dieta hiperlipídica previamente validada como modelo de obesidade induzida (WHITE et al., 2013).

Durante as 10 primeiras semanas de administração da dieta observou-se maior massa corpórea nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, corroborando o estudo de White et al. (2013), que atribuem o ganho de peso mais acentuado à maior densidade energética da ração e ao tipo de gordura utilizada. Estudos realizados em camundongos *Swiss* e ratos *Wistar* também demonstram pesos corporais mais elevados nos grupos mantidos com dieta hipercalórica e hiperlipídica por períodos variados, quando comparados aos animais controles (NEVES et al., 2006; ALENCAR et al., 2009; DA SILVA et al., 2010).

Ao final das 10 semanas de consumo da dieta, parte dos animais de cada grupo foi infectado com cercárias de *S. mansoni*, o que parece ter influenciado o ganho de peso. A partir da 11ª semana, o grupo DHI passou a apresentar massa corpórea semelhante ao grupo DPI, no entanto manteve-se com pesos superiores ao DPNI e equivalentes ao DHNI. Da 14ª semana ao final do período experimental, o DHI mostrou-se semelhante aos dois grupos DP, tornando-se inferior ao DHNI. Sugere-se que a associação Dieta Hiperlipídica – Esquistossomose tenha acarretado um decréscimo na evolução ponderal desses animais, já que o grupo não infectado submetido à dieta hiperlipídica manteve-se com pesos mais elevados e os grupos nutridos com dieta padrão (DPI e DPNI) não diferiram entre si. Tais resultados vão de encontro ao observado por outros autores. Alencar et al. (2009) e Neves et al. (2007) observaram um maior ganho de massa corporal nos animais alimentados com dieta rica em gordura independentemente da infecção, contudo o teor lipídico empregado na dieta era de 29%, inferior ao utilizado no presente estudo (57,6%).

Com relação à análise bioquímica, o colesterol apresentou níveis mais elevados no grupo DPNI quando comparado aos grupos DPI. O grupo DHNI também exibiu aumento nos triglicérides quando comparado ao DPNI e, embora o grupo DHI não tenha apresentado diferenças significativas quando confrontado aos demais, revelou uma tendência a valores maiores na comparação ao DPI. No estudo de White et al. (2013) as análises mostraram concentrações semelhantes nos lipídios séricos entre os grupos alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica por 10 semanas. Estudo prévio em ratos *Wistar* também não encontraram diferenças nos níveis de triglicérides após 12 semanas de indução de obesidade por meio de dieta contendo 42% de lipídios (BUETTNER et al., 2006). É possível que o maior tempo empregado no presente estudo (18 semanas) tenha sido determinante para causar dislipidemia nos animais diante do consumo da dieta rica em gordura.

Em modelos experimentais de associação entre obesidade e esquistossomose, camundongos alimentados com dieta rica em gordura apresentaram níveis significativamente maiores de colesterol total quando comparados aos nutridos com dieta normolipídica (NEVES et al., 2006; NEVES et al., 2007; ALENCAR et al., 2009). Por outro lado, há relatos na literatura de redução nos níveis de colesterol em indivíduos esquistossomóticos (SPRONG; SCHANEK; VAN DIJK, 2006; SILVA et al., 2001; RAMOS et al., 2004; ALENCAR et al., 2009), fato também observado no presente estudo. A diminuição dos níveis de colesterol pode ser explicada em virtude do *S. mansoni* não ser capaz de sintetizar colesterol, adquirindo-o por endocitose das moléculas de LDL-c (SPRONG; SCHANEK; VAN DIJK, 2006) ou ainda

devido à produção de anticorpos naturais para colesterol em reações inflamatórias crônicas, que teriam relação com a metabolização do colesterol por opsonização (ALVING; WASSEF, 1999). Com relação ao HDL, os valores foram menores nos grupos infectados quando comparados aos seus respectivos controles. Estudos em humanos e utilizando primatas como modelo experimental de infecção por *S. mansoni*, também revelam níveis diminuídos de HDL plasmáticos (LIMA et al., 1998; SILVA et al., 2001; RAMOS et al., 2004), fato que pode estar relacionado a uma redução da atividade da enzima LCAT na parasitose (RAMOS et al., 2004).

A esquistossomose induz diversas alterações orgânicas no hospedeiro vertebrado, inclusive em nível de intestino. Lima et al. (2012) mencionam fibrose e aumento no calibre das alças intestinais, hipotrofia nas microvilosidades e modificação na microbiota. O trato entérico é colonizado por um grande número e diversidade de espécies microbianas que interferem na expressão genética, no sistema imunológico, no risco de doenças crônicas e no metabolismo, afetando a aquisição de nutrientes e a regulação da energia adquirida (BACKHED et al., 2004; MORAES et al., 2014; ANDRADE et al., 2015). Mudanças ambientais, hábitos de vida como dieta, estresse, uso de antibióticos ou estados patológicos podem alterar a composição do microbioma intestinal.

A dieta consiste em fator decisivo das características da colonização intestinal, podendo modificar o seu padrão desde o início da vida (PENDERS et al, 2006). Elevados teores de gorduras na dieta podem afetar a integridade da mucosa e prejudicar sua permeabilidade (CANI et al, 2009; ZHANG et al., 2010). Experimentos com camundongos *germ-free* transplantados com microbiota intestinal humana, submetidos a uma alimentação rica em gordura e açúcar, detectaram alterações rápidas na composição da microbiota, revelando aumento no número de Firmicutes e redução de Bacteroidetes (GOODMAN et al., 2011). Dietas hiperlipídicas podem ocasionar mudanças na microbiota intestinal mesmo quando não associadas à obesidade. De La Serre et al. (2010), avaliando ratos alimentados com ração de alto teor lipídico, concluíram que essa alimentação acarretou redução significativa no número total de bactérias independentemente do peso dos animais.

Os resultados desse estudo também demonstram diferenças na microbiota intestinal dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, onde foi observado o maior percentual de bactérias Gram negativas na análise entre os grupos, chegando a 50% no grupo DH infectado. Autores propuseram que uma alimentação rica em gorduras gera uma alteração

negativa da microbiota intestinal, com aumento de bactérias Gram negativas e redução de *Bifidobacterias*, o que poderia acarretar alteração da permeabilidade intestinal, com maior absorção de LPS (lipopolissacarídeos bacterianos), caracterizando um quadro de endotoxemia metabólica. Essas modificações estimulariam a secreção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para desordens metabólicas (CANI e DELZENNE, 2007; CANI e DELZENNE, 2009).

Karlsson et al (2012), investigando a microbiota intestinal em crianças pré-escolares com e sem excesso de peso e obesidade, encontrou uma maior concentração de Enterobactérias nos obesos. Alguns trabalhos em humanos e em ratos mostram maior prevalência de bactérias Firmicutes quando comparada à de Bacterioides na microbiota intestinal de obesos (BACKHED, 2004; LEY et al., 2005; BERVOETS et al, 2013), contudo não foram observadas diferenças com relação à variabilidade das espécies encontradas nesse estudo, talvez em razão do modelo experimental utilizado ou do tamanho da amostra.

Nossos resultados também vão de encontro aos relatos de Lima et al (2012), que descreveram maior variedade de colônias bacterianas nas coproculturas de camundongos esquistossomóticos na fase crônica da infecção, quando comparados ao controle. O presente estudo avaliou os animais na fase aguda da infecção, o que pode ter influenciado os resultados discordantes, já que na fase crônica há uma imunodeficiência relativa em virtude do predomínio da resposta imunológica do perfil Th2, que se sobressai à resposta Th1. A relação da microbiota intestinal com a obesidade é um assunto atual, entretanto os dados disponíveis são controversos. Determinados autores afirmam que a composição da microbiota poderia desencadear obesidade, enquanto outros mencionam que a mesma alteraria o equilíbrio da microbiota intestinal (ANDRADE et al., 2015).

Numerosos trabalhos estudam experimentalmente associação da esquistossomose e desnutrição induzida com dieta hipoprotéica, no entanto são escassos os estudos associando esquistossomose à obesidade ou dieta hiperlipídica, não sendo encontradas avaliações de microbiota intestinal nessa associação. Novos trabalhos, portanto, são necessários para tentar melhor elucidar essa relação.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a dieta hiperlipídica promoveu mudanças na microbiota intestinal dos animais, elevando o percentual de bactérias Gram negativas tanto no grupo submetido à esquistossomose como no não infectado. Com relação à análise bioquímica, foi observada uma redução no colesterol dos animais infectados pelo *S. mansoni*, enquanto que a dieta hiperlipídica promoveu elevação dos triglicerídeos no grupo não infectado e uma tendência a aumento no grupo infectado.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

5.2 Artigo 2 - Efeitos de dieta hiperlipídica na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) e histopatologia hepática em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica na produção de citocinas (IL-6, TNF- α , IFN- γ) e histopatologia hepática em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Foram formados os grupos experimentais: camundongos alimentados com dieta hiperlipídica infectados (DHI) ou não infectados (DHNI) e camundongos com dieta padrão infectados (DPI) ou não infectados (DPNI). Os animais foram infectados com cercárias de *S. mansoni* após 10 semanas de administração das. Na fase aguda da infecção (60 dias), foram coletadas amostras de sangue cardíaco para análise da produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IFN- γ) e fragmentos do fígado para análise histopatológica e histomorfométrica dos granulomas hepáticos. Realizou-se perfusão porta-hepática para determinação da carga parasitária através da recuperação de vermes adultos. Os resultados das variáveis foram expressos por média \pm DP. A significância estatística para análise das hipóteses foi de 5%. Com relação à produção de citocinas, os grupos DHI e DPI apresentaram elevação na concentração sérica das citocinas IL-6 e IFN- γ quando comparado aos controles. As concentrações de TNF- α foram maiores no grupo DPI nas comparações com os demais. Na comparação com o DPI, o grupo DHI apresentou maior densidade de ovos nas fezes ($p=0,02$), maior recuperação total de vermes ($p<0,001$) e de vermes fêmeas ($p=0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas na área média dos granulomas entre os grupos DHI e DPI, enquanto a contagem de granulomas mostrou-se elevada no DHI ($p<0,001$). Conclui-se que a dieta hiperlipídica promoveu elevação da carga parasitária e induziu uma maior concentração de granulomas hepáticos, no entanto não houve diferenças significativas quanto à produção de citocinas e histomorfometria dos granulomas.

