

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

DÉBORA VASCONCELOS BASTOS MARQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NO
DESENVOLVIMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

ALFENAS/MG

2019

DÉBORA VASCONCELOS BASTOS MARQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NO
DESENVOLVIMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Biociências
aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.
Orientador: Alessandro Antônio Costa Pereira
Co-Orientadores: Raquel Lopes Martins Souza
Rômulo Dias Novaes

ALFENAS/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Marques, Débora Vasconcelos Bastos.

M357a Avaliação do efeito da dieta hiperproteica no desenvolvimento da
esquistossomose experimental / Débora Vasconcelos Bastos Marques --
Alfenas/MG, 2019.
128 f. : il. --

Orientador: Alessandro Antônio Costa Pereira.
Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade
Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Esquistossomose. 2. Granuloma. 3. Dieta Rica em Proteínas. I.
Pereira, Alessandro Antônio Costa. II. Título.

CDD-616.963

DÉBORA VASCONCELOS BASTOS MARQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NO
DESENVOLVIMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada,
aprova a Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biociências aplicadas à Saúde
pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Fisiopatologia.

04/09/2019

Aprovada em:



Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Marcos José Marques

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

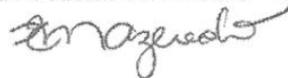
Assinatura:



Profa. Dra. Eveline Monteiro Cordeiro de Azeredo

Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG

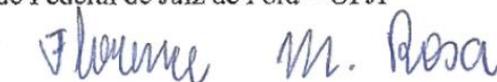
Assinatura:



Profa. Dra. Florence Mara Rosa

Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

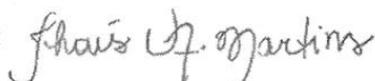
Assinatura:



Profa. Dra. Thaís Viana Fialho Martins

Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS

Assinatura:



*Dedico este trabalho ao meu amado esposo Paulo,
à minha querida irmã Daniele e
aos meus admiráveis pais Antônio e Lércia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo na minha vida. Por toda a força, luz e determinação na escolha da direção correta. Agradeço a Ele todas as vitórias e conquistas alcançadas.

À Mãe Rainha, que sempre esteve ao meu lado, intercedendo por mim junto à Deus.

Agradeço aos meus pais, Antônio e Lércia (os grandes doutores da minha vida), pelos quais tenho tamanha admiração e amor, por toda compreensão, apoio, incentivo, felicidade, carinho, dedicação e inspiração por cada luta e por cada vitória. Agradeço à minha irmã Daniele por estar ao meu lado me incentivando e oferecendo apoio sempre. Amo vocês!

Agradeço especialmente ao meu esposo Paulo Gabriel Marques, pelo amor, amizade, apoio e compreensão. Obrigada por me apoiar em todas as minhas escolhas, por vibrar comigo a cada conquista e, principalmente, por me manter de pé nos momentos mais difíceis. Meu eterno agradecimento por compreender todos os momentos e todas as dificuldades. Seu valioso apoio, sempre ao meu lado, foi primordial para a realização deste trabalho. Amo você!

Ao meu orientador, Alessandro Antônio Costa Pereira, por ter aceitado me orientar e pela confiança em mim depositada.

À co-orientadora Raquel Lopes Martins Souza, agradeço pela atenção, contribuições e disponibilidade em ajudar.

Ao co-orientador Rômulo Dias Novaes, pelo qual tenho muita estima e admiração. Muito obrigada pelas idéias, pelas inúmeras conversas esclarecedoras e debates em torno do trabalho. Agradeço imensamente sua contribuição e auxílio no desenvolvimento dessa tese.

Aos professores Marcos José Marques, Eveline Monteiro Cordeiro de Azeredo e Lívia de Figueiredo Diniz Castro por comporem a banca do exame de qualificação, contribuindo para enriquecer este trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora por terem aceitado participar da defesa de tese e pelas contribuições.

Aos funcionários e professores do Departamento de Patologia e Parasitologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), em especial os técnicos Matheus e Maria Ângela, pelo agradável convívio e por todo auxílio.

Aos funcionários e professores da Faculdade de Nutrição da UNIFAL, por todo coleguismo e carinho. Agradeço em especial à professora Hudsara Aparecida de Almeida Paula pela disponibilidade em ceder o Laboratório de Nutrição Experimental para realização do meu experimento e por sua colaboração desde o início. À professora Olga Luiza Tavano, pela realização das análises bromatológicas e pelas valiosas contribuições na execução deste trabalho. Agradeço ao ex-técnico Lellis, pela amizade e disponibilidade em ajudar no experimento.

Às alunas de Iniciação Científica, Juliana de Cássia Carvalho Souza Alexandre e Camila Cabral Campos, que não mediram esforços para colaborar neste trabalho.

Aos meus queridos amigos que estiveram ao meu lado, pelo carinho, incentivo, suporte, consolo, conselhos, tornando a caminhada mais leve e divertida.

Ao Programa de Pós Graduação em Biociências aplicadas à Saúde, pela oportunidade de desempenhar este trabalho. Agradeço à secretária Adriana pelos esclarecimentos e pelo trabalho desempenhado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

*“ Se eu não sei o caminho, Tu bem o conheces.
Isso torna a minha alma tranquila e cheia de paz.
Por isso vã é minha preocupação e o pulsar
angustiado do meu coração. ”*

(AUTOR DESCONHECIDO)

RESUMO

A esquistossomose mansoni é uma doença tropical negligenciada, causada pelo parasito trematódeo *Schistosoma mansoni*. A patogenia da esquistossomose mansoni resulta dos ovos do parasito que ficam depositados nos tecidos do hospedeiro, particularmente no fígado e intestinos. A estimulação antigênica contínua desses ovos leva ao recrutamento de células inflamatórias para os locais de infecção com formação de granulomas periovulares, que são estruturas complexas com tamanho e composição variáveis e são a característica histopatológica mais marcante da esquistossomose mansoni. Modelos induzidos por dieta têm se mostrado benéficos para avaliar as mudanças fisiológicas que ocorrem durante a patogênese e a maioria dos estudos experimentais sobre esquistossomose demonstrou que a relação parasita-hospedeiro pode ser modificada pelo estado nutricional do hospedeiro. Entretanto, o efeito combinado da dieta hiperproteica e a esquistossomose sobre a fisiopatologia e a progressão da doença ainda é pouco conhecido. Este tipo de dieta associada à esquistossomose pode elucidar se existe interação entre a infecção, qual ou quais fases da infecção e a dieta e o quanto essa interação pode modificar a patogênese nas infecções por *S. mansoni*. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da dieta hiperproteica no desenvolvimento da esquistossomose experimental. Assim, o trabalho foi dividido em três capítulos, nos quais revisamos sistematicamente a evidência pré-clínica sobre o impacto da dieta na infecção por *S. mansoni* e avaliamos o efeito da dieta rica em proteínas nas fases aguda e crônica da doença. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com três a quatro semanas de idade, alimentados com dieta padrão (22%) e hiperproteica (38% proteína). O experimento foi conduzido com 8 grupos com 10 camundongos em cada um, divididos de acordo com a infecção (infectado ou sadio), o tipo de dieta (hiperproteica ou padrão) e a fase da infecção (aguda ou crônica). Foram avaliados o perfil de crescimento corporal dos camundongos, a absorção de nitrogênio da dieta (digestibilidade aparente), peso relativo do fígado e da gordura periepididimal. Avaliou-se número de ovos nas fezes, no fígado e no intestino, fez-se análises histopatológicas e estereológicas dos granulomas e da área remota do tecido hepático, bem como morfometria do intestino. Nossos resultados demonstraram que em ambas as fases da infecção, a dieta hiperproteica não influenciou no crescimento corporal dos camundongos. Além disso, o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína da dieta hiperproteica foi alta. Nas fases aguda e crônica, o número de ovos nas fezes, no fígado e no intestino dos animais com dieta hiperproteica não diferiu estatisticamente em relação à dieta padrão. Na avaliação das lesões hepáticas, os animais com dieta hiperproteica apresentaram maior peso do fígado, menor densidade de número de hepatócitos e maior número de granulomas hepáticos na fase aguda; na fase crônica, os animais com dieta hiperproteica também apresentaram maior peso do fígado menor peso da gordura periepididimal, menor densidade de volume e número de hepatócitos e não houve influência no número e volume dos granulomas. Na fase aguda, os animais com dieta hiperproteica tiveram camadas musculares diminuídas e maior espessura da mucosa intestinal, comprimento e largura das criptas, bem como maior área dos gânglios mioentéricos. Na fase crônica, animais com dieta hiperproteica tiveram camadas muscular da mucosa e mucosa intestinal aumentadas, bem como comprimento das criptas. Assim, os nossos achados evidenciaram que a dieta hiperproteica pode ter amplificado a inflamação granulomatosa, favorecendo o desenvolvimento de lesões teciduais mais graves, especialmente no fígado, cuja sobrecarga hepática morfofuncional é a característica patológica mais grave da esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose. Granuloma. Dieta Rica em Proteínas.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a neglected tropical disease caused by the trematode parasite *Schistosoma mansoni*. The pathogenesis of schistosomiasis mansoni results from parasite eggs that are deposited in host tissues, particularly in the liver and intestines. Continuous antigenic stimulation of these eggs leads to the recruitment of inflammatory cells to sites of infection with formation of periovular granulomas, which are complex structures with different sizes and composition and are the most striking histopathological feature of schistosomiasis mansoni. Diet-induced models have been shown to be beneficial in assessing the physiological changes that occur during pathogenesis, and most experimental studies on schistosomiasis have shown that the parasite-host relationship can be modified by the nutritional status of the host. However, the combined effect of hyperproteic diet and schistosomiasis on pathophysiology and disease progression is still poorly understood. This type of diet associated with schistosomiasis can elucidate if there is interaction between the infection, which or which stages of the infection and the diet, and how much this interaction can modify the pathogenesis of *S. mansoni* infections. This study aimed to evaluate the effect of high-protein diet on the development of experimental schistosomiasis. Thus, the paper was divided into three chapters, in which we systematically reviewed preclinical evidence on the impact of diet on *S. mansoni* infection and evaluated the effect of high protein diet on the acute and chronic phases of the disease. Male Swiss mice, three to four weeks old, fed standard diet (22%) and hyperproteic (38% protein) were used. The experiment was conducted with 8 groups with 10 mice in each, divided according to the infection (infected or healthy), the type of diet (hyperproteic or standard) and the phase of the infection (acute or chronic). The body growth profile of mice, dietary nitrogen uptake (apparent digestibility), relative liver weight and periepididimal fat were evaluated. Number of eggs in feces, liver and intestine were evaluated, histopathological and stereological analyzes of granulomas and remote area of liver tissue were performed, as well as intestinal morphometry. Our results demonstrated that in both phases of the infection, the high-protein diet did not influence the mice body growth. In addition, the apparent protein digestibility coefficient of the hyperproteic diet was high. In the acute and chronic phases, the number of eggs in the feces, liver and intestine of animals with a high protein diet did not differ statistically from the standard diet. In the evaluation of liver lesions, the animals with high-protein diet had higher liver weight, lower density of hepatocytes and higher number of hepatic granulomas in the acute phase; In the chronic phase, animals with hyperproteic diet also presented higher liver weight, lower periepididimal fat weight, lower volume density and number of hepatocytes and no influence on the number and volume of granulomas. In the acute phase, the animals with hyperproteic diet had diminished muscular layers and larger intestinal mucosa thickness, crypt length and width, as well as larger area of the myenteric ganglia. In the chronic phase, animals with hyperproteic diet had increased muscular layers of the mucosa and intestinal mucosa, as well as the length of the crypts. Thus, our findings showed that the high-protein diet may have amplified granulomatous inflammation, favoring the development of more severe tissue lesions, especially in the liver, whose morphofunctional liver overload is the most severe pathological feature of schistosomiasis.

Key words: Schistosomiasis. Granuloma. Diet, High-Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Delineamento experimental.....	45
Figura 2–	Fluxograma da randomização dos grupos experimentais e suas características.....	46
Figura 3 –	Peso e volume relativo do fígado (A e B) de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sadios e infectados com 8 semanas de infecção por <i>S. mansoni</i>	58
Figura 4 –	Peso relativo da gordura periepididimal de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sadios e infectados com 8 semanas de infecção por <i>S. mansoni</i>	58
Figura 5 –	Número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) e no intestino (C) de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da doença.....	59
Figura 6 –	Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos alimentados com dieta hiperproteica e padrão, sadios e infectados com <i>S. mansoni</i> na fase representativa de infecção aguda (8 semanas de infecção).....	60
Figura 7 –	Densidade de volume (Vv) de hepatócitos (A) e tecido conjuntivo (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas de infecção.....	61
Figura 8 –	Densidade de número de hepatócitos (QA _h) (A) e células intersticiais (QA _{int}) (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas de infecção.....	62
Figura 9 –	Fotomicrografias representativas dos granulomas de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase aguda da infecção (HE)	63
Figura 10 –	Densidade de número (QA _g) e área dos granulomas esquistossomóticos no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.....	63
Figura 11 –	Diâmetros menor (A), maior (B) e volume (C) dos granulomas esquistossomóticos no fígado de camundongos infectados com <i>S.</i>	

	<i>mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.....	64
Figura 12 –	Contagem do número de células mononucleares (A), polimorfonucleares (B) e leucócitos totais (C) na bainha de granulomas esquistossomóticos do fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.....	65
Figura 13 –	Fotomicrografias representativas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase aguda da infecção (picrosírius)	66
Figura 14 –	Distribuição diferencial dos granulomas esquistossomóticos - granulomas produtivos (A) e granulomas fibrosos (B) no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.....	67
Figura 15 –	Fotomicrografia representativa de granuloma hepático de camundongo infectado com <i>S. mansoni</i> alimentado com dieta padrão na fase aguda da infecção e suas respectivas imagens no Programa <i>ImageJ</i>	67
Figura 16 –	Área de colágeno no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.....	68
Figura 17 –	Fotomicrografias representativas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase aguda da infecção.....	69
Figura 18 –	Espessura das camadas da mucosa (epitélio, mucosa e muscular da mucosa) e da camada muscular (muscular externa e muscular interna) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas de infecção.....	70
Figura 19 –	Comprimento (A) e largura (B) das criptas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas de infecção.....	71
Figura 20 –	Área dos gânglios mioentéricos (A) e número de células dos gânglios (B) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas de infecção.....	72

Figura 21 –	Delineamento experimental.....	87
Figura 22 –	Fluxograma da randomização dos grupos experimentais e suas características.....	88
Figura 23 –	Peso e volume relativo do fígado (A e B) de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sadios e infectados com 20 semanas de infecção por <i>S. mansoni</i>	99
Figura 24 –	Peso relativo da gordura periepididimal de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sadios e infectados com 20 semanas de infecção por <i>S. mansoni</i>	99
Figura 25 –	Número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) e no intestino (C) de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da doença.....	100
Figura 26 –	Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos alimentados com dieta hiperproteica e padrão, sadios e infectados com <i>S. mansoni</i> na fase representativa de infecção crônica (20 semanas de infecção)..	101
Figura 27 –	Densidade de volume (Vv) de hepatócitos (A) e tecido conjuntivo (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas de infecção.....	102
Figura 28 –	Densidade de número de hepatócitos (QA _h) (A) e células intersticiais (QA _{int}) (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas de infecção.....	103
Figura 29 –	Fotomicrografias representativas dos granulomas de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase crônica da infecção (HE)	104
Figura 30 –	Densidade de número (QA _g) e área dos granulomas esquistossomóticos no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.....	104
Figura 31 –	Diâmetros menor (A), maior (B) e volume (C) dos granulomas esquistossomóticos no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.....	105

Figura 32 –	Contagem do número de células mononucleares (A), polimorfonucleares (B) e leucócitos totais (C) na bainha de granulomas esquistossomóticos do fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.....	106
Figura 33 –	Fotomicrografias representativas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase crônica da infecção (picrosírius)	107
Figura 34 –	Distribuição diferencial dos granulomas esquistossomóticos - granulomas produtivos (A) e granulomas fibrosos (B) no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.....	108
Figura 35 –	Fotomicrografia representativa de granuloma hepático de camundongo infectado com <i>S. mansoni</i> alimentado com dieta padrão na fase crônica da infecção e suas respectivas imagens no Programa <i>ImageJ</i>	108
Figura 36 –	Área de colágeno no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.....	109
Figura 37 –	Fotomicrografias representativas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase crônica da infecção.....	110
Figura 38 –	Espessura das camadas da mucosa (epitélio, mucosa e muscular da mucosa) e da camada muscular (muscular externa e muscular interna) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas de infecção.....	111
Figura 39 –	Comprimento (A) e largura (B) das criptas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas de infecção.....	112
Figura 40 –	Área dos gânglios mioentéricos (A) e número de células dos gânglios (B) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com <i>S. mansoni</i> , alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas de infecção.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição centesimal das dietas padrão e hiperproteica.....	47
Tabela 2 –	Parâmetros biométricos e ingestão dietética dos grupos experimentais infectados/não infectados que receberam dietas padrão/ hiperproteica e foram eutanasiados 8 semanas pós-infecção	56
Tabela 3 –	Nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal e digestibilidade aparente da dieta hiperproteica dos grupos experimentais infectados/não infectados na fase representativa de infecção aguda.....	57
Tabela 4 –	Taxa de mortalidade (8 semanas de infecção)	72
Tabela 5 –	Parâmetros biométricos e ingestão dietética dos grupos experimentais infectados/não infectados que receberam dietas padrão/ hiperproteica e foram eutanasiados 20 semanas pós-infecção.....	97
Tabela 6 –	Nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal e digestibilidade aparente da dieta hiperproteica dos grupos experimentais infectados/não infectados na fase representativa de infecção crônica.....	98
Tabela 7 –	Taxa de mortalidade (20 semanas de infecção)	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT –	Alanina aminotransferase
AOAC –	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AST –	Aspartato aminotransferase
At –	Área de teste
CEA –	Coefficiente de eficiência alimentar
CEUA –	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNA –	Comprimento naso-anal
DA –	Coefficiente de digestibilidade aparente
DP –	Dieta padrão
DPa-I –	Grupo infectado, dieta padrão, fase aguda.
DPa-S –	Grupo sadio, dieta padrão, fase representativa de infecção aguda
DPc-I –	Grupo infectado, dieta padrão, fase crônica
DPc-S –	Grupo sadio, dieta padrão, fase representativa de infecção crônica
FA –	Fosfatase alcalina
HE –	Hematoxilina - eosina
HP –	Dieta hiperproteica
HPa-I –	Grupo infectado, dieta hiperproteica, fase aguda
HPa-S –	Grupo sadio, dieta hiperproteica, fase representativa de infecção aguda
HPc-I –	Grupo infectado, dieta hiperproteica, fase crônica
HPc-S –	Grupo sadio, dieta hiperproteica, fase representativa de infecção crônica
IFN- γ –	Interferon gama
IL-13 –	Interleucina-13
IL-2 –	Interleucina-2
IL-4 –	Interleucina-4
IL-5 –	Interleucina-5
IL-6 –	Interleucina-6
MNs –	Células mononucleares
NF –	Nitrogênio fecal
NI –	Nitrogênio ingerido
PF –	Peso corporal final do animal
PI –	Peso corporal inicial do animal

PMNs –	Células polimorfonucleares
QA –	Número de células
QAg –	Densidade de número de granulomas
QAh –	Densidade de número de hepatócitos
QAint –	Densidade de número de células intersticiais
TA –	Quantidade total de alimento ingerido
TCD4 –	Linfócitos TCD4
Th1 –	Linfócitos T helper 1
Th2 –	Linfócitos T helper 2
TNF- α –	Fator de necrose tumoral alfa
UNIFAL-MG –	Universidade Federal de Alfenas
V –	Volume
Vv –	Densidade de volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1	ASPECTOS GERAIS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI.....	19
1.2	RELAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E A ESQUISTOSSOMOSE..	20
1.3	IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	23
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	OBJETIVOS.....	27
	CAPÍTULO 1 – ARTIGO PUBLICADO: Could diet composition modulate pathological outcomes in schistosomiasis mansoni? A systematic review of <i>in vivo</i> preclinical evidence.....	28
	CAPÍTULO 2 – EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NA FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....	39
1	INTRODUÇÃO.....	40
2	OBJETIVOS.....	43
3	METODOLOGIA.....	44
3.1	ANIMAIS.....	44
3.2	INFECÇÃO POR <i>Schistosoma mansoni</i>	44
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	44
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	45
3.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	46
3.6	DIETAS EXPERIMENTAIS.....	46
3.7	EXAME PARASITOLÓGICO.....	47
3.8	NÚMERO DE OVOS PRESENTES NO FÍGADO E NO INTESTINO.....	48
3.9	DIGESTIBILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA DA DIETA.....	48
3.10	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR E BIOMETRIA.....	49
3.11	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL.....	50
3.12	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA.....	50
3.13	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	50
3.14	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	51
3.15	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS.....	52
3.16	ANÁLISE DA CELULARIDADE DA BAINHA DO GRANULOMA.....	53
3.17	MORFOMETRIA INTESTINAL.....	53
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
4	RESULTADOS.....	55
4.1	EFEITO DA DIETA NO PERFIL DE CRESCIMENTO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS.....	55
4.2	DIGESTIBILIDADE DA DIETA HIPERPROTEICA.....	57
4.3	PESO E VOLUME RELATIVO DOS ÓRGÃOS.....	57
4.4	DISTRIBUIÇÃO DE OVOS DE <i>S. mansoni</i> NAS FEZES, NO FÍGADO E NO INTESTINO DOS CAMUNDONGOS.....	58
4.5	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO.....	59
4.5.1	Análise histopatológica.....	59
4.5.2	Parâmetros estereológicos do tecido hepático.....	61

4.5.3	Análise microscópica dos granulomas hepáticos – coloração HE.....	62
4.5.3.1	Análise histomorfométrica dos granulomas.....	63
4.5.3.2	Quantificação de celularidade.....	64
4.5.4	Análise microscópica dos granulomas hepáticos–coloração picrosirius	65
4.5.4.1	Análise histomorfométrica dos granulomas.....	66
4.5.4.2	Quantificação de colágeno.....	67
4.6	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO INTESTINO.....	68
4.6.1	Morfometria do intestino.....	69
4.7	MORTALIDADE.....	72
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	73
6	CONCLUSÃO.....	80
	CAPÍTULO 3 – EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NA FASE	
	CRÔNICA DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....	81
1	INTRODUÇÃO.....	82
2	OBJETIVOS.....	85
3	METODOLOGIA.....	86
3.1	ANIMAIS.....	86
3.2	INFECÇÃO POR <i>Schistosoma mansoni</i>	86
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	86
3.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	87
3.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	88
3.6	DIETAS EXPERIMENTAIS.....	88
3.7	EXAME PARASITOLÓGICO.....	89
3.8	NÚMERO DE OVOS PRESENTES NO FÍGADO E NO INTESTINO.....	89
3.9	DIGESTIBILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA DA DIETA.....	90
3.10	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR E BIOMETRIA.....	90
3.11	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DO MATERIAL.....	91
3.12	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA.....	91
3.13	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	92
3.14	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	92
3.15	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS.....	93
3.16	ANÁLISE DA CELULARIDADE DA BAINHA DO GRANULOMA.....	94
3.17	MORFOMETRIA INTESTINAL.....	95
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	95
4	RESULTADOS.....	96
4.1	EFEITO DA DIETA NO PERFIL DE CRESCIMENTO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS.....	96
4.2	DIGESTIBILIDADE DA DIETA HIPERPROTEICA.....	98
4.3	PESO E VOLUME RELATIVO DOS ÓRGÃOS.....	98
4.4	DISTRIBUIÇÃO DE OVOS DE <i>S. mansoni</i> NAS FEZES, NO FÍGADO E NO INTESTINO DOS CAMUNDONGOS.....	99
4.5	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO.....	100
4.5.1	Análise histopatológica.....	100
4.5.2	Parâmetros estereológicos do tecido hepático.....	102

4.5.3	Análise microscópica dos granulomas hepáticos – coloração HE.....	103
4.5.3.1	Análise histomorfométrica dos granulomas.....	104
4.5.3.2	Quantificação de celularidade.....	105
4.5.4	Análise microscópica dos granulomas hepáticos–coloração picrosirius	106
4.5.4.1	Análise histomorfométrica dos granulomas.....	107
4.5.4.2	Quantificação de colágeno.....	108
4.6	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO INTESTINO.....	109
4.6.1	Morfometria do intestino.....	110
4.7	MORTALIDADE.....	113
5	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	114
6	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS.....	121
	ANEXO.....	128

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ASPECTOS GERAIS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A esquistossomose mansoni é uma parasitose e tem grande relevância como problema de saúde pública e sua prevalência pode estar associada ao baixo desenvolvimento econômico, uma vez que se tem a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para os afazeres domésticos, agricultura e lazer (KATZ; PEIXOTO, 2000).