Palavras-chave: Esquistossomose. Dieta Hiperlipídica. Imunidade.

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no controle das doenças infecciosas e parasitárias, a esquistossomose continua a ser um importante problema de saúde pública. Dados do Ministério da Saúde (2013) estimam uma prevalência de 6 milhões de indivíduos acometidos, distribuídos pelos estados brasileiros, e 1,5 milhões de pessoas vivendo em áreas sob o risco de contrair a doença. A parasitose está inserida no *hall* das doenças negligenciadas, “enfermidades que ocorrem principalmente em áreas pobres de países de baixa e média renda e que são historicamente negligenciadas pela pesquisa científica na busca de novas alternativas terapêuticas e de prevenção” (BRASIL, 2014). Fatores como cepa do parasito, carga parasitária, idade, estado nutricional e resposta imune do paciente influenciam a forma de apresentação da esquistossomose (NEVES et al., 2005). O *Schistosoma mansoni* possui uma grande dependência pelo metabolismo do hospedeiro (SAULE et al., 2005), logo sua patogênese é fortemente determinada pelo padrão alimentar do indivíduo (SOUZA et al., 2011).

Doenças tropicais negligenciadas e desordens nutricionais representam uma preocupação por afetarem populações vulneráveis (SILVA et al., 2012). Recentemente, os países em desenvolvimento iniciaram uma transição nutricional, caracterizada pela redução da prevalência da desnutrição e pelo avanço da obesidade (AMUNA; ZOTOR, 2008). Segundo dados do novo relatório da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), a obesidade já acomete 20% da população brasileira e 50% encontram-se com sobrepeso. Dentre os fatores que contribuem para a gênese da obesidade em humanos, destaca-se a inatividade física e o consumo de dietas inadequadas (ROSINI, SILVA e MORAES, 2012). O consumo excessivo de gorduras saturadas apresenta forte associação com doenças crônicas degenerativas não transmissíveis. Dietas hiperlipídicas e hipercalóricas associam-se com diferentes alterações teciduais e sistêmicas em roedores, desvinculadas da ocorrência de obesidade (OUWENS, DIAMANT e FODOR, 2007; HALADE, JIN e LINDSEY, 2012).

Poucos trabalhos avaliam a associação do consumo excessivo de lipídios à esquistossomose. Alencar et al. (2009), avaliando efeitos de dieta hiperlipídica em camundongos submetidos à infecção esquistossomótica crônica, verificaram uma maior infectividade nesse grupo de animais, quando comparados aos controles alimentados com dieta normolipídica. Encontraram ainda uma superior carga parasitária, com elevação da

postura e viabilidade de ovos nas fezes, bem como da densidade de ovos nos tecidos, sugerindo uma maior agressividade da infecção no grupo de animais submetidos à altos níveis lipídicos. Outro estudo, desenvolvido por Neves et al. (2007), comparando animais obesos e eutróficos, não apontou diferenças significativas quanto à infectividade, no entanto a contagem de ovos nas fezes e nos tecidos, assim como a diversidade morfológica de granulomas hepáticos foram superiores no grupo de animais obesos, evidenciando que a dieta com elevado teor lipídico produz efeitos na infecção pelo *S. mansoni*.

A obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica. Os níveis circulantes de muitas citocinas e proteínas de fase aguda associadas à inflamação apresentam-se elevados em pacientes obesos. O aumento da concentração das adipocinas pró-inflamatórias, destacando-se a IL-6, o TNF- α e a leptina, impacta em diversas funções corporais como balanço energético, sistema imune, metabolismo lipídico e homeostase corporal (PRADO et al., 2009). Na fase aguda da doença esquistossomótica a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1, observando-se a presença de células mononucleares de sangue periférico produzindo grandes quantidades de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (De JESUS *et al.*, 2002; COURA, 2004). Apesar dos fortes indícios de que a sobreposição da obesidade à esquistossomose possa promover uma reação inflamatória mais exacerbada, não são encontrados trabalhos que avaliem o comportamento imune frente a essa associação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Camundongos fêmeas, da linhagem Balb/c, saudáveis, recém-desmamados (21 a 23 dias), cedidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz, foram utilizados como modelo experimental para o desenvolvimento do estudo. O protocolo experimental foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais do CPqAM/FIOCRUZ e aprovado sobre o protocolo 65/2014, seguindo a Declaração de Helsinki e os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo DP - alimentado com dieta padrão normolipídica (20 animais) e Grupo DH – alimentado com dieta hiperlipídica (23 animais). A dieta hiperlipídica utilizada foi previamente validada por White et al. (2013) como modelo de obesidade induzida. As dietas, cujas composições estão especificadas na

Tabela 1, foram comercialmente adquiridas da PragSoluções (Jau – SP, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 a 6 por gaiola), com água e alimentação “ad libitum”, ciclo de claro/escuro de 12 horas e temperatura na faixa de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento. O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, para acompanhamento da evolução ponderal.

Tabela 1. Composição das dietas

Ingredientes	DP		DH	
	g/kg	kcal	g/kg	kcal
Amido de milho	415,0	1.660	14,3	57,2
Farelo de soja	305,0	1.281	410,0	1.722
Sacarose	80,0	320	80,0	320
Maltodextrina	70,0	280	70,0	280
Banha	0,0	0	302,0	2.718
Óleo de soja	0,0	0	0,0	0
Ác. graxo soja	50,0	350	50,0	350
Celulose microcrista	31,7	0	25,4	0
L-cistina	1,8	7,2	1,8	7,2
Cloreto colina	1,5	0	1,5	0
Butil-hidroxitolueno	0,014	0	0,028	0
Mix min. mod 50 gps	35,0	0	35,0	0
Mix vitamina	10,0	40	10,0	40
Total	1000,0	3.938	1000,0	5.494

Dieta padrão (DP): 73,9% de carboidratos, 14,8% de proteínas e 9,8% de lipídios. Dieta hiperlipídica (DH): 26,13% de carboidratos, 14,4% de proteínas e 57,6% de lipídios. (WHITE et al, 2013)

Ao final das 10 semanas de administração das dietas (WHITE et al., 2013), formaram-se 4 grupos: DPI – Dieta padrão infectado (n=10), DPNI – Dieta padrão não infectado (n=10), DHNI – Dieta hiperlipídica não infectado (n=11) e DHI – Dieta hiperlipídica infectado (n=12). A infecção dos animais ocorreu por via percutânea, através da adição uma suspensão contendo 30 cercárias de *S. mansoni* (cepa SLM), na porção abdominal. As cercarias foram obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário do Departamento de Parasitologia (UFPE) pela equipe do Setor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), após anestesia com Ketamina e Xilazina, (dose

100-200 mg/kg + 5-16 mg/kg - via intramuscular). Aos 45 dias de infecção, os camundongos infectados foram expostos individualmente para obtenção do material fecal e confecção de lâminas parasitológicas pelo método de Kato-Katz (KATZ, CHAVES & PELLEGRINO, 1972), com a finalidade de determinação da infecção e quantificação do número de ovos por grama de fezes.

Aos 60 dias de infecção (fase aguda da infecção esquistossomótica), os animais foram novamente anestesiados com Ketamina e Xilazina para coleta das amostras biológicas. O sangue destinado à avaliação da produção de citocinas foi obtido por punção cardíaca e em seguida realizou-se incisão mediana xifo pubiana para remoção do fígado e do baço. Os órgãos foram pesados e determinou-se a relação peso do órgão/peso corporal total. Os animais eutanasiados foram submetidos à perfusão porta-hepática, objetivando a avaliação do parasitismo em virtude do número de vermes adultos. Os vermes foram contados e classificados segundo o sexo.

Fragmentos do 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 laminas histológicas, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) (Junqueira; Bignolos and Brentani, 1979). A coloração de HE foi empregada para análise histopatológica e morfométrica do tecido hepático, através da mensuração da área média 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 µm², área total visualizada = 61.170µm²). Os granulomas hepáticos foram avaliados de acordo com os componentes predominantes em: exsudativo (E), exsudativo/exsudativo produtivo (E/EP), exsudativo-produtivo (EP) e produtivo (P) (Alencar et al., 2012).

Fragmentos do 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 laminas histológicas, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) (Junqueira; Bignolos and Brentani, 1979). A coloração de HE foi empregada para análise histopatológica e morfométrica do tecido hepático, através da mensuração da área média 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^2 , área total visualizada = 61.170 μm^2). Os granulomas hepáticos foram avaliados de acordo com os componentes predominantes em: exsudativo (E), exsudativo/exsudativo produtivo (E/EP), exsudativo-produtivo (EP) e produtivo (P) (Alencar et al., 2012).

As lâminas coradas com TM foram utilizadas para avaliar o grau de fibrose, que foi classificado de acordo com o arranjo de fibras de colágeno como: leve (fibras de colágeno soltas), moderada (pequenas áreas isoladas de fibras comprimidas), ou intensa (extensas áreas de fibras de colágeno densamente comprimidas) (AIRES et al., 2014). As imagens foram obtidas usando um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (Motic Images Plus 2.0 MLTM).

A avaliação da produção de citocinas foi realizada por citometria de fluxo, utilizando alíquotas do plasma obtido após centrifugação do sangue cardíaco. O Kit CBA (Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - BD®) foi usado nesse estudo para a quantificação das citocinas IL-6, TNF- α e IFN- γ em uma mesma amostra, seguindo as instruções do fabricante.

Os resultados das variáveis quantitativas foram expressos por média \pm DP e os resultados das variáveis qualitativas, por frequências absolutas e relativas. Na comparação entre os grupos realizou-se teste t, Mann-Whitney e análise de variância ANOVA, com *post hoc* de Tukey. O software utilizado foi o STATA versão 12 e a significância estatística para análise das hipóteses foi de 5%.

RESULTADOS

A figura 1 representa as curvas de evolução ponderal dos camundongos da 1ª até a última semana de experimentação. Da primeira a décima semana, os grupos DH apresentaram pesos mais elevados quando comparados aos grupos DP ($p < 0,01$). A partir da décima primeira semana, os pesos não diferiram significativamente entre os grupos infectados. As massas corporais dos grupos DH mostraram-se equivalentes. Da 14ª semana em diante, os pesos do grupo DHI passaram a se comportar inferiores ao grupo DHNI ($p < 0,05$). Na última

semana de experimentação, três animais do grupo DHI vieram a óbito, fato não observado nos outros grupos.

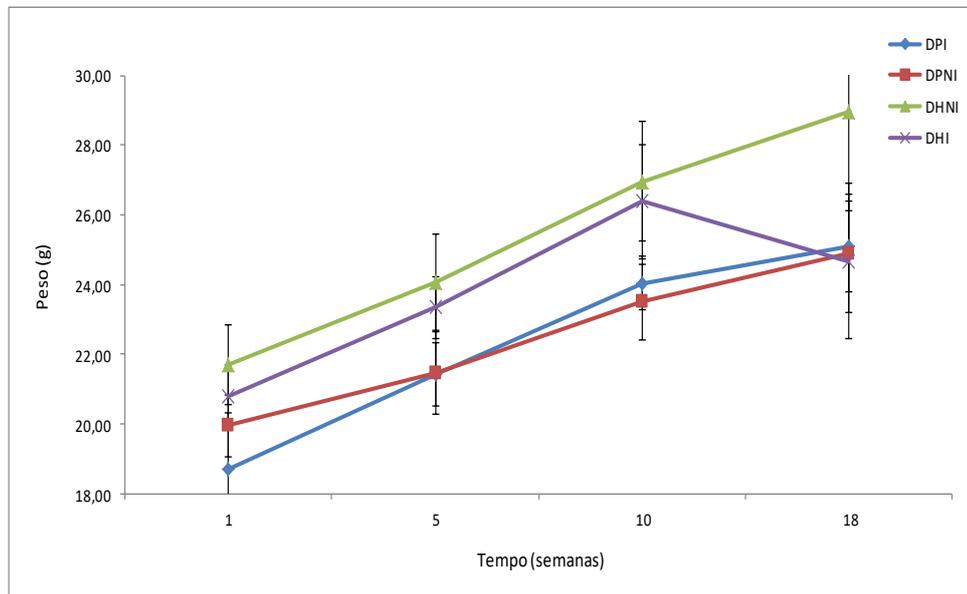


Figura 1 – Curvas ponderais de camundongos da 1ª até a 18ª semana de experimentação. DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média \pm DP.

Com relação aos pesos dos órgãos, houve elevação nos grupos infectados (DPI e DHI) quando comparados aos controles (DPNI e DHNI) ($p < 0,001$). Confrontando os grupos submetidos à infecção, não foram observadas diferenças significativas. Nos animais não infectados, o fígado mostrou-se maior no grupo alimentado com dieta hiperlipídica ($p = 0,04$), enquanto o peso do baço apresentou-se semelhante (tabela 2).

Em relação às avaliações parasitológicas, o grupo DHI apresentou maior densidade de ovos nas fezes ($p = 0,03$), maior recuperação total de vermes ($p < 0,001$) e de vermes fêmeas ($p = 0,01$) quando comparado ao grupo DPI.

Tabela 2 – Dados biométricos e parasitológicos de camundongos alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica

Variáveis	Grupos			
	DPI	DPNI	DHNI	DHI
Peso do fígado (g)	1,94 ± 0,20 ¹	1,14 ± 0,19	1,32 ± 0,14 ³	1,86 ± 0,22 ²
Peso do baço (g)	0,79 ± 0,20 ¹	0,13 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,86 ± 0,16 ²
Nº de ovos/ g	168 ± 90, 6	---	---	314,2 ± 173,2 ⁴
Nº total de vermes	16,60 ± 4,50	---	---	26,40 ± 1,35 ⁵
Nº de vermes fêmeas	9,30 ± 2,58	---	---	12,20 ± 1,62 ⁶

DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média ± DP.

¹ Comparações entre DPI e DPNI e entre DPI e DHNI ($p < 0,001$); ² Comparações entre DHI e DPNI e entre DHI e DHNI ($p < 0,001$); ³ Comparação entre DHNI e DPNI ($p = 0,04$); ⁴ Comparação entre DHI e DPI ($p = 0,03$); ⁵ Comparação entre DHI e DPI ($p < 0,001$); ⁶ Comparação entre DHI e DPI ($p = 0,01$) - Teste t.

O grupo DHI apresentou elevação na concentração sérica das citocinas IL-6 e IFN- γ quando comparado aos grupos DHNI ($p = 0,02$ e $p = 0,001$, respectivamente). Os níveis de IL-6 e IFN- γ também comportaram-se mais elevados no grupo DPI confrontado ao grupo DPNI ($p < 0,001$). As concentrações de TNF- α foram mais elevadas no grupo DPI nas comparações com o DHI ($p < 0,05$) e o DPNI ($p < 0,01$). Os grupos não infectados (DPNI e DHNI) não diferiram entre si com relação à produção de nenhuma das citocinas avaliadas.

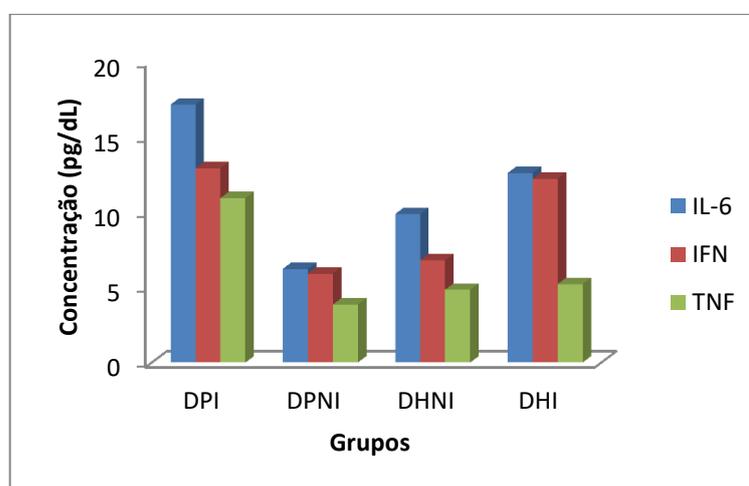


Figura 2 – Níveis séricos de citocinas de camundongos por grupo de experimentação. DPI- Dieta Padrão Infectado, DPNI- Dieta Padrão Não Infectado, DHNI – Dieta Hiperlipídica Não Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média ± DP. Teste de Mann-Whitney.

A análise histológica do fígado dos animais do grupo DHI revelou a presença de granulomas periovulares predominantemente E/EP e EP, muitos formando grandes grupos

coalescentes (Figura 3B). Poucos granulomas produtivos também foram visualizados, com margens bem definidas e presença de macrófagos e poucos linfócitos próximos ao ovo central do parasita. Além disso, notava-se deposição acentuada de colágeno, com grau de fibrose intensa (Figura 3D). Em todos os animais desse grupo as infecções foram de caráter intenso, em relação ao aspecto histopatológico. No grupo DPI os granulomas periovulares E e E/P foram mais numerosos, isolados e esparsamente distribuídos pelo parênquima hepático (Figura 3A), às vezes formando conglomerados, sendo os mesmos de menor dimensão em relação ao que foi visto no grupo DHI. Em muitos desses granulomas havia deposição de colágeno, todavia em quantidade inferior ao observado no grupo DHI e grau de fibrose moderado (Figura 3C).