O agente etiológico da esquistossomose mansoni é o *Schistosoma mansoni*, um helminto pertencente à classe dos *Trematoda*, família *Schistosomatidae* e gênero *Schistosoma*. São vermes digenéticos, delgados, de coloração branca e sexos separados, em que a fêmea adulta, mais alongada, encontra-se alojada no canal ginecóforo do macho (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Nessa parasitose, as formas adultas do trematódeo habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro (vertebrado/homem) e as formas intermediárias (esporocistos primários, esporocistos secundários, cercárias) se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*, sendo o vetor mais importante do *S. mansoni* a espécie *B. glabrata* (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

A esquistossomose pode ser causada por seis espécies, tais como *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. guineenses* e *S. intercalatum*, sendo que as de maior relevância médica para o homem são *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (AJIBOLA et al., 2018; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). A esquistossomose distribui-se em vários países de regiões tropicais. Estima-se uma prevalência mundial de 249 milhões de indivíduos. Na América Latina é encontrada no Brasil, Venezuela, Porto Rico, Antilhas e Suriname. O Ministério da Saúde estima em 2,5 milhões o número de pacientes com esquistossomose no Brasil. Os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados sendo que a ocorrência está diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores (WHO, 2017; VITORINO et al., 2012). Entretanto, a migração de pessoas parasitadas para áreas urbanas não afetadas e movimentos populacionais nas periferias das cidades estão introduzindo a doença em novas áreas (GOMES et al., 2016).

Os sinais clínicos da esquistossomose são dependentes do estágio de maturação dos parasitos e seus ovos. Assim, a esquistossomose pode ser classificada em duas fases: aguda e crônica. Em humanos, na fase aguda, observa-se a dermatite cercariana, provocada pela penetração das cercárias na pele (PORDEUS et al., 2008; SILVA et al., 2012). A infecção aguda

também é caracterizada por uma doença febril debilitante (Febre de Katayama) caracterizada por febre, anorexia, dor abdominal e cefaleia, e que geralmente ocorre antes do aparecimento de ovos nas fezes, tendo um pico 6 a 8 semanas pós-infecção (HAMS; AVIELO; FALLON, 2013). Na fase crônica, os ovos retidos em vários tecidos induzem a formação da inflamação granulomatosa, que juntamente com a fibrose subsequente causa a maioria das condições patológicas. Embora vários órgãos possam ser afetados, o fígado, o baço e os intestinos são os mais atingidos. Em indivíduos que desenvolvem esquistossomose hepatoesplênica, a fibrose dos espaços periportal hepático causa lesões vasculares obstrutivas, hipertensão portal, varizes, ascite, organomegalia (GRAY et al., 2011). A fibrose faz parte do processo de cicatrização que se segue à reação inflamatória granulomatosa aguda, ao redor dos ovos de *Schistosoma* aprisionados nos pequenos vasos hepáticos (COUTO et al., 2008). Alguns casos de esquistossomose podem apresentar sintomas pulmonares e comprometimento neurológico durante a fase pós-infecciosa em doentes não imunes à doença (RODRIGUES et al., 2009; VITORINO et al., 2012).

A inflamação granulomatosa ao redor dos ovos do parasita é uma característica fundamental da esquistossomose mansoni e a lesão associada ao ovo é fundamental para a morbidade e mortalidade que ocorre em humanos infectados (HAMS; AVIELO; FALLON, 2013).

1.2 RELAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL E A ESQUISTOSSOMOSE

A relação entre desnutrição e esquistossomose é bastante frequente em regiões endêmicas. A vulnerabilidade das comunidades parece ser reforçada pelo estado nutricional, uma vez que muitas áreas endêmicas para esquistossomose são também expostas a hábitos alimentares inadequados ou mesmo à escassez de alimentos (ADENOWO et al., 2015).

A desnutrição, que, resumidamente, resulta do não-atendimento das necessidades nutricionais do indivíduo, causada por uma dieta multideficiente pode complicar uma grande maioria de doenças, principalmente se elas forem de característica crônica (COUTO et al., 2007).

A desnutrição proteico-energética provoca uma deficiência de calorias e aminoácidos, essenciais na síntese de DNA e RNA, na produção de proteínas em processos inflamatórios agudos. Essa deficiência leva a um considerável comprometimento do sistema imune, uma vez que as citocinas são constituídas por aminoácidos e a expansão clonal dos linfócitos depende da síntese proteica (BRUNETTO, 2007). Uma ingestão dietética nutricionalmente equilibrada

é essencial para a manutenção da função do sistema imunológico (COUTINHO et al., 2010; ZAPATERA et al., 2015).

Em consonância com os estudos sobre as interações existentes entre desnutrição e doenças infecto-parasitárias que iniciaram desde meados do século XX, a ciência da nutrição avançou a partir da década de 1940, em relação à bioquímica e a fisiologia dos principais nutrientes e seu papel para a manutenção da saúde (CARVALHO; COELHO; LENZI, 2008).

Experimentos animais com dietas hipoproteicas mostraram atenuação no dano aos órgãos, uma vez que contribuíram na diminuição da carga parasitária (COUTINHO et al., 1997) e da inflamação granulomatosa (BARROS et al., 2009; BARROS et al., 2014). Por outro lado, o desenvolvimento da infecção e as defesas do hospedeiro são afetados igualmente e adversamente pela restrição proteica, e, dessa forma, a interação dessas condições seria responsável por determinar altas taxas de mortalidade nesses estudos (MARQUES et al., 2018).

O papel do estado nutricional do hospedeiro foi considerado por Coutinho et al. (2003) um fator de contribuição para a fibrose hepática esquistossomótica. Em seu trabalho com camundongos desnutridos (dieta deficiente em proteína) em contraste com grupo de animais bem nutridos (dieta balanceada), encontraram menor densidade volumétrica e numérica de granulomas periovulares nos animais desnutridos. Além disso, a quantidade de colágeno nos granulomas também foi reduzida nos desnutridos, atingindo maiores concentrações no grupo controle e em "desnutrição tardia" (dieta balanceada deslocada para uma deficiente). Isso pode indicar que esses granulomas foram formados quando os animais ainda estavam bem nutridos, mas não foi degradado mais tarde, quando a dieta deficiente foi utilizada. Os autores explicam que apenas uma investigação mais aprofundada poderia esclarecer como a desnutrição pode interferir no processo de absorção fibrosa.

Couto et al. (2008) avaliaram as alterações da função hepática em camundongos com esquistossomose associada à desnutrição e observaram no estudo que desnutrição e/ou infecção podem interferir nos níveis dos indicadores bioquímicos hepáticos esperados, porém, as alterações da função hepática foram mais importantes quando o processo inflamatório da esquistossomose se mostrou mais intenso, levando ao aumento das aminotransferases. Nesse trabalho, os grupos foram submetidos à dieta multideficiente característica de áreas endêmicas de esquistossomose (hipoproteica) e dieta padrão (normoproteica). Tiveram como resultado que todos os grupos, comparados ao controle, apresentaram elevação da enzima alanina aminotransferase (ALT), sendo que tanto os níveis de ALT quanto de AST (aspartato aminotransferase) dos animais do grupo controle infectado foram mais elevados, o que indicaria um processo inflamatório mais intenso, esperado nos animais normonutridos. Nesta pesquisa

com camundongos, a relação AST:ALT foi semelhante, mas apresentou uma razão maior que 1 em todos grupos, critério usado para diagnóstico de severo comprometimento hepático em humanos. Sabe-se que a desnutrição causa deterioração das funções hepáticas, com alterações sorológicas relativas à ALT, AST e FA (fosfatase alcalina). Na esquistossomose, a alta carga parasitária seria um dos mecanismos de elevação de ALT e a inflamação decorrente afetaria os níveis das enzimas hepáticas. Todavia, os autores relatam que as alterações da função hepática na infecção pelo *S. mansoni* parecem depender, não só do grau de fibrose, mas da intercorrência de outras infecções.

Barros et al. (2009) também investigaram os efeitos da dieta deficiente em proteína. O ganho de peso corporal e as concentrações de albumina sérica foram significativamente mais baixos em animais mal nutridos (dieta com 8% de proteína) do que nos controles (23% de proteína). Além disso, mostraram que a privação de proteína leva a um microambiente hostil com efeito deletério sobre os vermes de ambos os gêneros, culminando em alterações morfológicas na arquitetura do invólucro e o sistema reprodutivo.

Em exame histológico realizado por Couto et al. (2007), ficou evidente que a desnutrição isoladamente não causou alterações nos órgãos examinados. Os animais analisados estavam divididos em quatro grupos, infectados ou não e alimentados com dieta padrão ou dieta básica regional (hipoproteica). Os pesquisadores verificaram também que nos animais nutridos, o processo inflamatório foi mais intenso, com maior formação colagênica no fígado e com maior número de granulomas que nos desnutridos.

Além da dieta hipoproteica, a investigação sobre o impacto da dieta hiperlipídica na infecção com *S. mansoni* tem sido bastante utilizada (ALENCAR et al., 2009; ALENCAR et al., 2012; DA SILVA et al., 2012).

Em estudo de Alencar e seus colaboradores (2012), avaliou-se o efeito de uma dieta com alto teor de gordura a longo prazo sobre a esquistossomose mansônica crônica em comparação com uma dieta padrão. Os camundongos cronicamente infectados alimentados com uma dieta rica em gordura apresentaram maior número de granulomas periovulares do que o grupo com infecção aguda. Além disso, concluíram que a dieta com alto teor de gordura e a infecção tiveram impacto significativo sobre a morfologia e morfometria do intestino delgado entre os animais testados.

Da mesma forma, Alencar et al. (2009) investigaram o efeito da dieta com alto teor de lipídios sobre o curso da esquistossomose crônica em camundongos e encontraram aumento significativo do volume do fígado e do baço em animais infectados alimentados com uma dieta rica em gordura.

A associação de dieta hiperlipídica com a esquistossomose também foi avaliada por Da Silva et al. (2012) em relação à histopatologia, morfometria e estereologia do baço. Os autores explicam que tanto a infecção devido à estimulação antigênica e a dieta hiperlipídica podem resultar em um aumento significativo do baço seguido de alterações na sua arquitetura. Em geral, o alto teor de lipídios causa aumento dos danos aos órgãos e da mortalidade, uma vez que estimulam a esteatose hepática, carga parasitária e inflamação granulomatosa.

1.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Humanos tornam-se infectados com *S. mansoni* após exposição à água contaminada pela penetração de cercárias na pele. Em seguida, essas cercárias transformam-se em esquistossômulos e migram via vasculatura e linfáticos através dos pulmões para o sistema porta-hepático. Os esquistossômulos diferenciam-se em vermes de *S. mansoni* machos e fêmeas que migram ao plexo venoso mesentérico. Cada fêmea de *S. mansoni* pode produzir em média 300 ovos por dia, os quais são liberados na circulação mesentérica. Os ovos aderem ao endotélio dos vasos sanguíneos mesentéricos e como são altamente antigênicos, induzem uma inflamação necessária para a translocação para dentro do lúmen intestinal e excreção nas fezes. Ovos que passam pela parede intestinal são excretados nas fezes e se depositados em água doce, podem infectar uma espécie de caramujo, recomeçando o ciclo (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

No entanto, parte dos ovos pode ficar retida em vários órgãos (intestino, fígado, pâncreas, pulmões e outros), provocando uma reação inflamatória peculiar, chamada de reação granulomatosa ou granuloma, lesão típica observada em torno dos ovos depositados pelos parasitos. Os granulomas são compostos, principalmente, por fibras colágenas, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos em proporções diferentes, variando nos diferentes órgãos e em função da fase de sua evolução (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Lins e seus colaboradores (2008) avaliaram a distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases da formação do granuloma hepático de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e concluíram que a dinâmica dos eosinófilos possui papel importante na formação da reação granulomatosa do hospedeiro e resolução do processo inflamatório causado pelo ovo do parasita.

Essa inflamação granulomatosa é considerada uma reação de hipersensibilidade tipo tardia mediada por células T CD4. Ao longo da infecção, os antígenos liberados pelos ovos podem estimular as células do hospedeiro a desencadear uma resposta Th1, com produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ que estimulam um processo inflamatório e ativam principalmente

macrófagos; e com o início da postura dos ovos há atenuação da resposta Th1 e aumento de uma resposta do tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que suprimem a produção e as funções efetoras dos mediadores proinflamatórios, ativando principalmente as células B, estimulando a produção de anticorpos particularmente IgE e aumentam a proliferação de eosinófilos (ABATH et al., 2006; CHUAH et al., 2014; PEARCE; MACDONALD, 2002).

A resposta imune do hospedeiro contra os antígenos dos ovos é mais intensa na fase aguda da infecção, diminuindo durante a fase crônica. A transição no perfil de citocinas produzidas leva à imunomodulação, com diminuição do tamanho dos granulomas recentemente formados (ANDRADE; WARREN, 1964; PEARCE; MACDONALD, 2002). Entretanto, mesmo com essa modulação, a contínua formação de granulomas no parênquima hepático pode levar ao desenvolvimento de fibrose hepática severa.

De forma geral, na fase aguda da esquistossomose, a resposta imune adaptativa durante a fase pré-patente, tem como característica uma alta produção das citocinas IFN- γ , IL-2, e de quimiocinas e uma menor produção de IL-4 e IL-5, ao contrário do que é observado durante a fase crônica da esquistossomose, a qual é caracterizada por uma baixa produção de IFN- γ e um aumento da produção das citocinas da resposta imune Th2, como a IL-4 e IL-5 (CHUAH et al., 2014).

Nesse sentido, torna-se fundamental avaliar o efeito da dieta hiperproteica na esquistossomose experimental, principalmente no desenvolvimento de granulomas hepáticos e no perfil imunológico.

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é uma infecção sistêmica negligenciada e com elevada prevalência em todo o mundo. Essa doença acomete principalmente populações com baixo desenvolvimento socioeconômico, as quais frequentemente também estão submetidas à elevada vulnerabilidade nutricional, principalmente caracterizada por escassez de alimento e/ou nutrientes. Como a resistência à infecção por *S. mansoni* está diretamente ligada à resposta imunológica do hospedeiro, distúrbios imunológicos decorrentes de uma má nutrição podem modificar os desfechos patológicos da infecção (ADENOWO et al., 2015; KATZ; PEIXOTO, 2000). Ao longo de décadas de pesquisa, diversos estudos investigaram o impacto do perfil dietético e da má nutrição sobre a evolução da esquistossomose. Atualmente, a evidência científica disponível é bastante fragmentada e principalmente baseada em estudos pré-clínicos com modelo animal. Embora esses estudos sejam essenciais para compreender a relação entre dieta e esquistossomose, torna-se difícil estabelecer quais os componentes da dieta exercem maior impacto sobre o perfil de resistência e susceptibilidade do hospedeiro frente à infecção por *S. mansoni*. Assim, investigar a evidência científica disponível sobre o tema representa uma tarefa necessária e urgente para esclarecer como e até que ponto diferentes tipos de dieta podem modificar a evolução da esquistossomose. Esse entendimento ampliará a compreensão sobre como as intervenções dietéticas podem influenciar na fisiopatologia da infecção e modificar o balanço entre resistência e susceptibilidade do hospedeiro.

Estudos epidemiológicos e clínico-nutricionais apresentam evidência consistente de que populações com baixo desenvolvimento socioeconômico são frequentemente expostas a deficiências na ingestão de macronutrientes, especialmente proteínas, e em micronutrientes como vitaminas e minerais. Diferentes tipos de estratégias dietéticas associadas à infecção esquistossomótica experimental em camundongos já foram estudadas, entretanto, os efeitos da dieta hiperproteica ainda são poucos conhecidos, de acordo com trabalho de Marques e seus colaboradores (2018) disponível no Capítulo 1. Em geral, dietas hipoproteicas atenuam a carga parasitária e a inflamação granulomatosa, mas também reduzem a resistência do hospedeiro à infecção por *S. mansoni*, determinando maiores taxas de mortalidade (COUTINHO et al., 1997; COUTINHO et al., 2010; BARROS et al., 2014). Além dos efeitos de dietas hipoproteicas na esquistossomose experimental, a dieta hiperlipídica também é alvo de pesquisas. Estimulando alterações hepáticas, a carga parasitária e a inflamação granulomatosa, as dietas hiperlipídicas aumentam o dano aos órgãos e a mortalidade em animais infectados (ALENCAR et al., 2009; ALENCAR et al., 2012; DA SILVA et al., 2012). Outras estratégias dietéticas como o aumento

do teor de açúcar, restrição de vitaminas, suplementação de zinco e dieta rica em proteínas foram menos estudadas na esquistossomose (MAGALHÃES et al., 1978; AKPOM; WARREN, 1975; HELMY et al., 2009).

Assim, os modelos pré-clínicos *in vivo* têm fornecido uma valiosa contribuição no entendimento de como a composição da dieta interfere na patogênese das doenças infecciosas (OLIVEIRA et al., 2004; BARROS et al., 2014). Faz-se importante analisar o comportamento biológico do excesso de proteínas na evolução da doença. Nesse sentido, o presente estudo se propõe a avaliar o efeito da dieta hiperproteica na esquistossomose experimental, em camundongos, principalmente no desenvolvimento de granulomas hepáticos e no perfil imunológico. Além disso, a associação deste tipo de dieta à esquistossomose pode elucidar se existe interação entre a infecção, a fase da infecção e a dieta e o quanto essa interação pode modificar a patogênese nas infecções por *S. mansoni*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a evidência sobre o impacto da composição dietética sobre a evolução da infecção por *S. mansoni* e o efeito da dieta hiperproteica no desenvolvimento da esquistossomose experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) revisar sistematicamente a evidência pré-clínica *in vivo* sobre o impacto da composição da dieta na infecção por *S. mansoni*;
- b) avaliar o efeito da dieta hiperproteica na fase aguda da esquistossomose experimental;
- c) avaliar o efeito da dieta hiperproteica na fase crônica da esquistossomose experimental.

Cada um destes objetivos específicos será apresentado na forma de capítulos:

- a) capítulo 1: Artigo Publicado: Could diet composition modulate pathological outcomes in schistosomiasis mansoni? A systematic review of *in vivo* preclinical evidence;
- b) capítulo 2: Efeito da dieta hiperproteica na fase aguda da esquistossomose experimental;
- c) capítulo 3: Efeito da dieta hiperproteica na fase crônica da esquistossomose experimental.