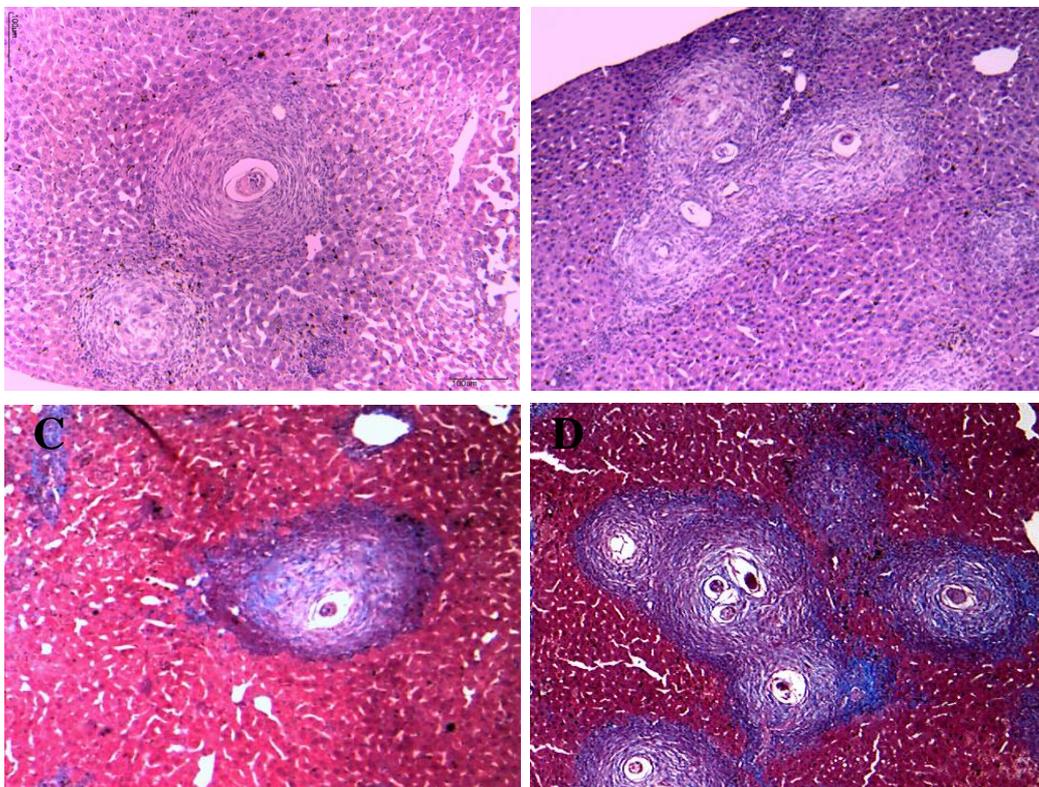


Figura 3. Granulomas hepáticos de camundongos esquistossomóticos. **A.** Grupo DPI - Granuloma E/EP isolado; **B.** Grupo DHI - Granulomas coalescidos; **C.** Grupo DPI - Granuloma com moderado grau de fibrose. **D.** Grupo DHI -Granulomas coalescidos com grau de fibrose intensa. A e B. Coloração HE. C e D. Coloração TM.

A tabela 3 apresenta os resultados da análise morfométrica dos granulomas hepáticos. Não foram encontradas diferenças significativas na área dos granulomas entre os grupos DPI e DHI. Já a contagem de granulomas mostrou-se elevada no grupo DHI ($p < 0,001$).

Tabela 3 – Número médio e área de granulomas hepáticos

	DPI	DHI	<i>p</i> valor*
Número médio	6,00 ± 1,29	8,91 ± 2,98	<0,001
Área (µm²)	51578,53 ± 20237,92	55833,36 ± 21753,11	0,215

DPI- Dieta Padrão Infectado, DHI – Dieta Hiperlipídica Infectado. Valores representados em média ± DP. *Teste de Mann Whitney.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar se uma alimentação com alto teor de gordura poderia causar alterações em parâmetros da infecção esquistossomose em camundongos. Os resultados apontam que a ração rica em lipídios promoveu aumento de peso nos animais, contudo a infecção pelo *S. mansoni* mostrou-se determinante para que o grupo alimentado com essa dieta perdesse peso nas últimas semanas de experimentação. Já os animais alimentados com a dieta padrão normolipídica não sofreram redução na massa corporal após a infecção, o que deixa evidente que a alteração foi provocada pela associação das duas intervenções. Recente estudo desenvolvido por Hussaarts et al. (2015) relata um ganho significativamente menor de peso em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em resposta à infecção por *S.mansoni* e explica que esse efeito resulta exclusivamente de uma redução na gordura corporal, sem afetar a massa magra.

Estudos anteriores observaram um maior ganho de massa corpórea em animais alimentados com dieta hiperlipídica independentemente da infecção (Alencar et al. 2012; Alencar et al., 2009; e Neves et al.,2007), indo de encontro aos resultados do presente trabalho, contudo o teor de lipídios empregado nas dietas era de 29%, valor expressivamente inferior ao adotado no presente estudo (57,6%). Acredita-se que a sobreposição do consumo da dieta com elevado teor de gordura à helmintíase tenha gerado uma maior debilidade orgânica nos animais, hipótese que ganha força frente à mortalidade observada no grupo (25%). Segundo Neves et al. (2007b), um ambiente rico em colesterol favorece o sucesso reprodutivo de vermes adultos, alterando o desenlace da infecção esquistossomótica. Nesse estudo, constatou-se uma maior densidade de ovos nas fezes e maior recuperação total de vermes após perfusão porta-hepática, bem como de vermes fêmeas, nos animais submetidos à alimentação rica em gordura, corroborando os resultados de Neves et al (2007a) e Alencar et al (2009).

A quantidade e a procedência da gordura ingerida demonstram associação com diferentes respostas relacionadas ao metabolismo lipídico, hepático e à secreção de citocinas e hormônios (Nascimento; Ribeiro; Oyama, 2009). Uma dieta com alto teor lipídico favorece a obesidade, doença multifatorial que ocasiona um estresse inflamatório crônico de baixo grau, intercedido pela infiltração de células imunológicas no tecido adiposo e pelos próprios adipócitos (Lacerda, Bock e Funchal, 2015). Pesquisadores demonstram que a alimentação rica em ácidos graxos saturados elevam os níveis de citocinas pró inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Flanagan et al., 2008; Ikeoka et al., 2010). A dieta hiperlipídica no presente estudo, isoladamente, não acarretou alterações nos níveis de TNF- α , IL-6 e IFN- γ . É possível que as modificações nos padrões de produção de citocinas só sejam induzidas após o consumo prolongado da dieta, contudo Flanagan et al. (2008), avaliando ratas fêmeas Sprague-Dawley, verificaram mudanças proeminentes em apenas 10 semanas de administração de dieta com elevado teor de gorduras saturadas. Em virtude da acentuada secreção dessas citocinas ser atribuída ao aumento dos adipócitos, é provável que o modelo de dieta viabilizado nesse estudo não tenha elevado a adiposidade dos animais, contudo esse parâmetro não foi avaliado.

Modelos murinos têm sido vastamente utilizados para investigar a resposta imune protetora frente à esquistossomose, principalmente com *S. mansoni* sendo a espécie infectante. Durante os estágios iniciais da infecção, os ratos exibem uma resposta imune de tipo predominantemente Th1 a antígenos parasitários (Everts et al., 2012), observando-se a produção de grandes quantidades de IFN- γ , TNF- α e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (DE JESUS et al., 2002; COURA, 2004). Uma vez iniciada a deposição de ovos, cerca de 6 semanas após a infecção, a resposta começa a mudar, com o perfil imunológico sendo substituído pelo predomínio da resposta Th2 (Everts et al., 2012). A teoria mais aceita é que antígenos dos esquistossômulos, numa primo-infecção, induziriam uma resposta Th1, com exuberante atividade inflamatória contra o antígeno liberado pelo ovo. Com o tempo, em resposta à liberação de carboidratos da parede do ovo, a secreção de IL-10 ocasionaria a modulação da resposta imune e dos sintomas (SILVA, SANTANA e DE JESUS, 2008).

Os resultados desse estudo revelam concentrações de IL-6 e IFN- γ maiores nos grupos infectados quando comparados aos controles, corroborando os relatos na literatura. Entre os animais infectados, não houve diferença nos níveis de IL-6 e IFN- γ , entretanto concentrações menores de TNF- α foram observadas no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. Borish e Steink (2003) mencionam que o TNF- α estimula a secreção de IL-10, o que sugere sua participação no processo de homeostasia, já que estímulos inflamatórios induzem a formação

de TNF- α e essa, por sua vez, estimula a secreção de IL-10, que por mecanismos de *feedback* finaliza a síntese do TNF- α . Apesar dos diversos estudos de cunho imunológico disponíveis, não são encontrados dados acerca da produção de citocinas na esquistossomose associada ao consumo excessivo de lipídios.

A análise histológica do fígado dos animais revelou a presença de granulomas periovulares predominantemente E/EP e EP do grupo DHI. Poucos granulomas produtivos foram visualizados, apresentando margens definidas e macrófagos e poucos linfócitos próximos ao ovo central do parasita. Estudos anteriores indicam que durante a fase aguda da infecção, os granulomas exsudativos são predominantes (SILVA et al., 2000). Antígenos solúveis dos ovos atraem células inflamatórias como macrófagos, linfócitos, eosinófilos e fibroblastos (VAN DE VIJVER et al., 2004). Segundo Neves et al. (2007), é possível que as alterações hepáticas induzidas pela dieta rica em gordura promova aumento no recrutamento das células do granuloma.