CAPÍTULO 1

Could diet composition modulate pathological outcomes in schistosomiasis mansoni? A systematic review of *in vivo* preclinical evidence (ARTIGO PUBLICADO)

Review Article

Cite this article: Marques DVB, Felizardo AA, Souza RLM, Pereira AAC, Gonçalves RN, Novaes RD. Could diet composition modulate pathological outcomes in schistosomiasis mansoni? A systematic review of *in vivo* preclinical evidence. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0031182018000057>

Received: 17 November 2017

Revised: 29 December 2017

Accepted: 3 January 2018

Key words:

Experimental parasitology; malnutrition; *Schistosoma mansoni*; schistosomiasis

Author for correspondence: Rômulo Dias Novaes, E-mail: romuonovaes@yahoo.com.br, romulo.novaes@unifal-mg.edu.br

Could diet composition modulate pathological outcomes in schistosomiasis mansoni? A systematic review of *in vivo* preclinical evidence

Débora Vasconcelos Bastos Marques¹, Amanda Aparecida Felizardo², Raquel Lopes Martins Souza¹, Alessandro Antônio Costa Pereira¹, Reggiani Vilela Gonçalves³ and Rômulo Dias Novaes²

¹Department Pathology and Parasitology, Federal University of Alfenas, Institute of Biomedical Sciences, Alfenas, 37130-000, Minas Gerais, Brazil; ²Department of Structural Biology, Federal University of Alfenas, Institute of Biomedical Sciences, Alfenas, 37130-000, Minas Gerais, Brazil and ³Department of Animal Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, 36570-000, Minas Gerais, Brazil

Abstract

Schistosomiasis and malnutrition are often overlapped in poor communities, resulting in disproportionately high mortality rates. Currently, fragmented data make it difficult to define the relationship between diet and schistosomiasis. Thus, we systematically review the preclinical evidence on the impact of diet in *Schistosoma mansoni* infection. From a structured search, we recovered 27 original articles. All studies used mice and most of them investigated hypoproteic (70.37%), hyperlipidic (22.22%) or vitamin-deficient (7.41%) diets. Diets based on carbohydrate, zinc or milk supplementation were investigated at a reduced frequency (3.70% each). Hypoproteic diets attenuated parasitic load and granulomatous inflammation, but also reduced host resistance to *S. mansoni* infection, determining higher mortality rates. By stimulating steatohepatitis, parasitic load and granulomatous inflammation, hyperlipidic diets increase organ damage and mortality in infected animals. Although a high-sugar diet and vitamin restriction potentiate and zinc supplementation attenuates *S. mansoni* infection, the current evidence for these diets remains inconclusive. Analysis of methodological quality indicated that the current evidence is at high risk of bias due to incomplete characterization of the experimental design, diet composition and treatment protocols. From the bias analysis, we report methodological limitations that should be considered to avoid systematic reproduction of inconsistent and poorly reproducible experimental designs.

Introduction

Schistosomiasis mansoni is a tropical neglected disease caused by the trematode parasite *Schistosoma mansoni* (Gryseels, 2012; Colley *et al.* 2014). Schistosomiasis has high incidence and prevalence in tropical and subtropical areas, mainly in African, Middle Eastern, Caribbean, South and Central American countries (WHO, 2017). In these endemic areas, schistosomiasis is a public health problem, especially due to its close correlation with low socioeconomic development, poor sanitation and restricted access to formal health services (Balen *et al.* 2013). About 249 million people are infected worldwide, and 780 million are at risk of infection by parasites of the genus *Schistosoma* (Pinto-Almeida *et al.* 2016; WHO, 2017). Estimates show that at least 218 million people required treatment for schistosomiasis in 2015, and at least 90% of those live in Africa (WHO, 2017).

People become infected by *S. mansoni* when larval forms of the parasite released by freshwater snails (intermediary host) penetrate the skin of the definitive host (humans) during contact with contaminated water (WHO, 2017). Transmission occurs when people with schistosomiasis excrete feces containing parasite eggs in water, which hatch and release new larval forms. In the definitive host, the larvae migrate to the mesenteric blood vessels and develop into adult male and female worms, releasing eggs (Gryseels, 2012; Adenowo *et al.* 2015). As a consequence of egg-induced pathology, schistosomes and also *S. mansoni* eggs can spread throughout the host organism through porta-caval shunts, inducing immune-mediated progressive damage in multiple organs, especially lungs (Wilson, 1990, 2009).

Schistosomiasis mansoni presents a long-term evolution, being usually asymptomatic or having mild clinical manifestations in the initial phases. However, throughout disease progression and chronification, infected individuals can develop multiple organ injuries, especially in the spleen, lungs, intestine and liver (Alencar *et al.* 2012; Goes *et al.* 2012). Hepatic damage is the most serious pathological event triggered by *S. mansoni*, which is characterized by intense granulomatous inflammation in response to parasite eggs, periportal fibrosis, portal hypertension, gastrointestinal bleeding and frequently death (Negrão-Corrêa *et al.* 2014). Hepatosplenomegaly is common in advanced cases and is frequently associated with hypertension of abdominal blood vessels and ascites (Colley *et al.* 2014; Inobaya *et al.* 2014; WHO, 2017). The disease is responsible by high rates of morbidity and mortality, causing the

death of about 10 100 people in the year 2016 (GBD 2016 Causes of Death Collaborators, 2017).

Due to precarious basic sanitation, schistosomiasis affects mostly poor and rural communities (Pinto-Almeida *et al.* 2016). In most cases, people are infected during agricultural, domestic and recreational activities, which expose them to water containing parasite larvae. Communities become even more vulnerable due to lack of information on disease transmission and inadequate hygiene habits (WHO, 2017). This vulnerability seems to be reinforced by nutritional status, especially considering that people living in several poor endemic areas for schistosomiasis are also often exposed to inadequate alimentary habits or even food shortages (Adenowo *et al.* 2015). This condition is particularly dangerous for children, since the impact of both schistosomiasis and malnutrition is additive and/or synergistic, causing marked weight loss, severe anaemia, reduced ability to learn and delayed cognitive development (Mekonnen *et al.* 2014).

The impact of the association between diet composition and schistosomiasis on disease physiopathology and progression is systematically neglected and poorly understood. Although underestimated, there is evidence that in economically disadvantaged populations, reduced food availability and/or multi-deficient diets (i.e. protein-energy malnutrition and micronutrient deficiencies) are more a rule than an exception (Katona and Katona-Apte, 2008; Mekonnen *et al.* 2014). Nutritionally adjusted dietary intake is a basic requirement for the maintenance of a balanced general health status, with pivotal impact on immunological system function (Coutinho *et al.* 2010; Zapatera *et al.* 2015). There is evidence that macronutrient (especially proteins) and micronutrient (i.e. vitamins A, C and E; minerals zinc, iron and iodine) deficiencies are closely correlated to poor growth, impaired intellectual development, increased susceptibility to diseases and risk of death (Calder, 2013; Czerwonogrodzka-Senczyzna *et al.* 2016). Considering that adequate macronutrient and micronutrient availability is essential to immune cells' development (proliferation and differentiation), antigen recognition, activation and expression of cellular and humoral effector phenotypes, deficient diets represent a potential environmental risk for infectious diseases (Krawinkel, 2012; Calder, 2013). Reciprocally, these diseases have also proved to be important risk factors for malnutrition development and progression, aggravating organic deterioration associated with the infection (Katona and Katona-Apte, 2008; Coutinho *et al.* 2010; Da Silva *et al.* 2012).

Faced with the devastating impact of schistosomiasis worldwide and the frequent overlap of malnutrition in endemic areas, there is a limited number of initiatives investigating the impact of malnutrition and diet composition on schistosomiasis evolution and severity. Due to ethical implications, the scarce evidence on the relationship between schistosomiasis and dietary composition in humans is based mainly on observational clinical-epidemiological studies (Mekonnen *et al.* 2014; Munisi *et al.* 2016), in which the nature of the methodological design (i.e. limited internal and external control) impairs understanding of the pathophysiological mechanisms underlying this interaction. Furthermore, the external validity (generalizability) of these studies is an additional limiting factor determined mainly by the dynamic behaviour of dietary habits, which presents a highly variable spectrum in different populations (Corbett *et al.* 1992; Ferreira and Coutinho, 1999). Conversely, due to the rigorous control of dietary strategy (i.e. centesimal composition and availability), experimental models [animals (susceptibility *vs* resistance to infection) and parasite strain (virulence *vs* pathogenicity)], *in vivo* preclinical models have provided a valuable contribution to broadening the understanding of how diet composition and malnutrition interfere in the time course for the development of infectious diseases (Oliveira *et al.* 2004; Barros *et al.* 2014).

Although there are studies relating diet composition and schistosomiasis (Goes *et al.* 2012; Barros *et al.* 2014), fragmented data hinder clear definition of the evidence accumulated, the main research barriers in the area and what strategies should be considered to advance the understanding of this interaction. Thus, this study was designed to systematically review the *in vivo* preclinical evidence on diet composition and schistosomiasis mansoni. Beyond delimiting the experimental models of schistosomiasis, dietary strategies and their relevance (internal consistency), as well as the main pathological processes of schistosomiasis modulated by dietary macro- and micronutrients, this review also evaluated the methodological quality of current evidence, pointing out the main sources of bias.

Methods

Retrieval of research records

The systematic review was carried out according to the guideline PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses) (Moher *et al.* 2009). The PubMed-MEDLINE, Web of Science and Scopus databases were used to search for original research articles that investigated the effect of diets on the development of schistosomiasis mansoni in experimental animal models. We outlined a comprehensive search strategy for the retrieval of all relevant studies based on two integrated steps: (i) primary search from electronic databases, and (ii) secondary search for additional studies in the reference lists of all relevant studies identified in the primary search. For all databases, the search filters were constructed in three complementary levels: (i) animals, (ii) disease (schistosomiasis) and (iii) dietary strategy. Search filters were initially developed for PubMed by combining standardized descriptors and MeSH (Medical Subject Headings, www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh) command to retrieve indexed studies. The command TIAB (title and abstract) was also applied to identify recently published records still in the indexing process. To detect *in vivo* preclinical studies in PubMed, a standardized animal filter was applied (Hooijmans *et al.* 2010). The same search filters used for disease and diet were adapted for Scopus and Web of Science. Another animal filter was created for the Web of Science research, and the own Scopus animal filter [keyword – animals (limit to)] was used in this database.

Specific pathological outcomes were intentionally omitted from our search filters to enhance the search sensitivity [designed to find as many relevant papers as possible, often at the cost of much 'noise' (much time consumed by screening numerous irrelevant studies)] rather than specificity (designed to find a small set of highly relevant papers, with the risk of omitting numerous relevant papers) (Jenkins, 2004). The complete search strategy is described in online Supplementary Table S1. No chronological or language limits were applied in the search strategy. All studies identified and published until March 31, 2017 (research date) were included in the systematic review.

Screening for relevant records

Records retrieved in all databases were overlaid and sorted for duplicate removal by comparing the authors, title, year and journal of publication. After the initial screening, all potentially relevant studies were evaluated in full text for eligibility according to well-defined inclusion and exclusion criteria. Only original studies investigating the effect of dietary interventions on the development of schistosomiasis in animal models were included. Studies exclusively investigating *in vitro* systems, dietary effects on the parasite only, studies analysing multiple infections or testing parameters that do not involve parasitological outcomes, studies without full

text available, and secondary studies (i.e. literature reviews, letters to the editor, commentaries and editorials) were excluded. Eligibility was independently analysed by the researchers, and disagreements were resolved by consensus. The lists of references of each relevant study identified from all databases were manually screened for additional papers (Pereira *et al.* 2017).

Studies characteristics and data extraction

Considering comprehensive descriptions of the research models, data extraction was based on important methodological requirements for preclinical studies described previously (Pereira *et al.* 2017). Thus, we constructed synthesis admitting different descriptive levels as follows: (i) publication characteristics: authors and publication year; (ii) characteristics of the animal models: species, lineage, sex, age and weight; (iii) model of schistosomiasis: disease induction (i.e. parasite strain, inoculum); (iv) diet model: diet composition (i.e. nutrients and energy content), duration, frequency and administration form; and (v) main measure outcomes (i.e. parasitic load, immunological markers, histopathological findings and mortality).

Bias analysis

Analysis of the reporting quality was performed considering methodological items reported in *Animal Research: Reporting of*

In Vivo Experiments guidelines (Kilkenny *et al.* 2010). Reporting quality was evaluated by complete screening of all manuscript sections (abstract to acknowledgements and funding) to evaluate the completeness of the scientific report (Pereira *et al.* 2017). Bias criteria were based on short descriptions of essential study characteristics such as experimental procedures, ethical statement, sample size, animal allocation, randomization, experimental concealment, statistical methods, baseline data and generalizability. Adherence to the individual quality criteria and overall mean adherence were expressed as absolute and relative values (Pereira *et al.* 2017).

Results

Characteristics of publications

From 614 records identified in all electronic databases, 27 relevant studies were recovered in full text (primary search: 25; secondary search: two) and included in the systematic review (File S1). The filters applied in each database and the flowchart indicating the search structure are shown in online Supplementary Table S1 and Fig. 1, respectively. Most studies identified (74.08%, $n = 20$) originated from South America (all from Brazil), followed by four studies (14.82%) from North America (United States), two studies (7.4%) from Asia (India and Saudi Arabia) and one study (3.7%) from Africa (Egypt).

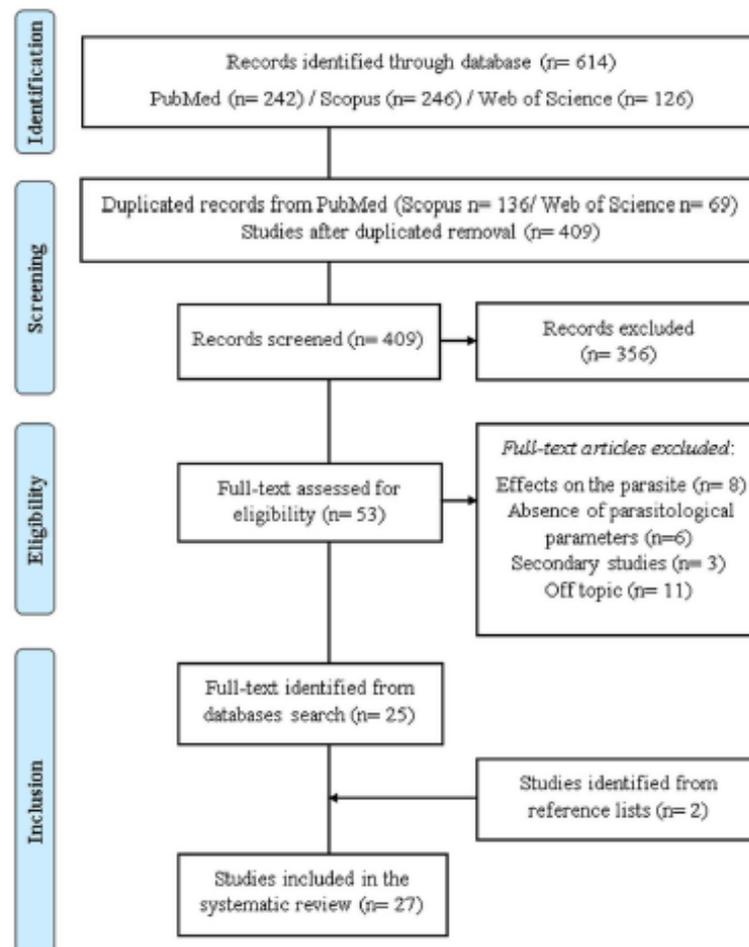


Fig. 1. Flow diagram the systematic review literature search results. Based on PRISMA statement 'Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses' (www.prisma-statement.org).

Characteristics of experimental animals

As shown in online Supplementary Table S2, all studies used mice (100.00%, $n = 27$) as the animal model. Rats or guinea pigs were additionally used in two studies (3.70%, $n = 1$ each). Swiss mice (92.6%, $n = 25$) was the main lineage used, and only one paper (1.35%) omitted this information. The proportion of animal sex was 44.45% female ($n = 12$), 29.63% male ($n = 8$) and 14.81% both ($n = 4$). Only three studies omitted the animals' sex (11.11%). The animals' age ranged from 5 to 56 days, but this variable was neglected in nine studies (33.33%). The animals' weight ranged from 8 to 20 g in mice, 50 to 70 g in rats and 200 g in guinea pigs. This parameter was not reported in 13 (48.15%) studies (online Supplementary Table S2).

Characteristics of dietary strategies

As indicated in online Supplementary Table S2, hypoproteic diets (70.37%, $n = 19$), followed by hyperlipidic diets (22.22%, $n = 6$) and vitamin-deficient diets (7.41%, $n = 2$), were the main dietary models used. High-carbohydrate diet, zinc supplementation and diets containing camel milk were investigated at a reduced frequency (3.70%, $n = 1$ each). Moderated protein restriction (5–10% protein) was most frequent (63.16%, $n = 12$), followed by severe (below 5%) protein restriction (21.05%, $n = 4$) or a combination of both dietary strategies (15.79%, $n = 3$). Twenty-nine per cent lipids were used in all hyperlipidic diets. The nutritional composition of the control diet was reported in only 24 studies (88.88%), of which 14 (58.3%) chose balanced commercial diets for rodents with 20–28% protein, 50–60% carbohydrate and 12–14% lipid. Dietary strategy was administered between 2 and 41 weeks. *Ad libitum* dietary intake was more frequent (77.78%, $n = 21$) and only studies on protein restriction controlled dietary intake. In these studies, dietary intake was similar in infected and uninfected groups, but protein restriction determined loss of body mass or reduction of body mass gain.

Characteristics of *S. mansoni* infection

As shown in online Supplementary Table S2, BH (51.85%, $n = 14$), followed by SLM (11.11%, $n = 3$), Egyptian or Puerto Rican (7.40%, $n = 2$ each), Paulista-PE, L and SL Brazilian (3.70%, $n = 1$ each) were the *S. mansoni* isolates used. Only four studies did not report the parasite isolates. Most of the studies (92.59%, $n = 25$) used 22–450 cercariae in the models of schistosomiasis. *Schistosoma mansoni* eggs (1000–10000) inoculated intravenously or intraperitoneally were reported in only two studies (7.41%). Percutaneous (68%, $n = 12$) and subcutaneous (24%, $n = 6$) were the main inoculation routes. Seven studies (28%) did not report this information, and the period of infection ranged from 5 to 36 weeks (online Supplementary Table S2).

Main outcomes

Detailed quantitative and qualitative parasitological, immunological and histopathological parameters and mortality rates extracted from each study reviewed are described in online Supplementary Tables S3 and S4. Table 1 and Fig. 2 summarize the data considering the sets of studies investigated. Histopathological data were consistently described (85.2%, $n = 23$), whereas parasitological parameters were poorly analysed (44.4%, $n = 12$). Immunological and/or biochemical data were evaluated in 17 studies (63%).

In general, hypoproteic diets increased mortality and reduced parameters such as anti-*S. mansoni* antibodies (i.e. IgG subclasses) and cytokine levels (i.e. transforming growth factor (TGF) β -1, interferon (IFN)- γ ; interleukin (IL)-5); oviposition and egg

Table 1. Summary of the impact of different dietary strategies on the development of parasitological, immunological, biochemical and histopathological parameters in animal models of schistosomiasis mansoni. Data stratified by study are detailed in online Supplementary Table S2

Diets	Effect ^a	Measure outcomes ^a
Low-protein ($n = 18$) ^a	Reduction	Inflammation; number and size of granuloma; liver and spleen size; hepatic fibrosis; parasitaemia; serum albumin and haematocrit; IgG1, IgG2 and IgG3 antibodies levels; TGF β -1, IFN- γ ; IL-5; collagen levels
	Increase	Mortality
High-fat ($n = 6$) ^a	Increase	Hepatic steatosis; spleen and liver hypertrophy and inflammation; parasitic load; cholesterol and triglycerides levels; hepatic regeneration areas
High-sugar ($n = 1$)	Increase	Parasitic load; number of granuloma
Zinc supplementation ($n = 1$) ^a	Reduction	Number and size of granuloma; parasitic load; ALT and AST activities
Camel milk ($n = 1$) ^a	Reduction	Parasitic load
	Increase	Glutathione S-transferase activity
Vitamin restriction ($n = 2$)	Profile variable ^b	Number and size of granuloma

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase.

^aThe effects associated to each measure outcome were reported in the original papers as statistically different compared with schistosomotic animals receiving control diets.

^bVariable profile: Indicated an erratic behaviour of each measure outcome. Similar outcomes in groups receiving modified diet and those treated with standard diet (control) were suppressed.

viability; number of worms and eggs in the tissues (parasitic load); size and numerical and volumetric density of granulomas; liver and spleen hypertrophy, fibrosis and inflammatory infiltrate, and haematocrit and albumin serum levels. Conversely, granuloma formation (i.e. size and number of granulomas) was not influenced by hyperlipidic and vitamin-deficient diets. Oviposition, egg viability and accumulation in hepatic tissue, liver and spleen inflammatory infiltrate, hepatosplenomegaly, hepatic steatosis, serum cholesterol, and their fractions were increased by hyperlipidic diets. A high-sugar diet increased the parasitic load and the number of granulomas. Zinc supplementation reduced the number and size of granulomas, parasitic load, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) activities in serum. Diets containing camel milk caused reduction in parasitic load and increased glutathione S-transferase activity (Table 1, and online Supplementary Tables S3 and S4).

The animals' mortality was reported in only six studies (21.4%). Severe (<5% protein) and moderated (5–10% protein) protein-restricted diets determined 31–45.2% and 35–48.07% mortality, respectively, whereas control diets (20–25% protein) were associated with 29–45% mortality. Only one study reported 30% mortality in animals receiving a hyperlipidic diet (29% lipids), compared with 10% mortality in groups treated with a standard diet (12% lipids) (Table 1, and online Supplementary Tables S3 and S4). Considering all evidence available, Fig. 2 shows an integrated model that relates the impact of dietary strategies on primary (parasitic load and mortality) and secondary measure outcomes (immunological, biochemical and histopathological) in schistosomiasis.

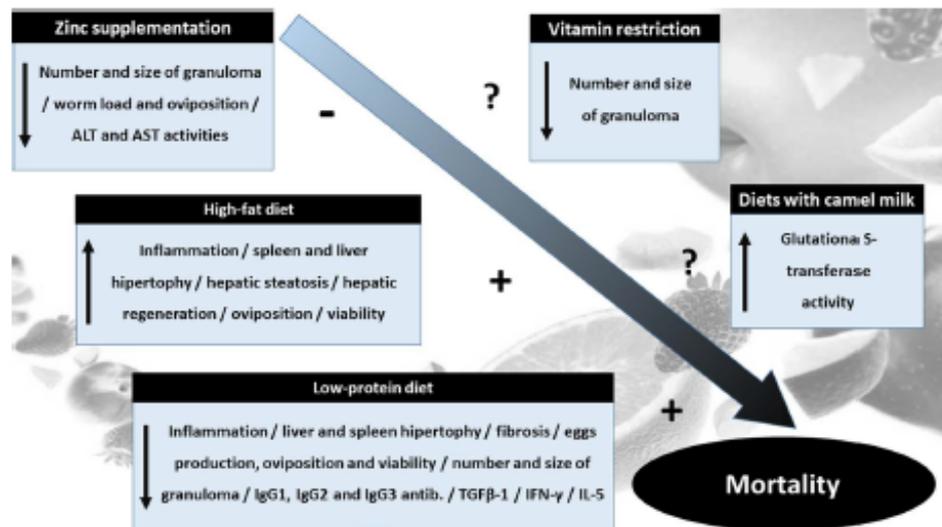


Fig. 2. *In vivo* preclinical evidence of the impact of different dietary strategies on parasitological, immunological, biochemical and histopathological parameters in animals infected by *Schistosoma mansoni*. The main diagonal arrow indicated the primary measure outcome. Black arrows in each box indicates the effect direction for each accessory outcome. (–) Mitigates and (+) stimulates mortality. (?) Uncertain impact on parasitemia and mortality (insufficient data).

Methodological bias

The reporting bias stratified domains are detailed in online Supplementary Table S5 and summarized in Fig. 3. None of the studies fulfilled all methodological criteria, and the mean quality score of all studies reviewed was $65.43 \pm 7.76\%$. Twelve studies (44.44%) did not reach the mean score (Fig. 3). Considering individually each criterion analysed, none of the studies reported information such as experimental blindness, a rational basis for the number of animals and details of the sample size calculation. Criteria such as control of dietary availability during the experiment, use of standardized diet guidelines, husbandry conditions, details of animals' allocation to experimental groups, records of food intake, number of animals in each group included in each analysis, information regarding mortality, comments on the study limitations and comments on how the findings are likely to translate to other species or relevance to human biology were addressed in <50% of all studies. Six or fewer studies reported the control of dietary availability at baseline or during the experimental period (21.4%, $n = 6$), use of standardized diet guidelines (14.3%, $n = 4$), details on animals' allocation (i.e. randomization) ($n = 3$, 10.7%) and information regarding animals' mortality (21.4%, $n = 6$) (online Supplementary Table S5).

Discussion

Our findings indicate that the studies investigating the impacts of dietary strategies on schistosomiasis *mansoni* were concentrated in endemic areas, especially in South American and African countries. The marked concentration of studies in developing areas was expected and coherent with the epidemiological profile of schistosomiasis and malnutrition (Munisi *et al.* 2016). In endemic countries, schistosomiasis and malnutrition are closely correlated to high morbidity and mortality rates (Corbett *et al.* 1992; Adenowo *et al.* 2015). Furthermore, the overlapping of *Schistosoma* infections and malnutrition is an objective reality in these areas (Ferreira and Coutinho, 1999; Coutinho *et al.* 2010). Thus, investigations on the impact of the interaction between infection and malnutrition have major relevance, which is reinforced by the current national and international initiatives to control

schistosomiasis transmission and malnutrition persistence in Latin-American (Weisstaub *et al.* 2014; Zoni *et al.* 2016) and African countries (Munisi *et al.* 2016; Mitra and Mawson, 2017; WHO, 2017).

Although the studies included in this review show wide methodological variability, some points of convergence were observed. Mice were the main animal model used for the study of schistosomiasis. Mice are highly susceptible to *S. mansoni* and develop similar pathophysiological characteristics to human infection, including systemic immunological response, granulomatous inflammation and portal hypertension (Abdul-Ghani and Hassan, 2010; Machado-Silva *et al.* 2010; Alves *et al.* 2016). These animals present low cost, fast reproduction cycles, and easy maintenance and handling in the laboratory (Moran *et al.* 2016). For similar reasons, mice are organisms systematically applied in studies involving dietary interventions (Coutinho, 2004; Oliveira *et al.* 2004). In addition to reducing costs by preparing reduced volumes of experimental diets compared with studies with larger animals (e.g. rats, rabbits and dogs), the effect of experimental diets usually manifests faster in relation to the human condition, allowing more controlled and careful analysis of the outcome measures, including alimentary safety (Vandamme, 2015; Chalvon-Demersay *et al.* 2017).

Despite the advantages of mice models, the host's genetic background should be considered to interpret the preclinical findings (Festing, 2016). In most studies included in the review, outbred mice (*Swiss* lineage) were used. There is evidence that the broad genetic variability of different mice species and lineages is closely correlated to host susceptibility and/or resistance to infection (Dajem *et al.* 2008; Alves *et al.* 2016). Genetic background is equally relevant in animal models exposed to dietary interventions, especially considering the heterogeneity in metabolic phenotypes (Machado-Silva *et al.* 2005; Van de Vijver *et al.* 2006). Due to genotype homogeneity and similar phenotypic characteristics, inbred mice present advantages over outbred animals, such as better experimental control and reproducibility of pathological manifestations, especially the immunological responses that mediate host-pathogen interactions (Pérez *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2017). However, outbred mice strains remain highly relevant to investigate human infections, especially considering the genetic

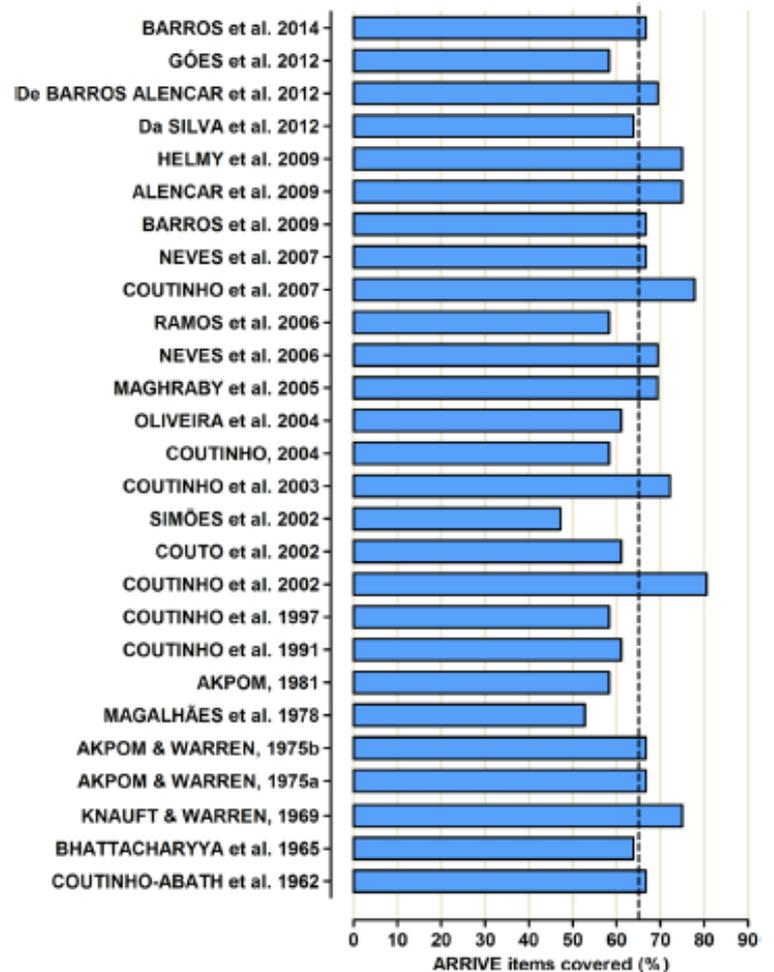


Fig. 3. Analysis of methodological bias (reporting quality) stratified by domains for each study included in the review. The dotted line indicated the mean quality score (%). The complete bias analysis stratified by domains and items evaluated is presented in online Supplementary Table S5.

variability of humans and the broad spectrum of pathological manifestations observed in clinical settings (Coutinho *et al.* 2003; Goes *et al.* 2012).

In this review, while female animals were often used in models testing hyperlipidic diets (Alencar *et al.* 2009, 2012; Da Silva *et al.* 2012), males were used mainly to investigate dietary strategies based on protein manipulation (Couto *et al.* 2002; Ramos *et al.* 2006; Coutinho *et al.* 2007). Female mice have been used since they exhibit a more resistant phenotype against metabolic changes induced by the lipid-rich diet compared with males (Pettersson *et al.* 2012). Under hyperlipidic diet exposition, female mice expanded Treg cell population and develop an anti-inflammatory environment in the intra-abdominal adipose tissue, whereas males manifest early adipose tissue inflammation, glucose intolerance, pancreatic islet hypertrophy and peripheral insulin resistance (Pettersson *et al.* 2012). In murine *S. mansoni* infections, it appears that female mice develop a higher burden of worms and present higher mortality than male mice (Eloi-Santos *et al.* 1992). Apparently, this reduced susceptibility to infection in males is related to high testosterone levels, which attenuates the development of immature schistosomules (Nakazawa *et al.* 1997). However, the relationship between sex hormones and *S. mansoni* infection is poorly understood, requiring further investigations. As observed in this review, use of a standardized animal sex is a valuable methodological strategy to reduce the variability in outcome measures, with direct impact on the internal (cause-

effect relationship) and external (generalizability) validity of pre-clinical research (Coutinho *et al.* 2003).

Animals of various ages and weights were used in the experimental models. However, this information was often under-reported, hindering the studies' reproducibility. Most studies used young animals (about 21 days and 15 g). Animals' age exerts important influence on host metabolism (Korou *et al.* 2013) and response to infectious diseases (Colditz *et al.* 1996; Yole *et al.* 2006). There is evidence of an age-dependent susceptibility to metabolic diseases induced by environmental factors, including diet composition (Korou *et al.* 2013). Considering that very young animals do not achieve complete metabolic development (Jackson *et al.* 2017) and that very old animals exhibit accumulation of metabolic disturbances (Goldsworthy and Potter, 2014), animals of extreme ages should be used with caution, especially in cases in which the impact of age is objectively analysed (Korou *et al.* 2013). In young animals, incomplete immunological development hinders pathogen control, favouring pathogen replication, parasitism, organ damage and host mortality (Colditz *et al.* 1996). Conversely, with increasing age the immunological defences become more efficient to resist infection, especially due to the increased population, phenotypical diversity and activity of immune cells (Speziali *et al.* 2010). Thus, it was clearly reported that younger mice in the pre-pubertal period (24–25 days of age) are more susceptible to *S. mansoni* than those in the post-puberty phase (9–15 weeks of age) (Yole *et al.* 2006). In preclinical models

of schistosomiasis, use of young animals is not unrealistic, especially considering that the chronic phase of infection develops over 12–18 weeks after parasite inoculation in mice, a period necessary for granuloma organization and development of liver pathology (Alencar *et al.* 2009). As dietary intervention is also a primary target of analysis, use of younger animals can be more realistic, since the effects of dietary composition can be analysed from well-stabilized schistosomiasis models with minor interference of an intense host response against *S. mansoni* infection, as observed in older animals (Burns, 2004; Speziali *et al.* 2010).

The parasite inoculum and biological characteristics, such as species and isolates, are also related to the severity of infectious diseases, especially due to divergent profiles of infectivity, virulence and pathogenicity (Davies *et al.* 2002). The studies analysed presented a great variability in inoculum size and time of infection, representing an important indicator of heterogeneity among the preclinical models. Clear examples are the studies developed by Bhattacharyya (1965) and Akpom and Warren (1975), in which infections induced by 22 and 450 cercariae were accompanied for 28 and 36 weeks, respectively. Although this variability in dataset determines a negative impact on external validity of the current evidence, the internal validity of the individual studies was preserved, since parasitological and histopathological changes of schistosomiasis was clearly demonstrated in all experimental models reported.

As expected, the studies analysed used heterogeneous *S. mansoni* isolates in the models of schistosomiasis, an aspect related to the wide variability of geographical origins in which these isolates were obtained. There is evidence that *S. mansoni* isolates from the same or different geographic areas may show differences in egg production, immunogenicity and pathogenicity (Saoud, 1966; Shalaby *et al.* 2011). These manifestations are also associated with the genetic variability of each *S. mansoni* isolate, which regulates several factors that determine parasite resistance to host-defence mechanisms (e.g. antioxidant enzymes, heat shock proteins, complement inhibitory proteins) (Inciani and Cesari, 2001; Theron *et al.* 2014). Considering the parasite origin, the Brazilian BH isolate was mainly used, a characteristic aligned with the geographic regions in which the studies were developed (Coutinho *et al.* 2003, 2007; Barros *et al.* 2009, 2014). However, the selection of *S. mansoni* isolates was not restricted to geographic origin, but also coherent with the construction of consistent schistosomiasis models, especially based on classic organ damages such as granulomatous inflammations (Coutinho, 2004; Neves *et al.* 2007).

The preclinical relevance of the BH isolate was reported by Inciani and Cesari (2001), who indicated that this isolate is associated with higher infection rates in mice, effective induction of granulomas, intense *S. mansoni* egg production and elimination through feces (YT and SM isolates). Another study showed that mice infected with the Puerto Rico isolate showed a higher distribution of eggs in the liver than different parasite isolates (BH, SL, Ba and Mw) (Anderson and Cheever, 1972). On the other hand, in a comparative study with the Feira de Santana-BA isolate, the Puerto Rico lineage was also highly relevant to induce schistosomiasis, demonstrating similar results in the number of pulmonary schistosomules, recovery of worms from the portal system, number of eggs per gram of liver and intestine, histopathological lesions and mortality (Andrade and Sadigursky, 1985). Although different *S. mansoni* isolates behave differently in preclinical models, it remains unclear to what extent these patterns are similar in human infections (Cheever *et al.* 2002). Human infections often occur from heterogeneous parasites, inoculum and time of evolution; aspects linked to variable profiles of morbidity and mortality (Abdul-Ghani and Hassan, 2010). Since these aspects are difficult to control in human contexts, preclinical models remain highly relevant to improve understanding of host–

pathogen interaction, as well as the impact of environmental factors on schistosomiasis evolution (Lopes *et al.* 2006).

Considering the dietary strategies investigated, most studies used commercial diets, an aspect potentially related to the high palatability and low cost compared with purified diets (Svendsen *et al.* 2012). However, purified diets are more likely to ensure adequate study reproducibility and macro- and micro-nutrient control (Barnard *et al.* 2009). Thus, diets based on recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN-93) would be the best choice (Reeves *et al.* 1993). Additionally, most studies included in the review applied *ad libitum* dietary intake, which was accompanied by under-reported or questionable monitoring methods. Food intake exerts a relevant impact on outcome measures, since it is directly related to the metabolic load imposed on the animal model (Moraal *et al.* 2012). Thus, more rigorous control of food intake is a relevant strategy to minimize potential experimental bias related to physiological and behavioural factors (Leidy and Campbell, 2011). Adequate dietary intake (quantity and quality) is an important factor in susceptibility to infections (Corbett *et al.* 1992; Calder, 2013; Mekonnen *et al.* 2014; Zapatera *et al.* 2015). Thus, both *S. mansoni* and malnutrition modulate the host's immune system, with direct effect on parasite development and disease progression (Oliveira *et al.* 2004; Neves *et al.* 2006).

Despite the dietary strategy, the studies evaluated mainly the granuloma formation, hepatic fibrosis, parasitic load and mortality. Furthermore, more than half of the studies analysed the impact of protein-restricted diets (5 and 10% of protein) on schistosomiasis. From these protein levels, the research initiatives coherently attempt to simulate the most common dietary deficiencies identified in human populations in endemic areas (Coutinho *et al.* 1991, 2007; Oliveira *et al.* 2004; Ramos *et al.* 2006). In general, the hypoproteic diets investigated attenuated organ damage induced by *S. mansoni* infection, reducing oviposition and egg viability (Akpom and Warren, 1975; Barros *et al.* 2014); parasitic load (Knauft and Warren, 1969; Coutinho *et al.* 1997); size, number and volumetric density of granulomas (Coutinho, 2004; Coutinho *et al.* 2007; Barros *et al.* 2009); liver and spleen hypertrophy, fibrosis and inflammatory infiltrate (Coutinho-Abath *et al.* 1962; Barros *et al.* 2009, 2014). As dietary intake was similar in infected and uninfected groups, the hosts' appetite was not affected by diet manipulation of infection. Thus, protein restriction, but not differences in food intake was potentially related to the pathological findings identified. Interestingly, we clearly identified that despite attenuation in organ damage, infected animals exposed to protein restriction also exhibited higher mortality rates than control animals. As previously suggested (Ferreira and Coutinho, 1999; Coutinho *et al.* 2002; Barros *et al.* 2014), this finding indicated that both infection development and host defences are equally and adversely affected by malnutrition. As infection and malnutrition determine marked organic debility, it is evident that both conditions interact to determine more severe clinical outcomes, especially disproportionately high morbidity and mortality rates (Ferreira and Coutinho, 1999; Barros *et al.* 2014).

Additionally, *S. mansoni*-infected animals treated with hyperlipidic diets (29% lipids) were the second experimental models most investigated. From these models, oviposition, egg viability and accumulation in hepatic tissue (Alencar *et al.* 2009), liver and spleen inflammatory infiltrate (Da Silva *et al.* 2012), hepatosplenomegaly (Alencar *et al.* 2009; Da Silva *et al.* 2012), hepatic steatosis (Neves *et al.* 2006, 2007), serum cholesterol and their fractions (Neves *et al.* 2006, 2007; Alencar *et al.* 2009, 2012) were consistently increased by hyperlipidic diets. Long-term, high-fat diets are associated with negative repercussions on hepatic function, especially due to the development of liver steatosis,

steatohepatitis and fibrosis (Neves *et al.* 2006, 2007; Picchi *et al.* 2011). Previous studies indicate that high-fat diets reduced immunocompetence by impairing lymphocytes' responsivity against microbial antigens (Crevel *et al.* 1992; Strandberg *et al.* 2009). Impairment of innate immune functions in mice fed a high-fat diet was also reported as an important cause of increased mortality during sepsis. In these animals, aside from exacerbated production of the pro-inflammatory cytokine IL-1 and increased levels of macrophages in adipose tissue, the proportion and function of granulocytes and production of reactive oxygen species were reduced (Strandberg *et al.* 2009). Although disturbances in innate and acquired immunological mechanisms are potentially related to increased tissue damage and mortality rates in schistosomiasis, the extent to which high-fat diets modulate the immune response and reduce host resistance to *S. mansoni* infection is still unclear, requiring further investigations.

Additional diet models based on carbohydrate, zinc and milk supplementation as well as vitamin restriction were also investigated. From a single study, the animals submitted to a high-sugar diet showed an increased parasitic load and number of granulomas (Magalhães *et al.* 1978). Conversely, zinc supplementation reduced the number and size of granulomas, parasitic load, and AST and ALT activities in serum, indicating lower severity of liver damage (Helmy *et al.* 2009). Similarly, diets containing camel milk caused reduction in parasitic load and increased glutathione S-transferase activity (Maghraby *et al.* 2005). Due to the restricted number of studies, the high variability of experimental designs, and the important sources of methodological bias identified (e.g. absence of experimental blindness, randomization, standardized diet guidelines and control of diet intake), the preclinical evidence for these diets is still fragile and inconclusive. As these studies investigated a limited number of measure outcomes, such as parasitic load, mortality and histopathological damage, the mechanistic basis relating diet and schistosomiasis was not addressed. Thus, more comprehensive and controlled studies are required to elucidate the real impact of carbohydrates, minerals and vitamins on *S. mansoni* infection.

In clinical and preclinical studies, methodological consistency should be considered to properly interpret the evidence available (Landis *et al.* 2013; Bara and Joffe, 2014). Surprisingly, none of the studies analysed fulfilled all methodological criteria, presenting variable methodological scores without a temporal influence (year of publication). This finding indicated that reporting bias has been systematically reproduced through the research process, despite advances in regulatory strategies to stimulate accurate preclinical research (Sena *et al.* 2007; Landis *et al.* 2013). The main neglected aspects were experimental blindness, control of dietary availability and food intake, use of standardized diet guidelines, animals' allocation, number of animals included in each analysis, mortality rates, comments on the study limitations and on generalizability to human biology. All these methodological constructs are essential in preclinical studies, and when under-reported they are important sources of bias that impair the studies' reproducibility and the quality of evidence (Kilkenny *et al.* 2009; Lapchak *et al.* 2013). As these methodological constructs are easily adjustable, designing more consistent and reproducible protocols aligned with acceptable internal validity is a feasible task in future research initiatives. For this purpose, there are several guidelines on the experimental design and the main aspects that should be reported when animal research data are publicly disclosed, such as the Approach Collaborative for Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies (CAMARADES; www.camarades.info) and the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE; www.SYRCLE.nl).

Our findings indicate that the research initiatives relating dietary composition and schistosomiasis were originated mainly from

poor endemic counties, in which *S. mansoni* infection and malnutrition are objective realities with broad socioeconomic impact. In general, although hypoproteic diets attenuate parasitic load and granulomatous inflammation, low protein content was also associated to higher mortality rates. Conversely, hyperlipidic diets and *S. mansoni* infection exhibit a synergistic interaction, potentiating organ damage and mortality rates, which are closely correlated with intense steatohepatitis, parasitic load and granulomatous inflammation. Although high-sugar diets and vitamin restriction potentiate and zinc supplementation attenuates *S. mansoni* infection, the current evidence for these diets is inconclusive, since it is based on just a few studies with limited methodological adequacy. Although the studies adopt consistent infection models in mice to report results from dietary strategies, report quality analysis has suggested that current evidence is at high risk of bias. The incomplete characterization of animal models, experimental groups, diet composition and treatment protocols, outcome measures, and mechanistic approaches were the main sources of bias. Together with these limitations, the methodological heterogeneity in studies on the same dietary strategy compromises the external validity of the evidence, making it difficult to translate animal data into human context. We hope that our critical analysis can help expedite preclinical research and reduce methodological bias, thereby improving the reliability and generalizability of further research initiatives in this neglected area.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182018000057>.

Financial support. This work was supported by the Brazilian agencies 'Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)' and 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)' and Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde - Universidade Federal de Aléneas.