No grupo DPI os granulomas periovulares E e E/P foram mais numerosos, isolados e esparsamente distribuídos pelo parênquima hepático, às vezes formando conglomerados, sendo os mesmos de menor dimensão em relação ao que foi visto no grupo DHI. Em muitos desses granulomas havia deposição de colágeno, todavia em quantidade inferior ao observado no grupo DHI e grau de fibrose moderado. A quantidade de fibrose maior nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica pode ser explicada por um aumento nos níveis de leptina (PROCACCINI, 2010). A leptina foi a primeira adipocina associada com fibrose hepática (DUAN et al, 2013; MARRA et al, 2011; BERTOLINI et al, 2010).

No fígado, a leptina, hormônio secretado pelo tecido adiposo branco, (PAZ-FILHO et al, 2010), transmite propriedades fibrogênicas por meio de sua interação com as células estreladas do fígado ativadas, responsáveis pela fixação da matriz extracelular no Espaço de Disse (ZHOU et al, 2014). Possíveis justificativas para o efeito fibrogênico da leptina são o estímulo de citocinas específicas, como a TGF- β , modulação da resposta imune por células T e/ou estimulação direta de vias de sinalização celular, o que resultaria em modificações em fatores transcricionais de ativação para a formação de colágeno (JAMES et al, 1998).

CONCLUSÃO

O consumo de dieta com elevado teor de lipídios promoveu modificações em parâmetros parasitológicos da esquistossomose, acarretando uma maior carga parasitária nos animais (maior densidade de ovos nas fezes, recuperação total de vermes e de vermes fêmeas) e uma infecção mais intensa do ponto de vista histopatológico, todavia não foram observadas alterações significativas na produção das citocinas IL-6 e IFN- γ . Os níveis de TNF- α , no entanto, apresentaram-se inferiores em camundongos esquistossomóticos alimentados com alto teor de gordura, ao serem confrontados com os que receberam alimentação normolipídica. Novos estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

6 CONCLUSÕES

O consumo de dieta com elevado teor de lipídios promoveu modificações em parâmetros parasitológicos da esquistossomose, acarretando uma maior carga parasitária nos animais (maior densidade de ovos nas fezes, recuperação total de vermes e de vermes fêmeas) e uma infecção mais intensa do ponto de vista histopatológico, todavia não foram observadas alterações significativas na produção das citocinas IL-6 e IFN- γ . Os níveis de TNF- α , no entanto, apresentaram-se inferiores em camundongos esquistossomóticos alimentados com alto teor de gordura, ao serem confrontados com os que receberam alimentação normolipídica.

Com relação às análises bioquímicas, foi observada uma redução no colesterol dos animais infectados pelo *S. mansoni*, enquanto que a dieta hiperlipídica promoveu elevação dos triglicerídeos no grupo não infectado e uma tendência a aumento no grupo infectado.

Conclui-se ainda que a dieta hiperlipídica promoveu mudanças na microbiota intestinal dos animais, elevando o percentual de bactérias Gram negativas tanto no grupo submetido à esquistossomose como no não infectado.

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier (medicina), 2008.
2. ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, London, n. 383, p. 787-793, Out., 1996.
3. ABDU, S.B. Schistosoma mansoni induce granulomatous inflammation and lesion to the enteric nervous system in mouse colon. **J Egypt Soc Parasitol.**, v. 39(1), p.183-90, Apr., 2009.
4. AHIMA SR, FLIER JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. Trends **Endocrinol Metab**; (8): 327-32, 2000.
5. AIRES AL, ALBUQUERQUE MCPA, SILVA RAR, SCHIRATO GV, PONTES FILHO NT, ARAÚJO SB, SOUZA VMO, COSTA VMA, MALAGUEÑO E. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. **Parasitol Res.** V. 111(4): 1569–1578, 2012.
6. ALENCAR, A.C.M.B.; NEVES, R.H.; ÁGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; GOMES, D.C.; MACHADO-SILVA, J.R. High fat diet has a proeminent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 (4): 608-613, 2009.
7. ALENCAR, A.B.; NEVES, R.; DE OLIVEIRA, A.; MACHADO-SILVA, J. Changes in the small intestine of Schistosoma mansoni-infected mice fed a high-fat diet. **Parasitology**, 139(6): 716-725, 2012.
8. ALVES, M.N.R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. **Ver. Brás. Nutr. Clin.**, v. 21, n. 4, p. 316-319, 2006.
9. ALVING, C.R.; WASSEF, N.M. Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism. **Immunology Today**, v. 20: p. 362-366. 1999.

10. AMUNA P, ZOTOR FB. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. **Proc Nutr Soc**, v. 67:82-90, 2008.
11. ANDRADE, V.L.A.; REGAZZONI, L.A.A. Obesidade e microbiota intestinal. **Ver Med Minas Gerais**, v. 25(4):583-589. 2015.
12. ANDRADE, Z.A.; WARREN K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. R Soc Trop Med Hyg**, v. 58, p. 53, 1964.
13. ARAUJO, M.I.; DE JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, p.1399-403, 1996.
14. BACKHED, B; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L.V, Koh, G.Y. NAGY, A.; Semenkovich, C.F.; Gordon, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p.15718–15723, 2004.
15. BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A.L.C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S.M.L.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B; MORAES, C.N.L.; SPINELLI, V. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p.725-728, Rio de Janeiro, 2001.
16. BARSOUM, R.S. Schistosomal glomerulopathies. **Kidney Int.**, v. 4, p. 1-12, 1993.
17. BERGH, A H & SCHERER, P E. Adipose Tissue, Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circ Res**, 96:939-949, 2005.
18. BERVOETS, L.; VAN HOORENBEECK, K.; KORTLEVEN, I. et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut Pathogens**, v. 5:10, 2013.

19. BERTOLANI, C., MARRA, F. Role of adipocytokines in hepatic fibrosis. **Curr. Pharm. Des.** v. 16, 1929–1940, 1998.
20. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol.** 2003 Feb; 111(2 Suppl): S460–S475.
21. BOROS D.L. Immunopathology of Schistosoma Infection. **Clin. Microb. Ver.**, v. 2, p. 250, 1989.
22. BOSSHARDT, S.C.; FREEMAN, G.L.; SECOR, W.E.; COLLEY, D.G. IL-10 deficit correlates with chronic hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol**, v. 8, p. 347-53, 1997.
23. BOUCHARD, C. Physical activity and obesity. **Human Kinetics**, Champaign, 2000.
24. BOWIE, A.; O'NEILL, L.A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **J Leukoc Biol.**; 67(4):508-14, 2000.
25. BRASIL. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015. Brasília, 2012.
26. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Saúde Brasil 2013: Uma análise da situação de saúde e das doenças transmissíveis relacionadas à pobreza. Brasília, 2014.
27. BUETTNER, R.K.G.; PARHOFER, M.; WOENCKHAUS, C.E.; WREDE, L. A.; KUNZ-SCHUGHART, J.; SCHÖLMERICH, L.C.; BOLLHEIMER. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36(3): 485–501, 2006.

28. CANI, P.D.; DELZENNE, N.M. 2007. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Curr Opin Nutr Metab Care**, 10(6):729-34, 2007
29. CANI P.D., DELZENNE, N.M. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. **Current Pharmaceutical Design**, 15:1546-1558, 2009.
30. CANI, P.D.; POSSEMIERS, S.; VAN DE WIELE, T.; GUIOT, Y.; EVERARD, A.; ROTTIER, O. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58(8):1091-103, 2009.
31. CESARETTI, M. L. R.; KOLHMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006. COLLEY D.G. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 115, p. 150-56, 1975.
32. COLLEY D.G. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 115, p. 150-56, 1975.
33. COURA J.R.; AMARAL R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, p.13-19, 2004.
34. COUTINHO, E. M. et al. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, p. 919–925, 2003.
35. COUTINHO, E. M. *et al.* Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Tropica**, Basel, v. 101, n. 1, p. 15–24, 2007.

36. COUTINHO, J.G., GENTIL, P.C., TORAL, N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cad. Saúde Pública**, v. 2, p. 332-340, 2008.
37. CHEEVER A.W.; HOFFMANN K.F.; WYNN T.A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 465-6, 2000.
38. CHENSUE S.W.; WARMINGTON K.S.; HERSHEY S.D.; TEREBUH P.D.; OTHMAN M.; KUNKEL S.L. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cells in vivo. **J Immunol**, v. 151, n. 3, p. 1391-400, 1993.
39. DA SILVA AS, PAULI JR, ROPELLE ER, OLIVEIRA AG, CINTRA DE, DE SOUZA CT. Exercise intensity, inflammatory signaling and insulin resistance in obese rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42(12):2180-8, 2010.
40. DE JESUS A.R.; SILVA A.; SANTANA L.B.; MAGALHAES A.; DE JESUS A.A.; DE ALMEIDA R.P.; REGO M.A.; BURATTINI M.N.; PEARCE E.J.; CARVALHO E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis.**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.
41. DE LA SERRE CB, ELLIS CL, LEE J, HARTMAN AL, RUTLEDGE JC, RAYBOULD HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299(2):G440-8, 2010.
42. DIEMEN, V.V., TRINDADE, E.N., TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta. Cir. Brás.**, v. 21, n.6, p. 425-29, 2006.
43. DOMINGUES A. L. C.; BARRETO V. S. T. Esquistossomose hepática. In: Matos, A. A; Dantas, W. **Conferência de Hepatologia**, São Paulo: Fundo Editorial Byk, p. 391-405, 2001.