References

- Abdul-ghani RA and Hassan AA (2010) Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies. *Parasitology Research* 107, 1–8.
- Adenowo AF, Oyinloye BE, Ogunyinka BI and Kappo AP (2015) Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 19, 196–205.
- Alpom CA and Warren KS (1975) Calorie and protein malnutrition in chronic murine schistosomiasis mansoni: effect on the parasite and the host. *Journal of Infectious Diseases* 132, 6–14.
- Alencar AC, Neves RH, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Gomes DC and Machado-Silva JR (2009) High fat diet has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 608–613.
- Alencar AC, Neves RH, De Oliveira AV and Machado-Silva JR (2012) Changes in the small intestine of *Schistosoma mansoni* infected mice fed a high-fat diet. *Parasitology* 139, 716–725.
- Alves CC, Araujo N, Cassali GD and Fonseca CT (2016) Parasitological, pathological and immunological parameters associated with *Schistosoma mansoni* infection and reinfection in BALB/c and C57BL/6 mice. *Journal of Parasitology* 102, 336–341.
- Anderson LA and Cheever AW (1972) Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Bulletin of the World Health Organization* 46, 233–242.
- Andrade ZA and Sadigursky M (1985) A comparative study of the Feira de Santana (Bahia) and Porto Rico strains of *Schistosoma mansoni* in the experimental infection of mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80, 37–40.
- Balen J, Liu Z-C, McManus DP, Raso G, Utzinger J, Xiao S-Y, Yu D-B, Zhao Z-Y and Li Y-S (2013) Health access livelihood framework reveals potential barriers in the control of schistosomiasis in the Dongting Lake area of Hunan Province, China. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2350.
- Bara M and Joffe AR (2014) The methodological quality of animal research in critical care: the public face of science. *Annals of Intensive Care* 4, 41–49.

- Barnard DE, Lewis SM, Teter BB and Thigpen JE (2009) Open- and closed-formula laboratory animal diets and their importance to research. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 48, 709–713.
- Barros AF, Oliveira SA, Carvalho CL, Silva FL, de Souza VCA, da Silva AL, de Araujo RE, Souza BSF, Soares MBP, Costa VMA and de Coutinho EM (2014) Low transformation growth factor- β 1 production and collagen synthesis correlate with the lack of hepatic periportal fibrosis development in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 210–219.
- Barros LA, Biolchini CL and Neves RH (2009) Effect of praziquantel administration on hepatic stereology of mice infected with *Schistosoma mansoni* and fed a low-protein diet. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42, 812–815.
- Bhattacharyya KK (1965) Low protein diet as a factor in the production of experimental schistosomal hepatic fibrosis. *Journal of Pathology and Bacteriology* 89, 13–21.
- Burns EA (2004) Effects of aging on immune function. *Journal of Nutrition Health and Aging* 8, 9–18.
- Caldler PC (2013) Feeding the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* 72, 299–309.
- Chalvon-demersay T, Blachier F, Tomé D and Blais A (2017) Animal models for the study of the relationships between diet and obesity: a focus on dietary protein and estrogen deficiency. *Frontiers in Nutrition* 4, 1–13.
- Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL and Andrade ZA (2002) Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 917–940.
- Colditz G, Watson DL, Gray GD and Fady SJ (1996) Some relationships between age, immune responsiveness and resistance to parasites in ruminants. *International Journal for Parasitology* 26, 869–877.
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE and King CH (2014) Human schistosomiasis. *Lancet* 383, 2253–2264.
- Corbett EL, Butterworth AE, Fulford AJ, Ouma JH and Sturrock RF (1992) Nutritional status of children with schistosomiasis mansoni in two different areas of Machakos District, Kenya. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86, 266–273.
- Coutinho EM (2004) Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 85–92.
- Coutinho EM, Abath FG, de Freitas LP, Salzano AC, Lapa MA, Campos FS and Melo EB (1991) Liver and serum soluble protein changes and pathomorphology in undernourished mice with acute schistosomiasis mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24, 235–243.
- Coutinho EM, de Souza MM, Silva LM, Cavalcanti CL, de Araújo RE, Barbosa Júnior AA, Cheever AW and Andrade ZA (1997) Pathogenesis of schistosomal ‘pipestem’ fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of ‘pipestem’ fibrosis in mice. *International Journal of Experimental Pathology* 78, 337–342.
- Coutinho EM, Ferreira HS, Assunção ML, Carvalho SL, Oliveira SA and Franca AA (2002) The use of protein hydrolysate improves the protein intestinal absorption in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35, 585–590.
- Coutinho EM, Barros AF, Barbosa A, Oliveira SA, Silva LM, Araújo RE and Andrade ZA (2003) Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 919–925.
- Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araújo RE, Oliveira SA, Luna CF, Barbosa AA and Andrade ZA (2007) Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. *Acta Tropica* 101, 15–24.
- Coutinho EM, de Oliveira SA, de Barros AF, Silva FL and Ramos RP (2010) *Mansoni*’s schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 359–366.
- Coutinho-Abath E, Magalhães Filho A and Barbosa JM (1962) Lesões hepáticas no camundongo albino experimentalmente infestado por *Schistosoma mansoni* e submetido a dietas de diferentes teor proteico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 4, 311–322.
- Couto JL, Ferreira HS, da Rocha DB, Duarte ME, Assunção ML and Coutinho EM (2002) Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35, 601–607.
- Crevel RW, Friend JV, Goodwin BF and Parish WE (1992) High-fat diets and the immune response of C57Bl mice. *British Journal of Nutrition* 67, 17–26.
- Czerwonogrodzka-Senczyzna A, Janusz M, Jeznach-Steinhagen A, Demkow U and Pyrzak B (2016) Nutrition and immune system in children with simple obesity. *Advances in Experimental Medicine and Biology – Neuroscience and Respiration* 878, 49–56.
- Dajem SMB, Mostafa OMS and El-said FG (2008) Susceptibility of two strains of mice to the infection with *Schistosoma mansoni*: parasitological and biochemical studies. *Parasitology Research* 103, 1059–1063.
- Da Silva AM, Corrêa CL, Neves RH and Machado-Silva JR (2012) A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice. *Experimental Parasitology* 132, 193–199.
- Davies CM, Fairbrother E and Webster JP (2002) Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitology* 124, 31–38.
- Eloi-santos S, Olsen NJ, Correa-oliveira R and Collepypw DG (1992) *Schistosoma mansoni* mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Experimental Parasitology* 75, 168–175.
- Ferreira HS and Coutinho EM (1999) Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 93, 437–447.
- Festing MFW (2016) Chapter 1 genetically defined strains in drug development and toxicity testing. *Methods in Molecular Biology* 1438, 1–17.
- GBD 2016 Causes of Death Collaborators (2017) Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, 1151–1210.
- Goes VC, Neves RH, Alencar AC, Oliveira AV, Gomes DC and Machado-Silva JR (2012) Effects of high-fat chow on heart tissue in acute and chronic experimental murine schistosomiasis mansoni. *Parasitology* 139, 1462–1470.
- Goldsworthy ME and Potter PK (2014) Modeling age-related metabolic disorders in the mouse. *Mammalian Genome* 25, 487–496.
- Gryseels B (2012) Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26, 383–397.
- Helmy MMF, Mahmoud SS and Fahmy ZH (2009) *Schistosoma mansoni* effect of dietary zinc supplement on egg granuloma in Swiss mice treated with praziquantel. *Experimental Parasitology* 122, 310–317.
- Hooijmans CR, Tillema A, Løenaars M and Ritskes-Hoitinga M (2010) Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation in PubMed. *Laboratory Animals* 44, 170–175.
- Incari RN and Cesari IM (2001) Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determine the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 87, 131–137.
- Inobaya MT, Olveda RM, Chau TNP, Olveda DU and Ross AGP (2014) Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. *Research and Reports in Tropical Medicine* 5, 65–75.
- Jackson SJ, Andrews N, Ball D, Bellantuono I, Gray J, Hachoumi I, Holmes A, Latham J, Petrie A, Potter P, Rice A, Ritchie A, Stewart M, Strepka C, Yeman M and Chapman K (2017) Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Laboratory Animals* 51, 160–169.
- Jenkins M (2004) Evaluation of methodological search filters – a review. *Health Information & Libraries Journal* 21, 148–163.
- Katona P and Katona-Apte J (2008) The interaction between nutrition and infection. *Clinical Infectious Disease* 46, 1582–1588.
- Kilkenny C, Parsons N, Kadyshewski E, Festing MFW, Cuthill IC, Fry D, Hutton J and Altman DG (2009) Survey of the quality of experimental design, statistical analysis and reporting of research using animals. *PLoS ONE* 4, e7824.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M and Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology* 8, e1000412.
- Knauff RF and Warren KS (1969) The effect of calorie and protein malnutrition on both the parasite and the host in acute murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases* 120, 560–575.
- Korou LA, Doulami IP, Tzanetakou IP, Mikhailidis DP and Perrea DN (2013) The effect of biological age on the metabolic responsiveness of mice fed a high-fat diet. *Laboratory Animals* 47, 241–247.
- Krawinkel MB (2012) Interaction of nutrition and infections globally: an overview. *Annals of Nutrition and Metabolism* 61, 39–45.
- Landis SC, Amara SG, Asadullah K, Austin CP, Bradley EW, Crystal RG, Darnell RB and Robert J (2013) A call for transparent reporting to optimize the predictive value of preclinical research. *Nature* 490, 187–191.

- Lapchak PA, Zhang JH and Noble-hausslein LJ (2013) RIGOR guidelines: escalating STAIR and STEPS for effective translational research. *Translational Stroke Research* 4, 279–285.
- Leidy HJ and Campbell WW (2011) The effect of eating frequency on appetite control and food intake: brief synopsis of controlled feeding studies. *Journal of Nutrition* 141, 154–157.
- Lopes IC, Santos VRC, Souza VLRB and Rodrigues IRC (2006) Histopathological study of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model using the PC (Pará) and LILA (Maranhão) strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 273–277.
- Machado-silva JR, Heisler R, Ormond L, Maria R, De Oliveira F and Carlos A (2005) Do mice genetically selected for resistance to oral tolerance provide selective advantage for *Schistosoma mansoni* infection? *Experimental Parasitology* 111, 1–7.
- Machado-silva JR, Neves RH and Cerqueira E (2010) Hepatic stereology of acute schistosomiasis mansoni infection in C57BL/10 and CBA mice. *Revista de Patologia Tropical* 39, 211–219.
- Magalhães LA, Guaraldo AM, de Carvalho Bastos O, Boschero AC, Piedrabuena AE and Dottaviano EJ (1978) Influência da dieta hiperlipídica e do diabetes aloxânico sobre a vitalidade do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, em camundongos experimentalmente infectados. *Revista de Saúde Pública* 12, 267–276.
- Maghraby AS, Mohamed MA and Abdel-Salam AM (2005) Anti-schistosomal activity of colostrum and mature camel milk on *Schistosoma mansoni* infected mice. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 14, 432–438.
- Mekonnen Z, Meka S, Zeynudin A and Suleman S (2014) *Schistosoma mansoni* infection and undernutrition among school age children in Fincha's sugar estate, rural part of West Ethiopia. *BMC Research Notes* 7, 763.
- Mitra AK and Mawson AR (2017) Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 2, 36.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J and Altman DG, PRISMA Group (2009) Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Medicine* 6, e1000097.
- Moral M, Leenaars PPAM, Arnts H, Smeets K, Savenije BS and Curfs JHAJ (2012) The influence of food restriction versus ad libitum feeding of chow and purified diets on variation in body weight, growth and physiology of female Wistar rats. *Laboratory Animals* 46, 101–107.
- Moran CJ, Ramesh A, Brama PAJ, Byrne JMO, Brien FJO and Levingstone TJ (2016) The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *Journal of Experimental Orthopaedics* 3, 1.
- Munisi DZ, Buza J, Mpolya EA and Kinung'hi SM (2016) *Schistosoma mansoni* infections, undernutrition and anaemia among primary schoolchildren in two onshore villages in Rorya District, North-Western Tanzania. *PLoS ONE* 11, e0167122.
- Nakazawa M, Fantappie MR, Freeman GL Jr., Eloi-Santos S, Olsen NJ, Kovacs WJ, Secor WE and Colley DG (1997) *Schistosoma mansoni* susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Experimental Parasitology* 85, 233–240.
- Negrão-Corrêa D, Fittipaldi JF, Lambertucci JR, Teixeira MM, De Figueiredo Antunes CM and Carneiro M (2014) Association of *Schistosoma mansoni*-specific IgG and IgE antibody production and clinical schistosomiasis status in a rural area of Minas Gerais, Brazil. *PLoS ONE* 9, e88042.
- Neves RH, Alencar AC, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR and Gomes DC (2006) Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 253–260.
- Neves RH, Alencar AC, Costa-Silva M, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR and Gomes DC (2007) Long-term feeding a high-fat diet causes histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. *Experimental Parasitology* 115, 324–332.
- Oliveira SA, Silva LM, Barbosa AA, Ribeiro-dos-Santos R, Coutinho EM, Andrade ZA and Soares MBP (2004) Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 93, 30–35.
- Pereira RM, Green GM, Moreira AM, Chagas PF, Caldas IS, Gonçalves RV and Novas RD (2017) Applicability of plant-based products in the treatment of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* infections: a systematic review of preclinical in vivo evidence. *Parasitology* 144, 1275–1287.
- Pérez L, Vicente B, Blanco-gómez A, Castellanos A, Pérez-Iosada J and Muro A (2014) Identifying phenotypes involved in susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection in F1B6CBA mice. *Acta Parasitologica* 59, 529–539.
- Pettersson US, Waldén TB, Carlsson PO, Jansson I and Philipsson M (2012) Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS ONE* 7, e46057.
- Picchi MG, Mattos AM, Barbosa MR, Duarte CP, Gandini MA, Portari GV and Jordão AA (2011) A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 26, 25–30.
- Pinto-Almeida A, Mendes T, de Oliveira RN, Corrêa SAP, Allegretti SM, Belo S, Tomás A, Aníbal FF, Carrilho E and Afonso A (2016) Morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* PZQ-resistant and -susceptible strains are different in presence of Praziquantel. *Frontiers in Microbiology* 7, 1–11.
- Ramos RP, Costa VMA, Melo CF, Souza VMO, Malagueño E, Coutinho EM, Abath FGC and Montenegro SML (2006) Preliminary results on interleukin-4 and interleukin-10 cytokine production in malnourished, inducible nitric oxide synthase-deficient mice with schistosomiasis mansoni infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 331–332.
- Reeves PG, Nielsen FH and Fuhey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123, 1939–1951.
- Saoud MFA (1966) The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 585–600.
- Sena E, Bart van der Worp H, Howells D and Macleod M (2007) How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? *Trends in Neurosciences* 30, 433–439.
- Shalaby I, Gherbawy Y and Banaja A (2011) Genetic diversity among *Schistosoma mansoni* population in the western region of Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine* 28, 90–101.
- Spezial E, A ranha CHM, Santiago AF and Oliveira RP (2010) Ageing down-modulates liver inflammatory immune responses to schistosome infection in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 71, 240–248.
- Strandberg L, Verdrengh M, Enge M, Andersson N, Amu S, Onnheim K, Benrick A, Brislert M, Bylund J, Bokarewa M, Nilsson S and Jansson JO (2009) Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. *PLoS ONE* 4, e7605.
- Svensden C, Alexander J, Paulsen JE, Knutsen HK, Hjertholm H, Brantsæter AL and Husøy T (2012) The impact of commercial rodent diets on the induction of tumours and flat aberrant crypt foci in the intestine of multiple intestinal neoplasia mice. *Laboratory Animals* 46, 207–214.
- Theron A, Rognon A, Gourbal B and Mitta G (2014) Infection, genetics and evolution multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: a new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infection, Genetics And Evolution* 26, 80–88.
- Vandamme TF (2015) Rodent models for human diseases. *European Journal of Pharmacology* 759, 84–89.
- Van de Vijver KK, Colpaert CG, Jacobs W, Kuypers K, Hokke CH, Deelder M and Van Marck EA (2006) The host's genetic background determines the extent of angiogenesis induced by schistosome egg antigens. *Acta Tropica* 99, 243–251.
- Weisstaub G, Aguilar AM and Uauy R (2014) Treatment and prevention of malnutrition in Latin America: focus on Chile and Bolivia. *Food and Nutrition Bulletin* 35, S39–S46.
- Wilson RA (1990) Leaky livers, portal shunting and immunity to schistosomes. *Parasitology Today* 6(11), 354–358.
- Wilson RA (2009) The saga of schistosome migration and attrition. *Parasitology* 136(12), 1581–1592.
- WHO, World Health Organization (2017) Schistosomiasis. Updated October 2017. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.
- Yole DS, Gikuru SK, Wango EO, Kithome K and Kiarie S (2006) Influence of age of mice on the susceptibility to murine schistosomiasis infection. *African Journal of Health Sciences* 13, 47–54.
- Zapatero B, Prados A, Gómez-Martínez S and Marcos A (2015) Immunonutrition: methodology and applications. *Nutrición Hospitalaria* 31, 145–154.
- Zoni AC, Catalá I and Ault SK (2016) Schistosomiasis prevalence and intensity of infection in Latin America and the Caribbean countries, 1942–2014: a systematic review in the context of a regional elimination goal. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, e0004493.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NA FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença que pode ser causada por seis espécies, tais como *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. guineenses* e *S. intercalatum*, sendo que as de maior relevância médica para o homem são *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (AJIBOLA et al., 2018; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Estima-se uma prevalência mundial de 249 milhões de indivíduos infectados em 78 países e 800 milhões de pessoas moram em áreas endêmicas para a doença. Regiões do Oriente Médio, América do Sul, Sudoeste da Ásia e especialmente África são as regiões do mundo de maior incidência e prevalência de esquistossomose (WHO, 2017; DIAS et al., 2019).

S. mansoni é a espécie responsável pela doença no Brasil, acometendo aproximadamente 2,5 milhões de indivíduos. Os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados e sua prevalência pode estar associada ao baixo desenvolvimento econômico, ou pode estar diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores (KATZ; PEIXOTO, 2000; WHO, 2017; VITORINO et al., 2012).

O parasito requer dois hospedeiros para completar sua evolução: o hospedeiro intermediário, um molusco aquático do gênero *Biomphalaria* e o hospedeiro definitivo, o homem (ALVES et al., 2016). A esquistossomose se desenvolve em humanos em duas fases, aguda e crônica, sendo que a fase aguda é geralmente assintomática e representa uma forma leve com envolvimento hepatointestinal e a fase crônica, quando sintomática, se manifesta como hepatoesplenomegalia e hipertensão portal e é reconhecida como uma forma hepatoesplênica avançada (DIAS et al., 2019; NEVES, 2010).

A fase aguda aparece em torno de 50 dias e dura até cerca de 120 dias após a infecção e que geralmente ocorre antes do aparecimento de ovos nas fezes, tendo um pico 6 a 8 semanas pós-infecção (HAMS; AVIELO; FALLON, 2013). Nessa fase pode ocorrer disseminação de ovos, principalmente na parede do intestino, com áreas de necrose, levando a uma enterocolite aguda e no fígado, provocando a formação de granulomas (GRAY et al., 2011).

A esquistossomose aguda é caracterizada pela presença de numerosos granulomas periovulares em múltiplos órgãos, especialmente no fígado, intestinos e pulmões. Esses granulomas são grandes, com componente predominantemente exsudativo rico em eosinófilos, periferia mal delimitada e necrose periovular frequente (AMARAL et al., 2017).

De forma geral, na fase aguda da esquistossomose, a resposta imune adaptativa durante a fase pré-patente, tem como característica uma alta produção das citocinas IFN- γ , IL-2, e de quimiocinas e uma menor produção de IL-4 e IL-5, ao contrário do que é observado durante a

fase crônica da esquistossomose, a qual é caracterizada por uma baixa produção de IFN- γ e um aumento da produção das citocinas da resposta imune Th2, como a IL-4 e IL-5 (CHUAH et al., 2014).

Geralmente, as pessoas residentes em regiões endêmicas são também expostas a hábitos alimentares inadequados e na tentativa de simular a deficiência alimentar mais comum identificada nessa população, os efeitos de dietas hipoproteicas no desenvolvimento da esquistossomose experimental foram muito estudados (ADENOWO et al., 2015; COUTINHO et al., 1997; COUTINHO et al., 2010; BARROS et al., 2014). O *S. mansoni* e a desnutrição modulam o sistema imune do hospedeiro, com efeito direto sobre o desenvolvimento do parasito e progressão da doença (KATONA; KATONA-APTE, 2008; COUTINHO et al., 2010; DA SILVA et al., 2012).

Devido a implicações éticas, evidências sobre a relação entre esquistossomose e composição da dieta, em humanos, são baseadas principalmente em estudos clínicos-epidemiológicos (MEKONNEN et al., 2014; MUNISI et al., 2016), nos quais o desenho metodológico prejudica o entendimento dos mecanismos patofisiológicos dessa interação. Por outro lado, camundongos são altamente susceptíveis ao *S. mansoni* e desenvolvem características patofisiológicas similares à infecção em humanos, bem como são também utilizados em estudos envolvendo intervenções dietéticas. Dessa forma, os modelos pré-clínicos *in vivo* têm fornecido uma valiosa contribuição no entendimento de como a composição da dieta interfere na patogênese das doenças infecciosas (OLIVEIRA et al., 2004; BARROS et al., 2014).

A ingestão alimentar nutricionalmente ajustada é um requerimento básico para a manutenção de um adequado estado de saúde geral. Há evidências que deficiências de macronutrientes, especialmente proteínas e micronutrientes estão relacionadas ao déficit de crescimento, ao prejuízo no desenvolvimento intelectual, ao aumento da susceptibilidade a doenças e ao risco de morte (CALDER, 2013; CZERWONOGRODZKA-SENCZYNA et al., 2016). Por outro lado, a adequada disponibilidade de macronutrientes e micronutrientes é essencial para o desenvolvimento de células do sistema imune, reconhecimento de antígenos, ativação e expressão de fenótipos efetores celulares e humorais (KRAWINKEL, 2012; CALDER, 2013).

Assim, além dos efeitos de dietas hipoproteicas na esquistossomose experimental, a dieta hiperlipídica também é alvo de pesquisas (ALENCAR et al., 2009; ALENCAR et al., 2012; DA SILVA et al., 2012). Outras estratégias dietéticas como o aumento do teor de açúcar, restrição de vitaminas e suplementação de zinco foram menos estudadas na esquistossomose

(MAGALHÃES et al., 1978; AKPOM; WARREN, 1975; HELMY et al., 2009). Independentemente da dieta utilizada na esquistossomose experimental, os estudos avaliaram principalmente a formação do granuloma, a fibrose hepática, a carga parasitária e a mortalidade (MARQUES et al., 2018).