44. DOMINGUES A. L. C.; DOMINGUES L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed). **Esquistossomose mansônica**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, cap. 5, p. 91-105. , 1994.
45. DUAN, X.F. et al. Obesity, adipokines and hepatocellular carcinoma. **Int. J. Cancer** 133, 1776–1783, 2013.
46. DUARTE, A.C.G.O., FONSECA, D.F., MANZONI, M.S.J., SOAVE, C.F., SENE-FIORESE, M., DAMASO, A.R., CHEIK, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Ver. Nutr.**, v.19, n. 3, p. 341-348, 2006.
47. DURÃES, F.V. O papel dos receptores do tipo Toll (TLRs) na infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2010.
48. DUSTIN, M.L.; ROTHLEIN, R.; BHAN, A.K.; DINARELLO, C.A.; SPRINGER, T.A. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J Immunol.**, v.137, n.1, p.245-54, 1986.
49. ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica.**, v. 82, p. 139-146, 2002.
50. ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., DAMASO, A.R., RIBEIRO, E.B., DO NASCIMENTO, C.M.O. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Basic Nutri. Invest.**, 20: 218 –24. 2004.
51. EVERTS B, HUSSARTS L, DRIESSEN NN, et al. Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. **J Exp Med**, v. 209: 1753–1767, 2012.
52. FALLON, P.G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2000.

53. FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, 115(5):911-919, 2005.
54. FASOL, R., SCHINDLER, M., SCHUMACHER, B., SCHLAUDRAFF, K., HANNES, W., SEITELBERGER, R., SCHLOSSER, V. The influence of obesity on perioperative morbidity: retrospective study of 502 aortocoronary bypass operation. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 40, p. 126-129, 1992.
55. FERRARI, T.C.A.; MOREIRA, P.R.R.; CUNHA A.S. Spinal cord schistosomiasis: A prospective study of 63 cases emphasizing clinical and therapeutic aspects. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.11 (3), p. 246-253, 2004.
56. FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N. *Toll-Like Receptors: regulation of the immune responses* , **RGO - Rev Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v.59, n.3, p.483-490, jul./set., 2011
57. FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n. 1, p. 67-74, 2007.
58. FESTI D, COLECCHIA A, SACCO T, BONDI M, RODA E, MARCHESINI G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev** 5: 27-42. 2004.
59. FINKELMAN, F. D.; PEARCE, E. J., URBAN, J.J., SHER, A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. **Parasitology Today**, v. 7, n. 3, p. 62-66, March, 1991.
60. FISBERG, M. Primeiras palavras: uma introdução ao problema do excesso de peso. In: **Atualização em Obesidade na Infância e na Adolescência**. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 1-9, 2004.

61. FIORENTINO, D.F.; BOND, M.A.; MOSSMAN, T.R. Two types of t helper cell. iv. Th2 clones secrete a factor that inhibit cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170, p. 2081, 1989.
62. FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O’GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, n.11, p. 3815-3822, 1991.
63. FLANAGAN AM, BROWN JL, SANTIAGO CA, AAD PY, SPICER LJ, SPICER MT. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. **J Nutr Biochem**, 19(8):505-13, 2008.
64. FLEISSNER CK, HUEBEL N, EL-BARY MMA, LOH G, KLAUS S, BLAUT M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. **Br J Nutr**, v. 104(6): 919–929, 2010.
65. FLORES-VILLANUEVA P.O. *et al.* Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 151, p. 3192-8, 1993.
66. FONSECA-ALANIZ MH, TAKADA J, ALONSO-VALE MIC, LIMA FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab**; 50(2):216-229, 2006.
67. GARRUTI, G; COTECCHIA, S; GIAMPETRUZZI, F; GIORGINO, F; GIORGINO, R. Neuroendocrine deregulation of food intake, adipose tissue and the gastrointestinal system in obesity and metabolic syndrome. **J Gastrointestin Liver Dis**, 17(2):193-198, 2008.
68. GAZZINELLI, G. *et al.* Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, p. 2891-2895, 1983.

69. GOODMAN AL, KALLSTROM G, FAITH JJ, REYES A, MOORE A, DANTAS G. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108(15):6252-7, 2011.
70. GOTTSCHLICH, M.M., MAYES, T., KHOURY, J.C., WARDEN, G.D. Significance of obesity on nutritional, immunologic, hormonal and clinical outcome parameters in burns. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 93, p. 1261-1268, 1993.
71. GRZYCH, J.M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HEINY, S. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, p.1322-7, 1991.
72. GYORKOS, T.W.; GILBERT, N.L.; LAROCQUE, R.; CASAPÍA, M. Trichuris and hookworm infections associated with anaemia during pregnancy. **Tropical Medicine & International Health**, v.16(4): 531–537, 2011.
73. HALADE GV, JIN YF, LINDSEY ML. Roles of saturated vs. polyunsaturated fat in heart failure survival: not all fats are created equal. **Cardiovasc Res**, v. 3(1):4-5, 2012.
74. HERNANDEZ, H. J.; SHARPE, A. H.; STADECKER, M. J. Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 2884-2889, Baltimore,1999.
75. HOTEZ, P.J. The neglected tropical diseases and the neglected infections of poverty: overview of their common features, global disease burden and distribution, new control tools, and prospects for disease elimination. In: **Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases: Opportunities for Integrated Intervention Strategies**. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62521/>

76. HORNING, V. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CgG oligodeoxynucleotides. **J. Immunol**, V. 168, n.9, p.4531-7, 2002.
77. HUFELDT MR, NIELSEN DS, VOGENSEN FK, MIDTVEDT T, HANSEN AK. Variation in the gut microbiota of laboratory mice is related to both genetic and environmental factors. **Com Med.**, v. 60(5):336-42, 2010.
78. HULSTIJN M, BARROS LA, NEVES RH, MOURA EG, MACHADO-SILVA JR. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. **Parasitology** 126: 53-61, 2003.
79. HUSSAARTS L, GARCÍA-TARDÓN N, BEEK LV, MATTIJS M. HEEMSKERK, SIMONE HAEBERLEIN, VAN DER ZON GC, OZIR-FAZALALIKHAN A, BERBÉE JFP, DIJK KWV, HARMELEN VV. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. **FASEB J**, v. 29(7): 3027–3039, 2015.
80. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. POF 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. 2009. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 20 Out. 2012.
81. IKEOKA D, MADER JK, PIEBER TR. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56(1):116-21, 2010.
82. IMANISHI, N.; ANDOH, T.; SAKAI, S.; SATOH, M.; KATADA, Y.; UEDA, K.; TERASAWA, K.; OCHIAI, H.; Induction of inducible nitric oxide (NO) synthase mRNA and NO production in macrophages infected with influenza A/PR/8 vírus and stimulated with Its ether-split product. **Microbiol. Immunol.**, v.49, n.1, p: 41-48, 2005.

83. JACOBS, W.; VAN DE VIJVERK., DEELDER, A., VAN MARCK, E. Morphometrical and immunopathological dissection of the hepatic schistosoma haematobium granuloma in the murine host. **Parasite**. v. 5(4), p. 299-306, Dec., 1998.
84. 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.
85. JAMES, S.L. & SHER, A. Cell mediated immune response to schistosomiasis. **Curr Topics Immunobiol.** v 143, p. 4208, 1990.
86. JUGE-AUBRY CE, MEIER CA. Immunomodulatory actions of leptin. **Mol Cell Endocrinol**; 194(1-2):1-7, 2002
87. JUNQUEIRA LCU, BIGNOLOS G, BRENTANI RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. **Histochem J**, v. 11: 447-455, 1979.
88. KANZLER H, BARRAT FJ, HESSEL EM, COFFMAN RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. **Nat Med.**;13(5):552-9, 2007.
89. KARLSSON CLJ, ONNERFALT J, XU J, MOLIN G, AHRNE S, THORNGREN-JERNECK K. The Microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. **Obesity**. v. 20:2257-61, 2012.
90. KATZ N.; ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.
91. KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRING, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do instituto de medicina tropical de sao paulo**; v.14, p. 397-402, 1972.

92. KAWAI T, AKIRA S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. **Curr Opin Immunol.** 17(4):338-44. 2005.
93. KHOVIDHUNKIT, W.; KIM, M.S.; MEMOM, R.A.; SHIGEBAGA, J.K.; MOSER, A.H.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **J Lipid Res**, 45(7): 1169-96. 2004
94. KOS F.J.; ENGLEMAN E.G. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. **Immunol Today.**, v. 17, n. 4, p. 174-6, 1996.
95. KUMAR H, KAWAI T, AKIRA S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun**, 388(4):621-5, 2009.
96. LA CAVA A, MATARESE G. The weight of leptin in immunity. **Nat Rev Immunol**, 4(5):371-379, 2004.
97. LACERDA DS, BOCK PM, FUNCHAL C. Consumo exacerbado de lipídeos provoca dano celular em algumas doenças metabólicas e cardiovasculares. **Nutrire.** Aug, v. 40(2):200-213, 2015.
98. LAMBERTUCCI J. R. *et al.* Schistosoma mansoni: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 101-109, 2000.
99. LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. **Esquistossomose mansônica.** In: **Coura J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, cap 76, p. 931-946, 2005.
100. LAYLAND LE, RAD R, WAGNER H, DA COSTA CU. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. **Eur J Immunol.**; 37(8):2174-84, 2007.
101. LEY RE, BÄCKHED F, TURNBAUGH P, LOZUPONE CA, KNIGHT RD, GORDON JI. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National**