Diante do exposto, este capítulo aborda o efeito da dieta hiperproteica na fase aguda da esquistossomose experimental, em camundongos, principalmente no desenvolvimento de granulomas hepáticos e no perfil imunológico. Como este tipo de dieta foi menos estudado, busca-se elucidar se existe interação entre a infecção e a dieta e o quanto essa interação pode modificar a patogênese nas infecções por *S. mansoni*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da dieta hiperproteica na fase aguda da esquistossomose experimental em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar o efeito da dieta hiperproteica no perfil de crescimento corporal dos camundongos não infectados e infectados por *S. mansoni*.
- b) comparar a digestibilidade da dieta hiperproteica em camundongos não infectados e infectados por *S. mansoni*.
- c) investigar a distribuição de ovos de *S. mansoni* nas fezes, no fígado e no intestino dos camundongos.
- d) analisar o impacto da dieta hiperproteica no remodelamento microestrutural hepático e intestinal dos camundongos infectados por *S. mansoni*.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Quarenta camundongos *Swiss* machos (n=40), com três a quatro semanas de idade e pesando de 10 a 15 g foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e mantidos sob condições padronizadas de iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h/12h), temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UNIFAL-MG. Os camundongos foram alojados em caixas de polipropileno com tampas de tela em aço inoxidável com cinco animais em cada caixa.

3.2 INFECCÃO POR *S. mansoni*

Os animais foram infectados por via subcutânea com 25 cercárias de *S. mansoni* cepa LE (Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil) obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou.

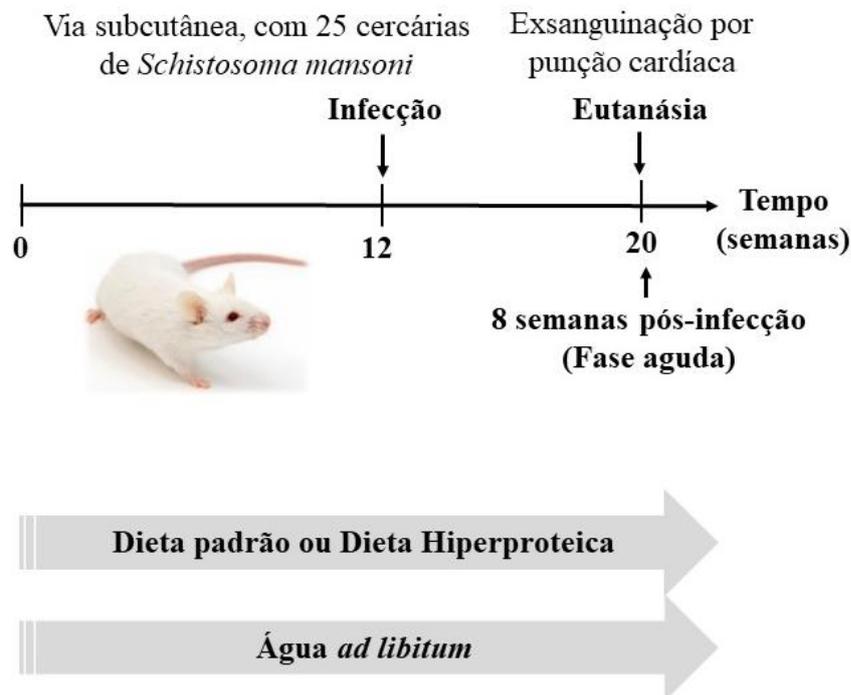
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O experimento teve duração de 20 semanas (FIGURA 1). Durante todo o período os animais receberam água *ad libitum* e dieta padrão e hiperproteica, de forma que inicialmente 20 animais receberam dieta padrão e 20 animais receberam dieta hiperproteica.

Na 12^a semana do experimento, metade dos animais (n=20; grupos DPa-I e HPa-I) foram infectados com *S. mansoni*.

Os camundongos foram eutanasiados oito semanas pós-infecção, fase relativa à infecção aguda (grupos DPa-I, DPa-S, HPa-I e HPa-S).

Figura 1 – Delineamento experimental



Fonte: Da autora.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram randomizados em quatro grupos com 10 animais em cada grupo, assim denominados e caracterizados:

Grupo DPa-I: animais infectados com *S. mansoni*, com dieta padrão e eutanásia na fase aguda da infecção (8 semanas);

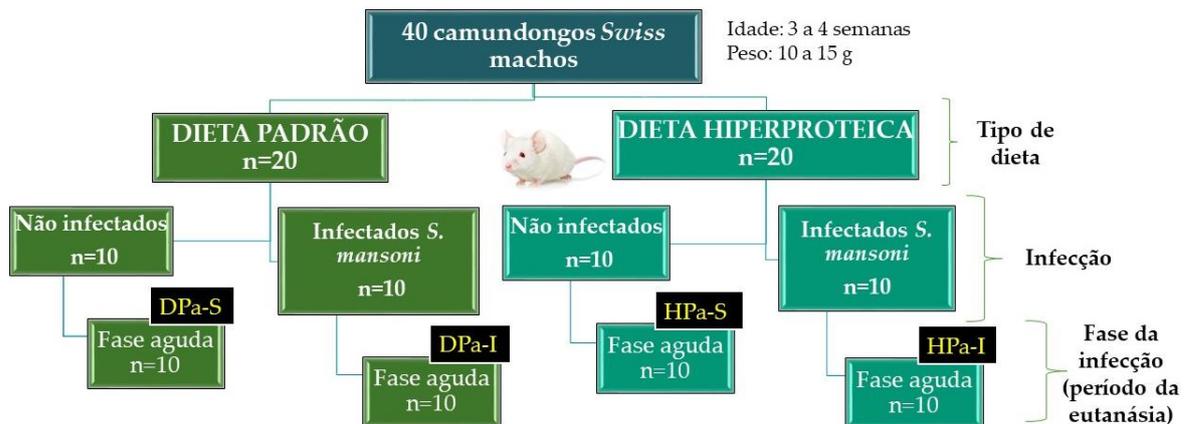
Grupo HPa-I: animais infectados com *S. mansoni*, com dieta hiperproteica e eutanásia na fase aguda da infecção (8 semanas);

Grupo DPa-S: animais não infectados, com dieta padrão e eutanásia na fase representativa de infecção aguda (8 semanas);

Grupo HPa-S: animais não infectados, com dieta hiperproteica e eutanásia na fase representativa de infecção aguda (8 semanas).

A Figura 2 resume as características dos grupos experimentais.

Figura 2 – Fluxograma da randomização dos grupos experimentais e suas características.



Fonte: Da autora.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UNIFAL-MG (Protocolo nº 06/2017) (ANEXO 1).

3.6 DIETAS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas dieta padrão para roedores de laboratório (Nuvilab[®], São Paulo, SP, Brasil) normoproteica (proteína 22,6%) e dieta hiperproteica (proteína 38%). Para a elaboração da dieta hiperproteica considerou-se que a caseína continha, no mínimo, 85% de proteína (REEVES et al., 1993) e que a dieta padrão continha 22 g de proteína para cada 100g de dieta. Assim, para se obter uma dieta hiperproteica com teor de proteína aproximado de 40% (PESTA; SAMUEL, 2014) foi necessário adicionar 24% de caseína à dieta padrão. Após a pesagem nas proporções indicadas, os ingredientes foram homogeneizados e umedecidos para formar uma massa (à moda caseira) utilizada para moldar os *pellets*, os quais foram submetidos à secagem em estufa e congelados até o momento do uso.

A dieta padrão foi disponibilizada pelo Biotério Central da UNIFAL-MG e o ingrediente caseína foi adquirido de fornecedor especializado (Rhooster[®] Indústria e Comércio Ltda). A composição centesimal das dietas está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição centesimal das dietas padrão e hiperproteica

	Padrão (%)	Hiperproteica (%)
Umidade	9,1 ± 0,71	7,16 ± 0,49
Cinzas	8,94 ± 0,30	6,02 ± 0,03
Lipídios	13,0 ± 0,69	10,30 ± 0,26
Proteínas	22,62 ± 0,55	38,38 ± 0,34
Carboidratos totais	46,34 ± 0,85	38,13 ± 0,67
Energia (kcal/100g)	392,84 ± 11,82	398,74 ± 6,35

Fonte: Da autora.

A ingestão de dieta foi controlada com a observação de quantidade ingerida no período de aclimação pelos grupos experimentais, ofertando aproximadamente 10g de dieta hiperproteica e padrão, diariamente, por camundongo, para todos os grupos na forma de *pellets*. Sendo assim, disponibilizava-se 100g de dieta para cada caixa a cada dois dias.

A análise da composição centesimal das rações foi realizada no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UNIFAL-MG, sendo as determinações de umidade, cinzas e lipídeos realizadas de acordo com o método proposto pela AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000). As determinações de proteínas foram realizadas de acordo com o Método de *Kjeldahl* (AOAC, 2000), com amostras em triplicata, utilizando-se o fator 6,25 para a conversão dos teores de nitrogênio em proteínas. Os carboidratos foram determinados por diferença, diminuindo-se a soma dos demais componentes de 100.

Para a determinação do valor energético das dietas, considerou-se que os carboidratos fornecem 4kcal/g, as proteínas 4 kcal/g e os lipídios 9 kcal/g.

3.7 EXAME PARASITOLÓGICO

A confirmação da infecção por *S. mansoni* foi avaliada pela quantificação de ovos na excreção fecal no dia da eutanásia e as fezes foram analisadas em duplicata pela técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). Utilizando-se kit diagnóstico próprio (Kit Helm Teste), para cada amostra de fezes, duas lâminas foram preparadas e examinadas ao

microscópio. Para determinar o número de ovos por grama de fezes, o número médio de ovos encontrados nas lâminas foi multiplicado pela constante 24 (BARBOSA et al., 2017).

3.8 NÚMERO DE OVOS PRESENTES NO FÍGADO E NO INTESTINO

Para obter a contagem do número de ovos presentes no fígado e no intestino dos camundongos infectados com *S. mansoni* realizou-se o processo de digestão tecidual por KOH a 10% para a recuperação dos ovos após a eutanásia dos animais na fase aguda da doença (ALVES et al., 2016). Fragmentos dos órgãos foram pesados e acondicionados em tubos *falcons* com KOH 10% overnight na geladeira. No dia seguinte, os fragmentos foram incubados a 37°C durante um hora e meia em banho-maria e, imediatamente após, os órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 1400 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em salina 0,85%. Esta etapa foi repetida três vezes. Após a última centrifugação, ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de salina 0,85%. A suspensão contendo ovos do parasito foi aplicada em lâminas de vidro, e o número de ovos foi determinado em um microscópio de luz. Foram realizadas três contagens de 200 µL da solução de cada órgão a fim de se determinar o número de ovos por grama de tecido.

3.9 DIGESTIBILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA DA DIETA

Na 20ª semana de experimento, a fim de se determinar a digestibilidade aparente, as dietas foram coradas com índigo carmim (200 mg/100 g de dieta) e foram disponibilizadas aos animais no primeiro e no quarto dia dessa semana (MORAES et al., 2012). As fezes foram coletadas durante quatro dias, sendo que no segundo dia foram coletadas as fezes marcadas com carmim; nos dois dias seguintes todas as fezes e no quinto dia, as fezes não coradas. As fezes coletadas foram armazenadas em sacos plásticos identificados para cada grupo e mantidas em congelador até a análise. As fezes foram secadas em estufa com circulação de ar a 105°C por 24 h, logo após foram resfriadas em dessecador (Marconi®), maceradas, homogeneizadas e pesadas para determinação da concentração de nitrogênio pelo método de *Kjeldahl*, com amostras em triplicata (AOAC, 2000).

A digestibilidade aparente (DA) foi calculada por mensuração do conteúdo de nitrogênio ingerido (NI) e excretado nas fezes (NF) dos grupos-teste, de acordo com a seguinte fórmula: $DA (\%) = (NI - NF) \times 100 / NI$ (COSTA et al., 2014).

3.10 ANÁLISE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR E BIOMETRIA

Para avaliar a eficiência alimentar, foram obtidos os seguintes parâmetros: coeficiente de eficiência alimentar (CEA), peso corporal (g), comprimento naso-anal (cm) e índice de *Lee*.

O CEA representa a relação entre o ganho de peso pela quantidade de alimento consumido: $CEA = (PF - PI) / TA$, em que PF: peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento; PI: peso corporal do animal no início do experimento em gramas, TA: quantidade total de alimento ingerido no período em gramas (CAMPBELL et al., 1963).

A ingestão dietética foi avaliada pelo registro do consumo da dieta por caixa, a cada dois dias, sendo o consumo alimentar obtido através da subtração entre a cota alimentar oferecida e o rejeito verificado dois dias depois (NERY et al., 2011). Levou-se em consideração o número de dias avaliados e o número de animais por caixa para obtenção do consumo alimentar diário e total dos animais. A ingestão energética dos animais foi obtida pelo cálculo do valor calórico desse consumo alimentar dos animais.

A pesagem dos animais foi registrada semanalmente desde o início do experimento para cálculo do ganho de peso: $PF - PI$, onde PF: peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento; PI: peso corporal (g) do animal no início do experimento. Utilizou-se uma balança eletrônica digital (Marte®).

Ao final do experimento, o comprimento naso-anal foi obtido após anestesia do animal, com as medidas registradas em papel milimetrado e o índice de *Lee* foi determinado por meio da raiz cúbica do resultado obtido na divisão do peso corporal (g) pelo comprimento naso-anal (cm) de cada animal: $[^3\sqrt{Peso(g)/CNA(cm)}]$. O Índice de *Lee* é um preditor para obesidade e tem forte correlação com massa gorda, sendo um indicativo do estado nutricional do animal (NOVELLI et al., 2007). Um Índice de *Lee* igual ou inferior a 0,300 indica peso normal e no caso de valores superiores a 0,300, os animais são classificados como acima do peso ideal (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

Os órgãos coletados foram pesados e o peso relativo do fígado e da gordura periepídimal foi calculado por meio da divisão do peso do órgão pelo peso corporal do animal. Além disso, determinou-se o volume do fígado usando o método de imersão descrito por Scherle (SCHERLE, 1970).

3.11 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL

Os camundongos foram eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca após anestesia com administração intraperitoneal de quetamina (0,1 mg/kg de peso corporal) e xilazina (0,05 mg/kg de peso corporal). O sangue foi coletado e colocado em tubos *ependorfs* contendo heparina e centrifugado imediatamente para obtenção do plasma, mantido armazenado a -80 °C até o momento da análise bioquímica e das citocinas. Realizaram-se toracotomia e laparotomia mediana para coleta do fígado e intestino grosso, os quais foram fixados em solução de formaldeído para análises posteriores.

A taxa de mortalidade durante o período experimental foi calculada por meio de registro diário.

3.12 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA

Fragmentos do lóbulo esquerdo do fígado e a primeira porção do intestino grosso de camundongos não-infectados e infectados foram removidos e fixados em solução de formaldeído 4% tamponada neutra. Após a fixação histológica, os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool a partir de 70% até álcool absoluto (99,8%). Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina a 60°C. Para a montagem das lâminas, os cortes microscópicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados, de acordo com as normas do Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG, com hematoxilina / eosina (HE) para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido e análise estereológica e com picrosírius para identificação e análise de fibras colágenas. As imagens das lâminas histológicas foram capturadas com uma câmera fotográfica digital (QColor 3, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz convencional (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens obtidas foram processadas e analisadas por software de captura e análise de imagens *Axion Vision LE* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na análise microscópica do fígado foram investigadas qualitativamente a necrose tecidual, a hipertrofia de hepatócitos, o padrão de organização e distribuição das células do parênquima e do estroma, a distribuição das células intersticiais, bem como a distribuição de

focos inflamatórios, granulomas esquistossomóticos e áreas de fibrose tecidual. A análise microscópica foi realizada em 6 campos histológicos aleatórios para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×), perfazendo uma área total do fígado de $18,5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para cada animal (NOVAES et al., 2013).

3.14 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

O método estereológico foi utilizado para avaliar a amplitude do remodelamento morfológico do parênquima e estroma do fígado (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). A densidade de volume, parâmetro utilizado para medir o percentual da área ocupada pela estrutura de interesse (hepatócitos, tecido conjuntivo) e densidade de número (hepatócitos, células intersticiais, granulomas esquistossomóticos) foram obtidos de acordo com Novaes et al. (2013).

Para estas análises foi usado um sistema de teste com 100 pontos presentes em uma área de teste (A_t) de $31 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ao nível do tecido. A densidade de volume (V_v , %) dos hepatócitos e do tecido conjuntivo foi estimada pela contagem de pontos, de acordo com a seguinte fórmula: $V_v = \Sigma P / P_t$, em que ΣP representa o número de pontos do sistema de teste que incidem sobre a estrutura de interesse e P_t corresponde ao número total de pontos do sistema de teste. A análise estereológica foi realizada com o auxílio do software de análise de imagens Image-Pro Plus 5 (*Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA*) em 6 campos histológicos aleatórios de cortes corados com HE para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×) (NOVAES et al., 2013).

A intensidade do processo inflamatório no fígado foi obtida pela densidade de número de células intersticiais (Q_{Aint}) e de número de hepatócitos (Q_{Ah}). A celularidade tecidual nas áreas remotas ao granuloma foi avaliada em 6 campos histológicos aleatórios de cortes corados em HE com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×), numa área total do fígado de $18,5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ por animal. Para isso, foi aplicado um sistema de teste quadrático (A_t) sobre as imagens histológicas. O número de núcleos celulares na área de teste (Q_{Aint}) foi determinado por meio de software de análise de imagens Image-Pro® plus 5 (*Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA*). O número de núcleos celulares por unidade de área (células / mm^2) foi determinado pela fórmula: $Q_{Aint} = \Sigma_{int} / A_t$, onde Σ_{int} representa o somatório do número de núcleos de células inflamatórias (intersticiais) na área de teste e A_t corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($31 \times 10^3 \mu\text{m}^2$), conforme metodologia de

Caldas et al. (2008 a,b) e Novaes et al. (2013). Procedeu-se da mesma maneira para se determinar a contagem dos núcleos dos hepatócitos.

3.15 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS

Nos animais infectados com *S. mansoni* foi obtido o número e dimensão dos granulomas esquistossomóticos. O estágio evolutivo dos granulomas (exudativos-produtivos ou fibróticos/involutivos) também foi quantificado, diferenciando-se de acordo com uma caracterização morfológica previamente estabelecida (LENZI et al., 1998; ARAÚJO et al., 2019) em cortes de fígado corados pelo corante vermelho picrosírius.

A análise de distribuição total e diferencial do granuloma da esquistossomose hepática foi avaliada pelo método estereológico. Para a análise da densidade do número de granulomas por unidade de área (QAg, n/mm²), foi utilizada a fórmula $QAg = \Sigma g / At$, onde Σg representa somatório do número de granulomas e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($37 \times 10^5 \mu m^2$). A QAg foi estimada a partir de 10 campos histológicos aleatórios de cortes corados com HE para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 5× (ampliação de 50×).

A área dos granulomas e as medidas dos diâmetros menor e maior foram determinadas diretamente por meio da ferramenta de contorno e medidas do programa Axion Vision em objetiva de 20×. Para cada animal foram medidos 10 granulomas e obtida a média do grupo e as medidas foram realizadas apenas nos granulomas em que o ovo de *S. mansoni* foi claramente observado (REIS et al., 2001).

O volume do granuloma foi estimado pelo princípio do esferoide prolato, de acordo com a fórmula: $V = (4/3)\pi a^2 b$, onde a é o diâmetro menor e b é o diâmetro maior de uma estrutura esferoide.

A análise do colágeno dos granulomas hepáticos foi feita a partir de 10 granulomas aleatórios por grupo de animais, em cortes corados com picrosírius, sob microscopia de polarização obtidos com a utilização de lente objetiva de 20×. A análise foi realizada pelo software de análise de imagem, ImageJ (*National Institutes of Health, USA*). As intensidades foram equalizadas usando a ferramenta threshold do programa ImageJ. O Threshold é usado para limitar um objeto de interesse em uma imagem, eliminando os efeitos de background, no qual todos os pixels na imagem que estão abaixo deste limite são convertidos em preto e todos os pixels com valores acima deste limite são convertidos em branco ou vice-versa. A área da foto foi determinada por meio de software de análise de imagens Image-Pro® plus 5 (*Media*

Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA). Para saber a quantidade de colágeno na área histológica foi utilizada a fórmula: $\text{área de colágeno/mm}^2 = [\% \text{ colágeno da imagem} \times \text{dimensão da área da foto utilizada (37 x 10}^{-2} \text{ mm}^2)]/100$.

3.16 ANÁLISE DA CELULARIDADE DA BAINHA DO GRANULOMA

O número de células polimorfonucleares (PMNs – predominantemente neutrófilos) e mononucleares (MNs - macrófagos, linfócitos) foi avaliado na bainha do granuloma. Foram analisadas 6 imagens por lâmina de cada animal com área de $48 \times 10^2 \mu\text{m}^2$, com utilização de lente objetiva de 100 \times , aplicando-se um sistema de teste quadrático (At) sobre as imagens. O número de células (QA) na área de teste foi determinado por meio de software de análise de imagens Image-Pro® plus 5 (*Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA*). O número de núcleos celulares por unidade de área (células/ mm^2) foi determinado pela fórmula: $QA = \Sigma \text{cél} / At$, onde $\Sigma \text{cél}$ representa somatório do número de células polimorfonucleares ou mononucleares na área de teste e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($48 \times 10^2 \mu\text{m}^2$) de acordo com a metodologia encontrada em Caldas et al. (2008a, b) e Novaes et al. (2013).

3.17 MORFOMETRIA INTESTINAL

A espessura das camadas da mucosa (epitélio, mucosa e muscular da mucosa) e da camada muscular (muscular externa e muscular interna) foi determinada diretamente pela ferramenta de medidas do programa *Axion Vision* em objetiva de 20 \times (ampliação de 200 \times), em 6 campos histológicos aleatórios em 4 regiões diferentes (total de 24 medições/animal) de cortes corados com HE, numa área total do intestino de $24,3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. A largura e o comprimento de 15 criptas por corte foram mensurados e as medidas foram realizadas apenas nas criptas em que a base e o ápice foram observadas.

A área de gânglios e o número de células por gânglio foram avaliados nas camadas musculares. Foram analisados 20 gânglios por lâmina de cada animal com área de $59,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, determinando-se a área por meio da ferramenta de contorno do programa *Axion Vision* com lente objetiva de 40 \times . Para determinação do número de células por gânglios por μm^2 , dividiu-se o número de células pela área do seu respectivo gânglio.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram relatados utilizando-se valores de média e erro padrão. A normalidade na distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para a análise de dois fatores (dieta × infecção), os valores de média foram comparados entre os grupos por meio do teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste *Student-Newman-Keuls*. Para a análise unifatorial entre dois grupos, dados paramétricos foram comparados pelo teste t de *student* e dados não paramétricos foram comparados pelo teste Mann-Whitney U. Resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Plot versão 14.0 (*Systat Software Inc.*) e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad-Prism versão 5.0 (*Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA*).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA DIETA NO PERFIL DE CRESCIMENTO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS

Os animais alimentados com dieta hiperproteica apresentaram maior consumo de dieta e ingestão de energia como mostrado na Tabela 2. Assim, em relação ao consumo de dieta, tanto os animais infectados quanto os sadios com dieta hiperproteica consumiram maior quantidade de dieta do que os com dieta padrão ($P < 0,05$). O mesmo ocorreu em relação à ingestão energética, mas esse parâmetro também apresentou diferença quando se comparou os animais infectados e não infectados com a mesma dieta ($P < 0,05$).

A eficiência alimentar foi maior no grupo hiperproteico, considerando o tratamento nos grupos infectados e nos grupos não infectados foi maior com a dieta padrão ($P < 0,05$) com 8 semanas de infecção (TABELA 2). Nesse mesmo parâmetro quando se avaliou o efeito da doença, encontrou-se diferença entre os animais infectados e sadios com os dois tipos de dietas ($P < 0,05$).

O ganho de peso e o índice de *Lee* não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$), mas, ao considerar os pesos e tamanhos corporais dos animais, os camundongos foram considerados com sobrepeso, independente da dieta consumida.

Tabela 2 - Parâmetros biométricos e ingestão dietética dos grupos experimentais infectados/não infectados que receberam dietas padrão/hiperproteica e foram eutanasiados 8 semanas pós-infecção.

Parâmetros	Dieta padrão		Dieta hiperproteica	
	Infectados	Sadios	Infectados	Sadios
Ganho de peso (g/dia)	0,07 ± 0,03 ^{aA}	0,07 ± 0,05 ^{aA}	0,10 ± 0,03 ^{aA}	0,09 ± 0,02 ^{aA}
Consumo de dieta (g/dia)	8,69 ± 0,67 ^{aA}	8,65 ± 0,17 ^{aA}	9,92 ± 0,05 ^{bB}	9,86 ± 0,51 ^{bB}
Ingestão energética (kcal/dia)	35,62 ± 2,73 ^{aA}	35,44 ± 0,68 ^{aB}	39,17 ± 0,22 ^{bA}	38,94 ± 2,02 ^{bB}
CEA (%)	0,89 ± 0,04 ^{aA}	0,98 ± 0,01 ^{aB}	0,96 ± 0,05 ^{bA}	0,89 ± 0,01 ^{bB}
Índice de <i>Lee</i> (g/cm ³)	0,37 ± 0,01 ^{aA}	0,4 ± 0,01 ^{aA}	0,38 ± 0,02 ^{aA}	0,35 ± 0,02 ^{aA}

Fonte: Da autora

Nota: CEA, coeficiente de eficiência alimentar. Médias seguidas de letras minúsculas (a, b) na mesma linha referem-se à dieta padrão e hiperproteica e quando seguidas de letras maiúsculas (A, B) referem-se a infectados e não infectados (sadios). Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.2 DIGESTIBILIDADE DA DIETA HIPERPROTEICA

Para avaliar o percentual de absorção de nitrogênio, o Coeficiente de Digestibilidade Aparente (DA) foi adotado. A Tabela 3 mostra que quando se comparou animais infectados com animais sadios na fase aguda da infecção houve diferença estatística ($P < 0,05$).

Em relação ao nitrogênio ingerido da dieta pelos grupos durante o teste, observou-se que a condição de saúde do animal influenciou na ingestão de nitrogênio ($P < 0,05$), sendo que o grupo sadio mostrou maior ingestão.

Quando se comparou o grupo sadio com o infectado da fase aguda, quanto ao nitrogênio fecal, observou-se diferença entre os grupos, sendo maior a excreção de nitrogênio no grupo infectado ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal e digestibilidade aparente da dieta hiperproteica dos grupos experimentais infectados/não infectados na fase representativa de infecção aguda.

	Infectados	Sadios
NI (g)	$4,73 \pm 0,08^A$	$4,96 \pm 0,07^B$
NF (g)	$0,29 \pm 0,02^A$	$0,25 \pm 0,02^B$
DA (%)	$93,93 \pm 0,47^A$	$95,06 \pm 0,45^B$

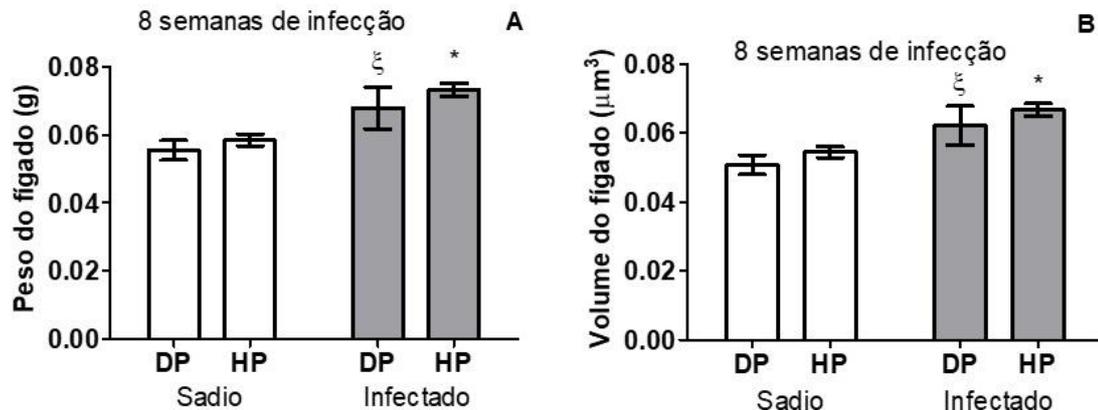
Fonte: Da autora

Nota: NI, nitrogênio ingerido; NF, nitrogênio fecal; DA, coeficiente de digestibilidade aparente. Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha referem-se a infectados e não infectados (sadios). Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Análise teste t student.

4.3 PESO E VOLUME RELATIVO DOS ÓRGÃOS

Os resultados do peso e volume relativo do fígado encontram-se representados na Figura 3. Como observado, os animais infectados com dieta padrão ou hiperproteica apresentaram maior média de peso e de volume do fígado em relação ao grupo sadio com dieta padrão ou hiperproteica, respectivamente ($P < 0,05$).

Figura 3 – Peso (A) e volume (B) relativos do fígado de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sádios e infectados com 8 semanas pós-infecção por *S. mansoni*.

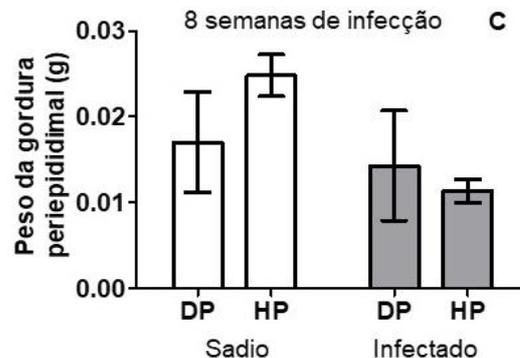


Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm desvio padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=8) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 8 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ^{ns}Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P < 0,05$); ^{*}Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

Em relação à massa relativa de gordura periepidual, não houve diferença significativa oito semanas pós-infecção (FIGURA 4).

Figura 4 - Peso relativo da gordura periepidual de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sádios e infectados com 8 semanas pós-infecção por *S. mansoni*.



Fonte: Da autora.

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=8) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 8 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

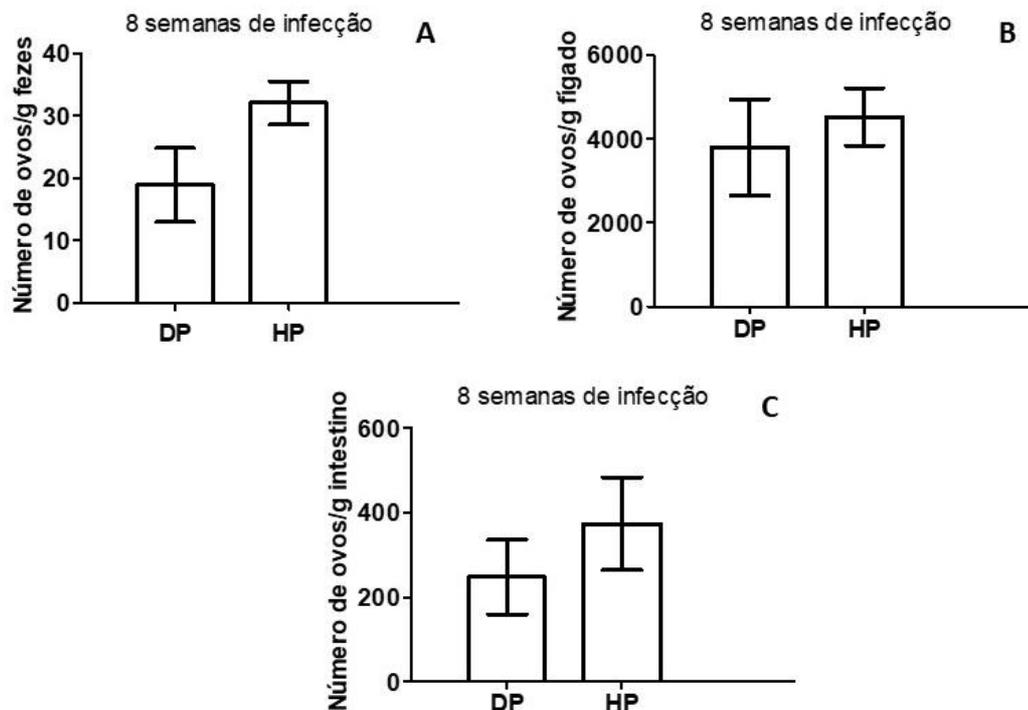
4.4 DISTRIBUIÇÃO DE OVOS DE *S. mansoni* NAS FEZES, NO FÍGADO E NO INTESTINO DOS CAMUNDONGOS

Em relação à eliminação de ovos nas fezes (FIGURA 5A), foram quantificados em média $18,86 \pm 15,75$ ovos/g de fezes nos camundongos DP e $32,00 \pm 10,39$ ovos/g de fezes nos

camundongos HP na fase aguda. Portanto, os animais alimentados com dieta padrão eliminaram uma quantidade de ovos menor que a verificada entre os animais alimentados com dieta hiperproteica, mas essa diferença não foi significativa quando se compararam os grupos ($P>0,05$).

Da mesma forma, houve maior acúmulo de ovos retidos no fígado e no intestino de camundongos infectados por *S. mansoni* com dieta hiperproteica em relação aos animais com dieta padrão (FIGURA 5B e 5C). Essa deposição tecidual de ovos no fígado e no intestino também não apresentou diferença estatística entre os tipos de dieta ($P>0,05$).

Figura 5 - Número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) e no intestino (C) de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da doença.



Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (fase aguda, n=7; fase crônica, n=7) e HP (fase aguda, n=9; fase crônica, n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise teste t student.

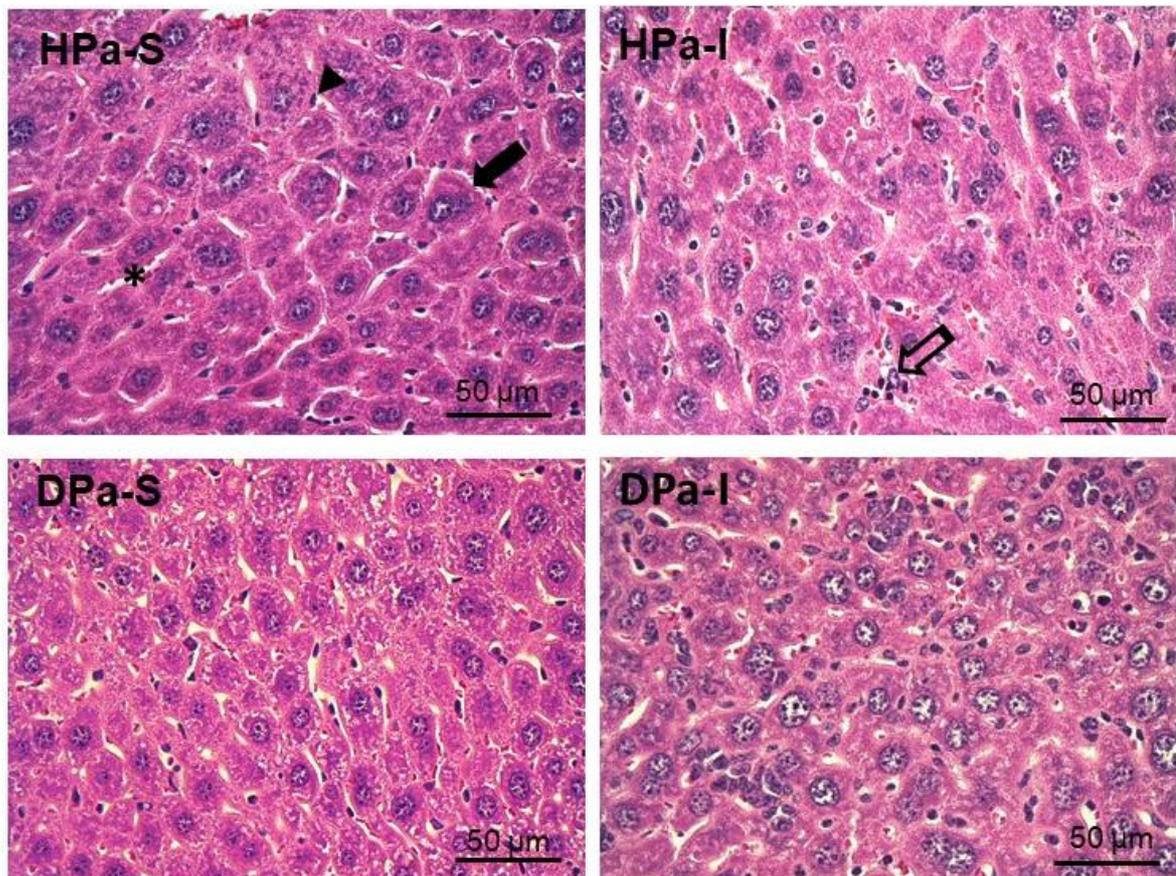
4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO

4.5.1 Análise histopatológica

A análise microscópica do tecido hepático (FIGURA 6) demonstrou que os animais não infectados apresentaram morfologia normal, com cordões de hepatócitos organizados

radialmente em relação à veia centrolobular, capilares sinusóides com aspecto regular distribuídos entre os cordões de hepatócitos, reduzida distribuição de estroma hepático, e escassa celularidade intersticial. Nos animais infectados com dieta hiperproteica, o tecido hepático em área remota aos granulomas mostrou-se próximo do normal, mas apresentou leve dilatação de capilares sinusoidais, reduzida acidofilia citoplasmática e infiltrado inflamatório focal. Os animais infectados com dieta padrão apresentaram maior densidade de hepatócitos, estreitamento do leito capilar, leve expansão conjuntiva, e aumento da celularidade intersticial. Em todos os grupos não foram observadas evidências de alterações nucleares, sendo que o núcleo de hepatócitos apresentou morfologia típica com áreas eucromáticas e heterocromáticas bem definidas e nucléolos evidentes (FIGURA 6).

Figura 6 - Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos alimentados com dieta hiperproteica e padrão, sadios e infectados com *S. mansoni* na fase representativa de infecção aguda (8 semanas de infecção).



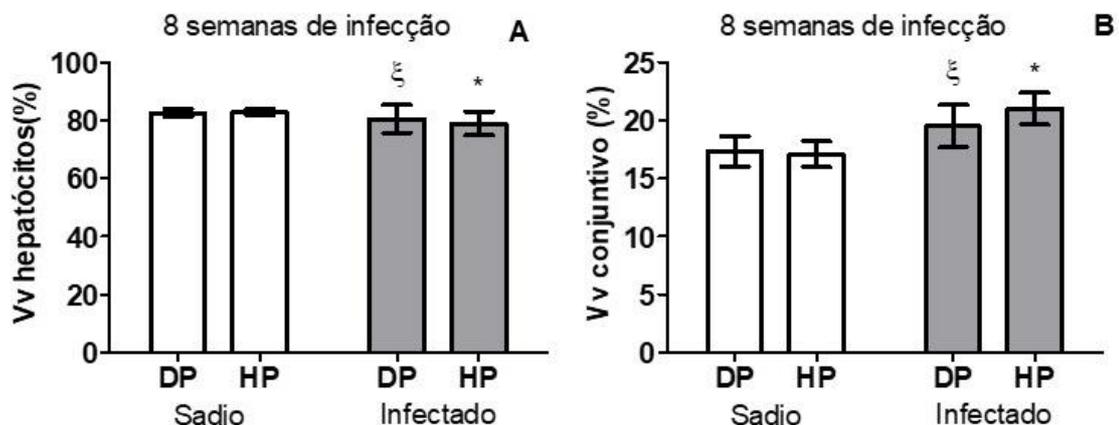
Fonte: Da autora

Nota: (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina). HPa-S, grupo sadio, dieta hiperproteica, fase representativa de infecção aguda; HPa-I, grupo infectado, dieta hiperproteica, fase aguda; DPa-S, grupo sadio, dieta padrão, fase representativa de infecção aguda; DPa-I, grupo infectado, dieta padrão, fase aguda. As imagens dos grupos sadios (HPa-S e DPa-S) evidenciam padrão de organização dos hepatócitos. Seta grossa: hepatócito; asterisco: capilar sinusóide; ponta de seta: núcleo de célula intersticial; seta vazada: infiltrado inflamatório.

4.5.2 Parâmetros estereológicos do tecido hepático

A densidade de volume de hepatócitos (V_v hepatócitos [%]) aumentou significativamente nos animais do grupo sadio com DP quando comparados com os animais do grupo infectado com DP, 8 semanas pós-infecção ($P < 0,05$) como apresentado na Figura 7A. Os animais do grupo sadio com HP se comportaram da mesma forma quando comparados com os animais do grupo infectado com HP ($P < 0,05$). Resultado inverso ocorreu com a densidade de volume de tecido conjuntivo (V_v conjuntivo [%]) (FIGURA 7B), que aumentou significativamente nos animais dos grupos infectados tanto com DP quanto HP, quando comparados aos animais dos grupos sadios com DP e HP, respectivamente, na fase de infecção aguda ($P < 0,05$).

Figura 7 - Densidade de volume (V_v) de hepatócitos (A) e tecido conjuntivo (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas pós-infecção.



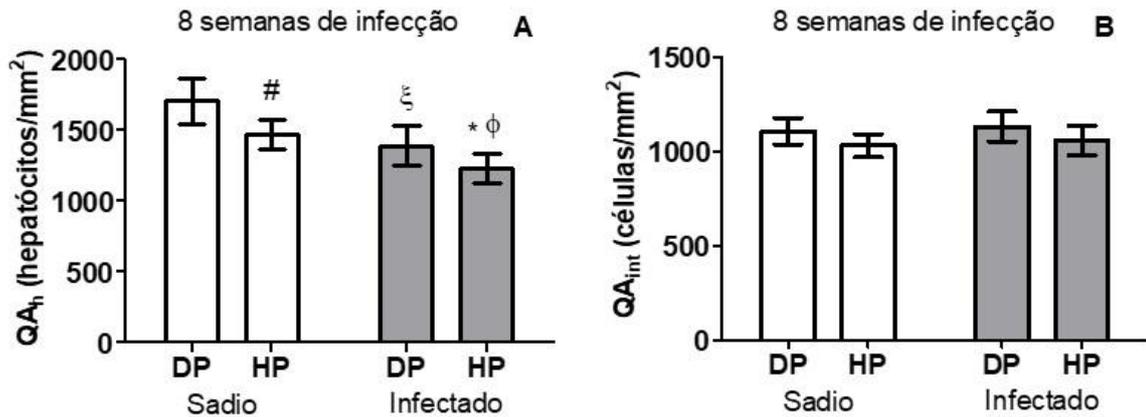
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sadios (DP, n=8; HP, n=8) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 8 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ξ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P < 0,05$). *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

A densidade de número de hepatócitos (QA_h [hepatócitos/mm²]) encontra-se apresentada na Figura 8A. Os animais infectados apresentaram diminuição do número de hepatócitos em relação ao grupo não infectado, sendo que a densidade de número de hepatócitos foi significativamente maior nos dois grupos experimentais (DP e HP) sadios, comparado aos grupos infectados (DP e HP, respectivamente) ($P < 0,05$). Além disso, os animais com dieta padrão apresentaram diferença estatística em relação aos animais com dieta hiperproteica, independente da doença na fase representativa de infecção aguda ($P < 0,05$).

Os animais do grupo infectado apresentaram maior densidade de número de células intersticiais (QA_{int}[células/mm²]) quando comparados aos animais não infectados, os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($P > 0,05$), às 8 semanas de infecção (FIGURA 8B).

Figura 8 - Densidade de número de hepatócitos (QA_h) (A) e células intersticiais (QA_{int}) (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas pós-infecção.