- Academy of Sciences of the United States of America.** v. 102(31):11070-11075, 2005.
102. LI Z, SOLOSKI MJ, DIEHL AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology** 42: 880-885, 2005.
103. LIMA, K.M. **Associação entre esquistossomose mansônica e infecções microbianas: estudo da translocação microbiana em camundongos machos e fêmeas na fase crônica, submetidos ou não a esplenectomia.** [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2011.
104. LIMA VLM, SENA VLM, STEWART B, OWEN JS, DOLPHIN PJ. An evaluation of the marmoset *Callithrix jacchus* (sagüi) as an experimental model for the dyslipoproteinemia of human *Schistosomiasis mansoni*. **Biochemistry et Biophysic Acta**, v. 1393, n. 235-243, 1998.
105. LIMA M.S.; GAZZINELLI G.; NASCIMENTO E.; PARRA J.C.; MONTESANO M.A.; COLLEY D.G. Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. Evidence for antiidiotypic T lymphocyte responsiveness. **J Clin Invest**, v. 78, n. 4, p. 983-8, 1986.
106. LISSNER, L; KARLSSON, C; LINDROOS, A K; SJOSTROM, L; CARLSSON, B; CARLSSON, L & BENGTSSON, C. Birth weight, adulthood BMI, and subsequent weight gain in relation to leptin levels in Swedish women. **Obesity Res**, 7:150-154, 1999.
107. MAFRA D, FARAGE NE. O papel do tecido adiposo na doença renal crônica. **J Bras Nefrol**, 28(2):108-113, 2006.
108. MALAFAIA AB, PAULO AFONSO NUNES NASSIF, CARMEN AUSTRALIA PAREDES MARCONDES RIBAS, BRUNO LUIZ ARIEDE, KAREN NEGUME SUE, MANUELA AGUIAR CRUZ. Obesity induction with high fat sucrose in rats. **Arq Bras Cir Dig**. v. 26 (Suppl 1): 17, 212013.

109. MALAQUIAS, L.C.; FALCÃO, P.L.; SILVEIRA, A.M.; GAZZINELLI, G.; PRATA, A.; COFFMAN, R.L. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand J Immunol**, v. 46, p. 393-8, 1997.
110. MANI V, HOLLIS JH, GABLER NK. Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia. **Nutr Metab**, v. 10(1):6, 2013.
111. MARRA, F. et al. Modulation of liver fibrosis by adipokines. **Dig. Dis.** v. 29, p. 371–376, 2011.
112. MATHEW R.C.; BOROS D.L. Anti-L3T4 antibody formation and abrogates antigen-induced interleukin-infection. **Infect Immun**, v. 54, n. 3, p. 820-6, 1986.
113. MELO A. L.; COELHO P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: Neves D.P., **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, p. 193-212, 2005.
114. MOHR M, KLEMP M, RATHKOLB B, DE ANGELIS MH, WOLF E, AIGNER B. Hypercholesterolemia in ENU-induced mouse mutants. **J Lipid Res** 45: 2132-2137, 2004.
115. MONTENEGRO S.M.; MIRANDA P.; MAHANTY, S.; ABATH F.G.; TEIXEIRA K.M.; COUTINHO E.M.; BRINKMAN J.; GONCALVES I.; DOMINGUES L.A.; DOMINGUES A.L.; SHER A.; WYNN T.A. Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferongamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v.179, n. 6, p. 1502-14, 1999.
116. MOORE K.W.; VIEIRA P.; FIORENTINO D.F.; TROUNSTINE M.L.; KHAN T.A.; MOSMANN, T.R. Homology Of Cytokine Synthesis Inhibitory Factor

- (Il-10) To Epstein-Barr Virus Gene Bcrf1. **Science**, v.248, p.1230-1234, Washington,1990.
117. MOULTON, M.J., CRESWELL, L.L., MACKEY, M.E., COX, J.L., ROSENBLOOM, M.R. Obesity is not a risk factor for significant adverse outcomes after cardiac surgery. **Circulation**, v. 94, p. 87-92, 1994.
118. MORAES ACF, SILVA IT, ALMEIDA-PITITTO B, FERREIRA SRG. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 317-327, June, 2014.
119. MORVEN R.; BUTTERWORTH A.E.; KIMANI G.; KAMAU T.; FULFORD A.J.C.; DUNNE D.W.; OUMA J.H.; STURROCK A.F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. **Inf Immunol**. v. 61, p. 4984-93, 1993.
120. MS - BRASIL. Ministério da saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Guia de bolso**. 8ª edição revisada. Brasília – DF, 2010.
121. MUÑOZ, M., MAZURE, R.A., CULEBRAS, J.M. Obesidad y sistema inmune. **Nutr. Hosp.**, v. 19, n. 6, p. 319-324, 2004.
122. MURRAY, PR. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
123. MUZIO, M. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic Cells. **J. immunol**, V.164, n.11, Jun 1, p.5998-6004, 2000.
124. MWATHA J.K.; KIMANI G.; KAMAU T.; MBUGUA G.G.; OUMA J.H.; MUMO J.; FULFORD A.J.; JONES BUTTERWORTH A.E.; ROBERTS M.B.; DUNNE D.W. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 160, n. 4, 1992-9, 1998.

125. NASCIMENTO CMO, RIBEIRO EB, OYAMA LM. Metabolism and secretory function of white adipose tissue: effect of dietary fat. **An Acad Bras Cienc**, v. 81(3):453-66, 2009.
126. NAMMI, S., KOKA, S., CHINNALA, K.M., BOINI KM. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. **Nutr J**, v. 3, p. 3, 2004.
127. NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, p. 193-212, 2005.
128. NEVES, R.H.; ALENCAR, A.C.M.B.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; MACHADO-SILVA, J.R.; GOMES, D.C. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, V. 101 (Suppl. I): 253-260, 2006.
129. NEVES, R.H.; ALENCAR, A.C.M.B.; COSTA-SILVA, M.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; MACHADO-SILVA, J.R.; GOMES, D.C. Long-term feeding a high-fat diet causes histologicak and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. **Experimental Parasitology**, 115, 324-332, 2007.
130. NEVES RH, ALENCAR ACMB, AGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA, MACHADO-SILVA JR, GOMES DC. Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. **J Helminthoz**, v. 81: 361-368, 2007.
131. NEVES RH, MACHADO-SILVA JR, PELAJO-MACHADO M, OLIVEIRA SA, COUTINHO EM, LENZI HL, GOMES DC. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 1013-1016. 2001.
132. NEVES RH, OLIVEIRA SA, MACHADO-SILVA JR, COUTINHO E, GOMES DC. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms

- recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. **Rev Soc Bras Med Trop** 35: 405-407. 2002.
133. NIEMAN, D.C., HENSON, D.A., NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L., EKKENS, M., UTTER, A.C., BUTTERWORTH, D.E., FAGOAGA, O.R. Influence of obesity on immune function. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 99, p. 294–299, 1999.
134. OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 93, p. 30-35, 2004.
135. OLIVIER, L.; STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v.38, p.19-23, 1952.
136. OTERO M, LAGO R, LAGO F, CASANUEVA FF, DIEGUEZ C, GÓMEZ-REINO JJ. Leptin from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett**, 579(2): 295-301, 2005.
137. OUWENS DM, DIAMANT M, FODOR M. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD-36-mediated fatty acid uptake and esterification. **Diabetologia**, v. 50(9):1938-48, 2007.
138. PACHECO & LENZI. Systemic Modulation Of peripheral Eosinophilia (Air Pouch Model) In *Schistosoma mansoni* Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Suppl 2, p. 165-72, 1997.
139. PARRA, J.C.; GAZZINELLI, G.; GOES, A.M.; MOYES, R.B.; ROCHA, R.; COLLEY, D.G.; DOUGHTY, B.L. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. II. In vitro granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies. **J Immunol**, v. 147, n. 11, p. 3949-54, 1991.

140. PATTON, E. A. *et al.* Severe schistosomiasis in the absence of interleukin-4 (IL-4) Is IL-12 independent. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 1, p. 589-592, jan. 2001.
141. 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.
142. PEARCE EJ, CASPAR P, GRZYCH JM, LEWIS FA, SHER A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.173, p.159-166, 1991.
143. PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 499-511, 2002.
144. PEDRA, J.H.F .; CASSEL, S.L.; SUTTERWALA, F.S. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. **Current Opinion in Immunology**. 21:10–16, 2009.
145. PENDERS J, THUIS C, VINK C, STELMA FF, SNIJDERS B, KUMMELING I, ET AL. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, v. 118(2):511-21, 2006.
146. PESSOA, S; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**, 11 ed, Rio de Janeiro, cap. 35, p. 361-406, 1988.
147. POGGENSEE ,G.; FELDMEIERS, H. Female genital schistosomiasis: facts and hypotheses. **Acta Trop.** v.79(3), p.193, 2001.
148. POWELL EE, JONSSON JR, CLOUSTON AD. Steatosis: co-factor in other liver diseases. **Hepatology** 42: 5-13. 2005.

149. PRADO WLUIZ, LOFRANO MC, OYAMA LM, DAMASO AR. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Rev Bras Med Esporte** [online], vol.15, n.5, pp.378-383, 2009.
150. PROCACCINI, C. et al. Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD. **Curr. Pharm. Des.** v. 16, 1902–1912, 2010.
151. RAMALHO, R. & GUIMARÃES, C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crônica associada à obesidade: Implicações Clínicas. **Acta Med. Port.** 21(5): 489-496, 2008.
152. RAMOS TMB, VASCONCELOS AS, CARVALHO VCO, LIMA VLM. Alterações nos níveis de colesterol, triglicerídeo e fosfolípídeo total em plasma de *Callithrix jacchus* (sagüi) reinfestado por *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], vol.37, n.1, pp.37-40, 2004.
153. RASO P.; NEVES J. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansônica através de punções-biópsias. **Anais da Faculdade de Medicina da UFMG**, v. 22, p. 147-65, 1965.
154. REY, L. **Parasitologia**. Cap. *Schistosoma Mansoni e Esquistossomose: A Doença*, p. 351, 2001.
155. RITTER D.M.; MCKERROW J.H. Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. **Infect Immun.** v. 64, n.11, p.4706-13, 1996.
156. RIBEIRO DE JESUS, A *et al.* Human immune responses to *Schistosoma mansoni*: vaccine candidate antigens. **Infection and Immunity**, Washington, n. 68, p. 2757-2803, may, 2000.
157. ROSINI TC, SILVA ASRAMOS, MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev. Assoc. Med. Bras.** [online], vol.58, n.3, pp.383-387, 2012.

158. SAULE P, VICOONE J, DELACRE M, MACIA L, TAILLEUX A, DISSOUS C, AURIAULT C, WOLOWCZUK I. Host glucose metabolism mediates T4 and IL-7 action on *Schistosoma mansoni* development. **J Parasitol** 91: 737-744. 2005.
159. SHER A.; COFFMAN R.L.; HIENY S.; SCOTT P.; CHEEVER A.W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v. 87, n. 1, p. 61-5, 1990.
160. SILVA, A.M.; CORREA, C.L.; NEVES, R.H.; MACHADO-SILVA, J.R. A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice. **Experimental parasitology**, v. 132, p. 193-199, 2012.
161. SILVA A, SANTANA LB, DE JESUS AR. A RESPOSTA IMUNE NA FORMA AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI. In CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H.L. (Org.). *Schistosoma mansoni* e **Esquistossomose. Uma visão multidisciplinar**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 549-568, 2008.
162. SILVA CA, OLIVEIRA KF, CARVALHO VCO, DOMINGUES ALC, BRANDT CT, LIMA VLM. Efeito de tratamento cirúrgico sobre a atividade da enzima hepática lecitina: colesterol aciltransferase (LCAT) na esquistossomose mansônica. **Acta Cirúrgica Brasileira** 17: 28-30, 2001.
163. SILVA, L.M.; FERNANDES, A.L.; BARBOSA JR., A.; OLIVEIRA, I.R.; ANDRADE, Z.A. Significance of schistosomal granuloma modulation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, 353–361. 2000.
164. SILVEIRA A.M.; GAZZINELLI G.; ALVES-OLIVEIRA L.F.; BETHONY J.; GAZZINELLI A.; CARVALHO-QUEIROZ ALVAREZ M.C.; LIMA-SILVA F.C.; PRATA A.; LOVERDE P.T.; CORREA-OLIVEIRA R. Schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult antigen stimulated cultures. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 9, p. 514-9, 2004.

165. SILVEIRA, R.M.; FROLLINI, A.B.; VERLENGIA, R.; CAVAGLIERI, C.R. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, 11(4):466-472, 2009.
166. SIMÕES C, NEVES RH, BARROS LA, BRITO PD, CRAVO CO, DE MOURA EG, MACHADO-SILVA JR. Parasitological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in swiss mice with underlying malnutrition. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97 (Suppl. I): 143-147. 2002.
167. SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2009. Disponível em: WWW.datasus.gov.br. Acesso em: 10 mai. 2009.
168. SMYTHIES , L.E.; COULSON, P.S.; WILSON R. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflamatory responses and abrogates immunity to schistosoma mansoni vaccinated with attenuated cercariae. **Ann. Trop. Parasitol.** v. 653, 1992.
169. SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A.P.; JUNIOR, F.F.C.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clin. Med.** v. 9(4), p. 300-7, 2011.
170. SPRONG H, SCHANEK M, VAN DIJK SM. Aberrant receptor-mediated endocytosis of *S. mansoni* glycoproteins on host lipoproteins. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 1360-1370, 2006.
171. STADECKER M.J.; FLORES-VILLANUEVA P.O. The role of T cell anergy in the immunomodulation in schistosomiasis. **Parasitol Today**, v. 15, p. 571-4, 1992.
172. STALLONE, D.D. The influence of obesity and its treatment on the immune system. **Nutr Rev**, v. 52, p. 37-50, 1994.

173. STOCKINGER, B., BOURGEOIS, C. AND KASSIOTIS, G. CD4⁺ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. **Immunological Reviews**, v. 211, p. 39–48, 2006.
174. SVS/MS – Secretaria de vigilância em saúde/MS. **Guia de vigilância epidemiológica**. Caderno 10. 2008.
175. TAKEUCHI O, AKIRA S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. **Curr Top Microbiol Immunol.**; 270:155-67, 2002.
176. TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity associated gut microbiome with increase capacity for energy harvest. **Nature**, v. 21;444(7122):1027-31, 2006.
177. VAN DE VIJVER, K.K.; HOKKE, C.H.; VAN REMOORTERE, A.; JACOBS, W.; DEELDER, A.M.; VAN MARCK, E.A. Glycans of *Schistosoma mansoni* and keyhole limpet haemocyanin induce hepatic granulomas in vivo. **International Journal for Parasitology**, v. 34, 951–961. 2004.
178. WEINSTOCK, J.V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the schistosome ova and the host. **Immunol Invest**, v. 21, n. 5, p. 455-75, 1992.
179. WEINSTOCK J.V.; BLUM A.M.; Modulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosome ova: in vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cell Immuno**, v. 108, n. 2, p. 452-9, 1987.
180. WETZLER, L.M. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. **Vaccine** 21. S2/55–S2/60, 2003.
181. White PAS, Cercato LM, Araujo JMD et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab** [online]. 2013, vol.57, n.5, pp.339-345.

182. WHO – World Health Organization. Obesity and overweight. **Fact sheet**, n 311, 2012. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/. Acesso em 20 Out. 2012.
183. WILLIAMS M.E.; MONTENEGRO S.; DOMINGUES A.L.; WYNN T.A.; TEIXEIRA K.; MAHANTY S.; COUTINHO A.; SHER A. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, p.946-954, 1994.
184. WILSON, M. S. *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 85, p. 148–154, 2006.
185. WOMACK, J., TIEN, P.C., FELDMAN, J., SHIN, J.H., FENNIE, K., ANASTOS, K., COHEN, M.H., BACON, M.C., MINKOFF, H. Obesity and immune cell counts in women. **Metab. Clin. and Expe.**, v. 56, p. 998–1004, 2007.
186. WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 7, p. 505-511, 1995.
187. VALASSI, E; SCACCHI, M; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, 18:158-168, 2008.
188. VAN DEN BIGGELAAR A.H.; BORRMANN S.; KREMSNER P.; YAZDANBAKHSI M. Immune responses induced by repeated treatment do not result in protective immunity to *Schistosoma haematobium*: interleukin (IL)-5 and IL-10 responses. **J Infect Dis**, v. 186, n. 10, p. 1474-82, 2002.
189. YAMASHITA T.; BOROS D.L. IL-4 Influences IL-2 Production And Granulomatous Inflammation In Murine Schistosomiasis *Mansoni*. **J. Immunol.**, v. 149, n. 11, p. 3659, 1992.

190. ZHANG C, ZHANG M, WANG S, HAN R, CAO Y, HUA W, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. **ISME J**, v. 4(2):232-41, 2010.
191. 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.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA



Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni* associada à obesidade: Resposta Imune e patologia hepática em camundongos BALB/c**, protocolado sob nº 65/2014 pelo (a) pesquisador (a) Fábio André Brayner dos Santos.

Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 30/03/2015. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até março de 2017.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongos Mus músculos Balb/c	60

We certify that project entitled **Infecção crônica pelo *Schistosoma mansoni* associada à obesidade: Resposta Imune e patologia hepática em camundongos BALB/c**. Protocol nº 65/2014, coordinated by Fábio André Brayner dos Santos. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research, of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on March, 30, 2015. In present version this project is licensed and valid until March 2017.

Recife (PE, Brazil) April, 07, 2015.

Sheilla Andrade de Oliveira

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

ANEXO B – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

Revista de Nutrição

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to
Revista de Nutrição

Manuscript ID
RN-17-0269

Title
Dieta hiperlipídica e esquistossomose mansônica: efeitos na microbiota intestinal de camundongos

Authors
OLIVEIRA, DANIELLY
Lira, Danielle
Aires, André
Albuquerque, Mônica
Santos, Fábio
Castro, Célia Maria

Date Submitted
26-Sep-2017

Author Dashboard

ANEXO C – CARTA DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

 British Journal of Nutrition

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
British Journal of Nutrition

Manuscript ID
BJN-RA-17-0974

Title
EFFECTS OF HIGH-FAT DIET IN EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES (IL-6, TNF- α , IFN- γ) IN MICE INFECTED WITH *Schistosoma mansoni*

Authors
OLIVEIRA, DANIELLY
Aires, André
Iglesias, Débora
Lorena, Virginia
Albuquerque, Monica
Santos, Fabio
De Castro, Célia

Date Submitted
26-Sep-2017