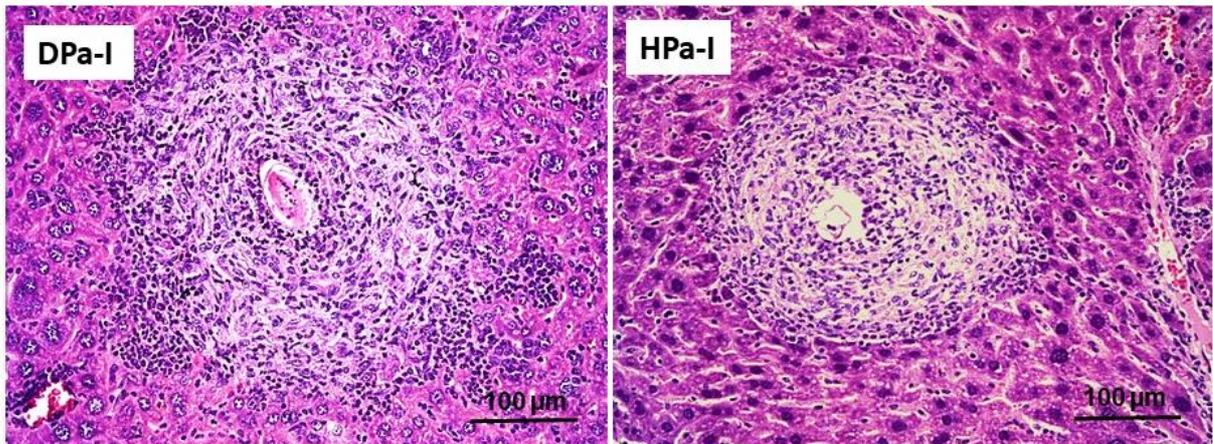
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=8) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 8 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. [§]Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P < 0,05$); ^{*}Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$); ^φDiferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo infectado com dieta hiperproteica ($P < 0,05$); [#]Diferença do grupo sadio com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.5.3 Análise microscópica dos Granulomas hepáticos - coloração HE

A partir da análise microscópica, os camundongos infectados por *S. mansoni* apresentaram predominância de granulomas hepáticos com característica exsudativa-produtiva, caracterizada por granulomas grandes com intensa celularidade e reduzida organização da matriz conjuntiva da bainha do granuloma (FIGURA 9). Os animais com dieta hiperproteica apresentaram bainha granulomatosa bem definida, com intenso infiltrado inflamatório difuso envolvido por abundante matriz amorfa eosinofílica e discreta difusão celular em volta dos limites do granuloma. Animais tratados com dieta padrão apresentaram maior espessamento da bainha granulomatosa, abundante matriz amorfa eosinofílica, intenso infiltrado inflamatório ao redor do ovo de *S. mansoni*, bem como intensa celularidade intersticial perigranulomatosa.

Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase aguda da infecção.



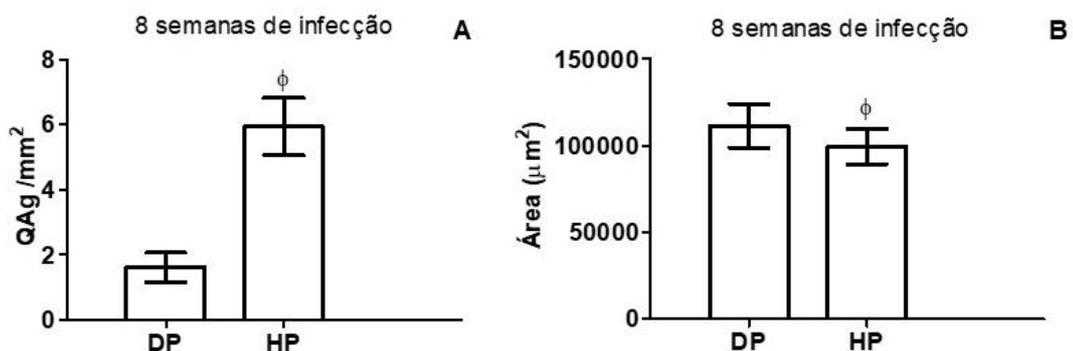
Fonte: Da autora

Nota: (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina). HPa-I, grupo infectado, dieta hiperproteica, fase aguda; DPa-I, grupo infectado, dieta padrão, fase aguda. Os cortes evidenciam granulomas caracterizados pelo ovo do parasito central circundado por uma população densa de células inflamatórias.

4.5.3.1 Análise histomorfométrica dos granulomas

Os resultados da análise dos granulomas dos animais infectados com *S. mansoni* encontram-se apresentados nas Figuras 10 e 11. Como pode se observar na Figura 10A, os animais com dieta hiperproteica apresentaram maior número de granulomas comparado com os animais da mesma fase da infecção com dieta padrão ($P < 0,05$). Quanto à área do granuloma (FIGURA 10B), também foi observada diferença entre os grupos com dieta hiperproteica em relação à dieta padrão ($P < 0,05$), mas a área dos granulomas com dieta padrão foi levemente superior à área do grupo com dieta hiperproteica.

Figura 10 - Densidade de número (QA_g) (A) e área dos granulomas esquistossomóticos (B) no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.

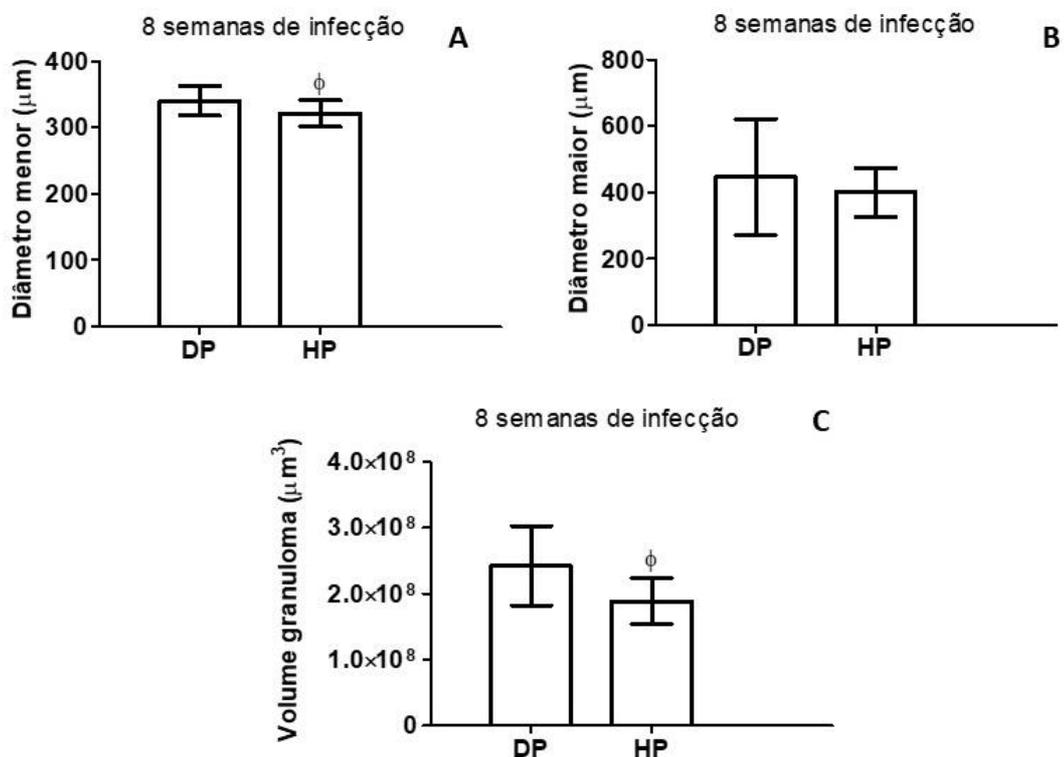


Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ϕ Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo infectado com dieta padrão ($P<0,05$). Análise teste t student.

Em relação aos diâmetros e volume do granuloma (FIGURA 11), quando se comparou os grupos com dieta hiperproteica aos grupos com dieta padrão foram observados menores diâmetros e menor volume do granuloma nos animais com dieta hiperproteica, mas houve diferença estatística apenas no diâmetro menor e no volume do granuloma ($P<0,05$).

Figura 11 – Diâmetro menor (A), diâmetro maior (B) e volume (C) dos granulomas esquistossomóticos no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.



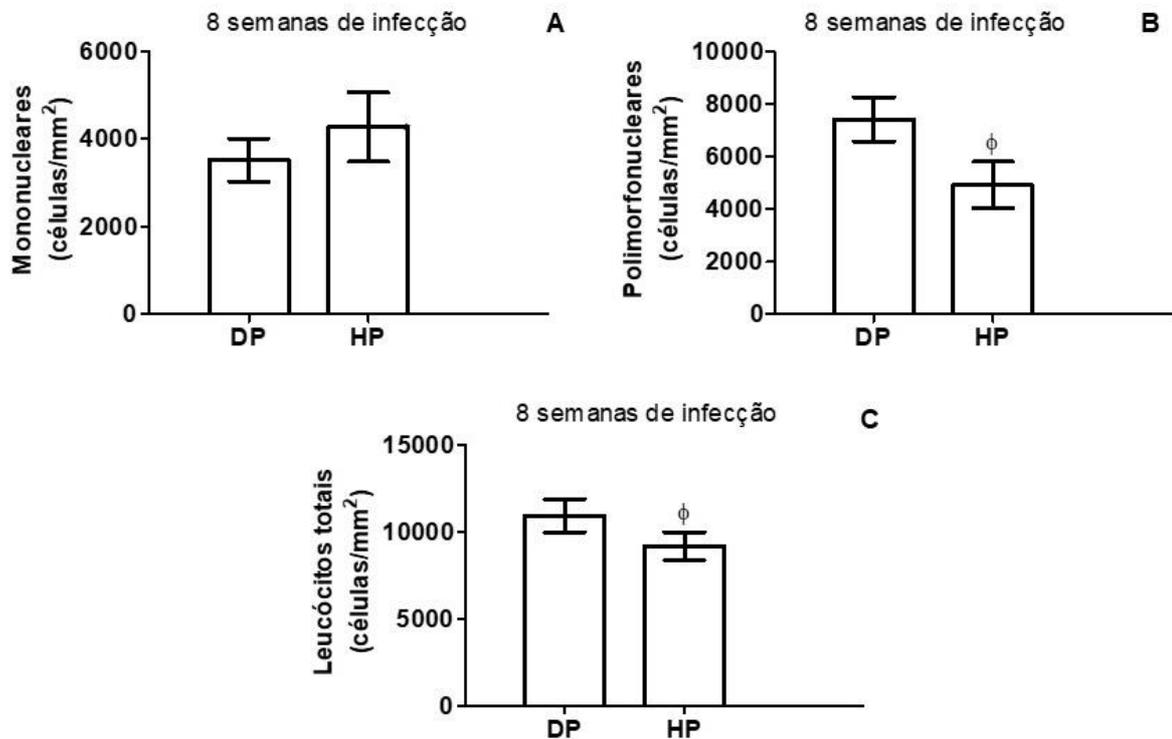
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ϕ Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo infectado com dieta padrão ($P<0,05$). Análise teste t student.

4.5.3.2 Quantificação de celularidade

A contagem das células MN na bainha do granuloma não diferiu estatisticamente ($P>0,05$) quando se comparou o grupo DPa-I e o grupo HPa-I (FIGURA 12A). Em relação às células PMN e leucócitos totais, apresentados nas Figuras 12B e 12C, ambos mostraram-se aumentados no grupo DPa-I em relação ao grupo HPa-I, observando-se diferença significativa entre os grupos ($P<0,05$).

Figura 12 - Contagem do número de células mononucleares (A), polimorfonucleares (B) e leucócitos totais (C) na bainha de granulomas esquistossomóticos do fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.



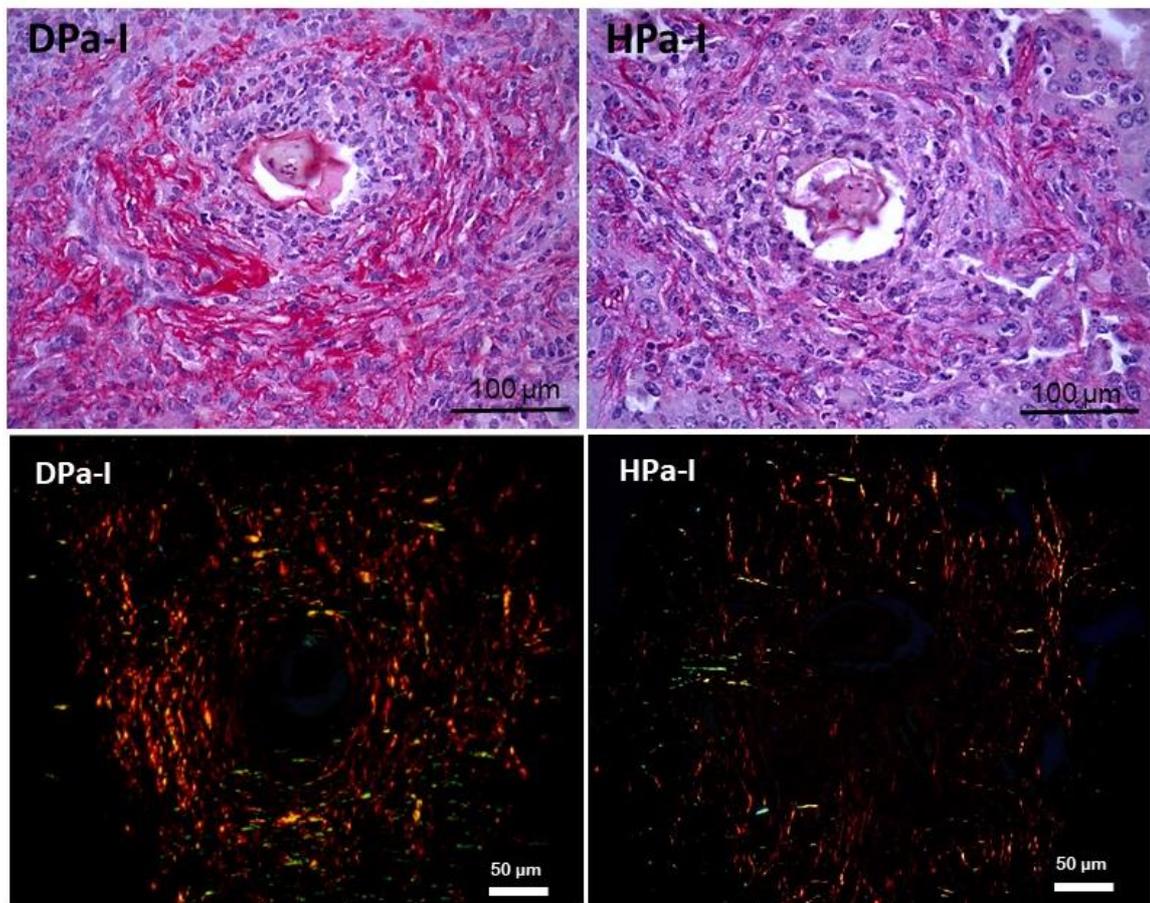
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ^φ Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo infectado com dieta padrão ($P < 0,05$). Análise teste t de *student*.

4.5.4 Análise microscópica dos Granulomas hepáticos – coloração picrosirius

Na Figura 13 pode-se observar granulomas com fibras colágenas evidenciadas em vermelho (microscopia de campo claro) ou em tons brilhantes de vermelho, amarelo ou verde (microscopia de polarização). A reduzida ou moderada deposição, bem como a desorganização das fibras de colágeno reforçam a caracterização granulomatosa exsudativa-produtiva em ambos os grupos infectados. Sob luz polarizada, foi possível identificar a presença de fibras de colágeno em diferentes estágios de maturação. O colágeno mais espesso (tipo I) marcado pela birrefringência laranja e vermelha, e o colágeno mais recente formado por fibras delgadas (tipo III) com birrefringência verde-amarelada (BEDOYA et al., 2016). Os animais com DP apresentaram maior acúmulo de colágeno, especialmente do tipo I, com maior grau de compactação na bainha granulomatosa. Os animais com HP apresentaram um menor acúmulo de fibras colágenas menos compactadas e mais desorganizadas na bainha do granuloma.

Figura 13 - Fotomicrografias representativas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase aguda da infecção.



Fonte: Da autora

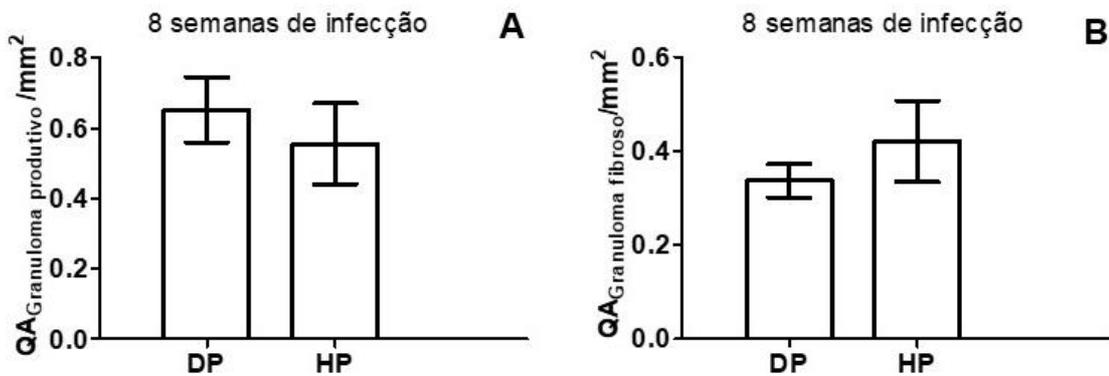
Nota: (Imagens superiores - primeira linha: Microscopia de campo claro, coloração: picrossirius; Imagens inferiores - segunda linha: Microscopia sob luz polarizada, coloração: picrossirius). HPa-I, grupo infectado, dieta hiperproteica, fase aguda; DPa-I, grupo infectado, dieta padrão, fase aguda. Os cortes evidenciam granulomas caracterizados pelo ovo do parasito central circundado por fibras colágenas.

4.5.4.1 Análise histomorfométrica dos granulomas

Em relação ao estágio evolutivo dos granulomas, observou-se na Figura 14A que o número de granulomas produtivos foi ligeiramente menor nos animais com dieta hiperproteica em relação aos animais com dieta padrão, mas não diferiu estatisticamente entre os grupos ($P > 0,05$).

Por outro lado, foi possível observar que o grupo com dieta hiperproteica apresentou maior número de granulomas fibrosos (FIGURA 14B) quando comparou-se as dietas na fase de infecção aguda, mas tal diferença também não foi significativa ($P > 0,05$).

Figura 14 – Distribuição diferencial de granulomas esquistossomóticos - granulomas produtivos (A) e granulomas fibrosos (B) no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.



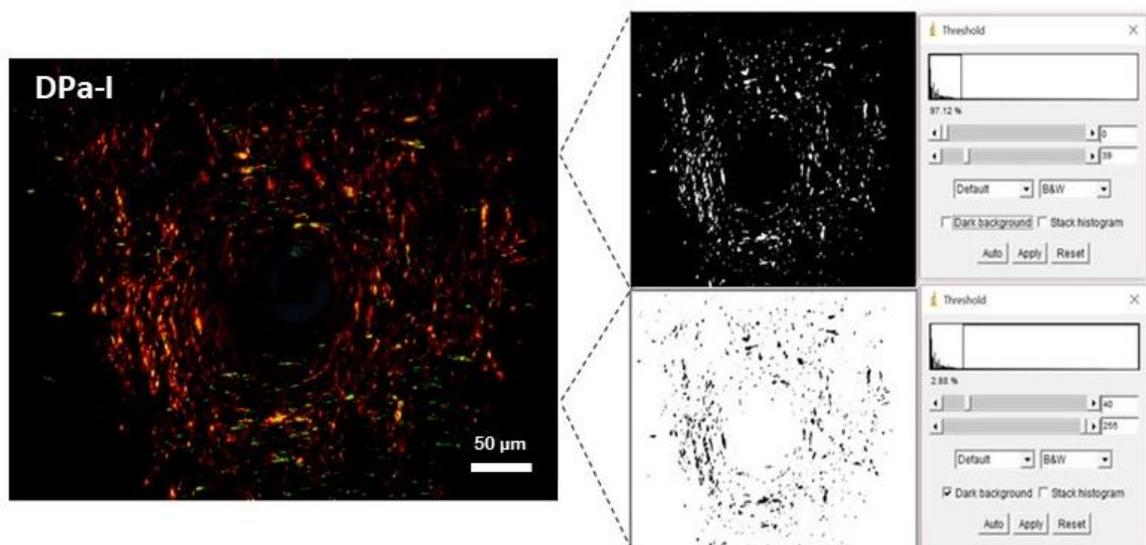
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise teste t student.

4.5.4.2 Quantificação de colágeno

A Figura 15 ilustra como foram obtidos os resultados da quantificação do colágeno a partir das imagens coradas com picrossirius sob luz polarizada.

Figura 15 - Fotomicrografia representativa de granuloma hepático de camundongo infectado com *S. mansoni* alimentado com dieta padrão na fase aguda infecção e suas respectivas imagens no Programa ImageJ.

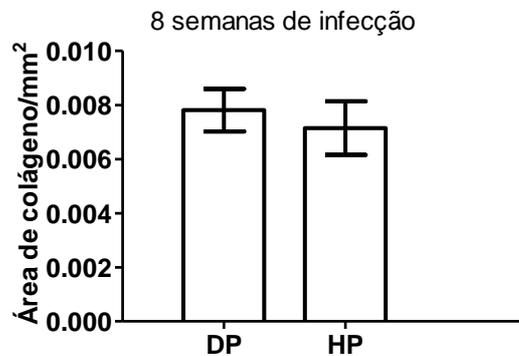


Fonte: Da autora

Nota: (Microscopia de luz polarizada, coloração: picrossirius). DPA-I, grupo infectado, dieta padrão, fase aguda. A figura mostra o conteúdo de colágeno na imagem à direita inferior como pontos pretos em fundo branco.

A distribuição relativa de colágeno por área foi semelhante nos grupos, independente da dieta, não havendo diferença na deposição de colágeno entre os grupos ($P>0,05$) (FIGURA 16).

Figura 16 – Área relativa de colágeno no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase aguda da infecção.



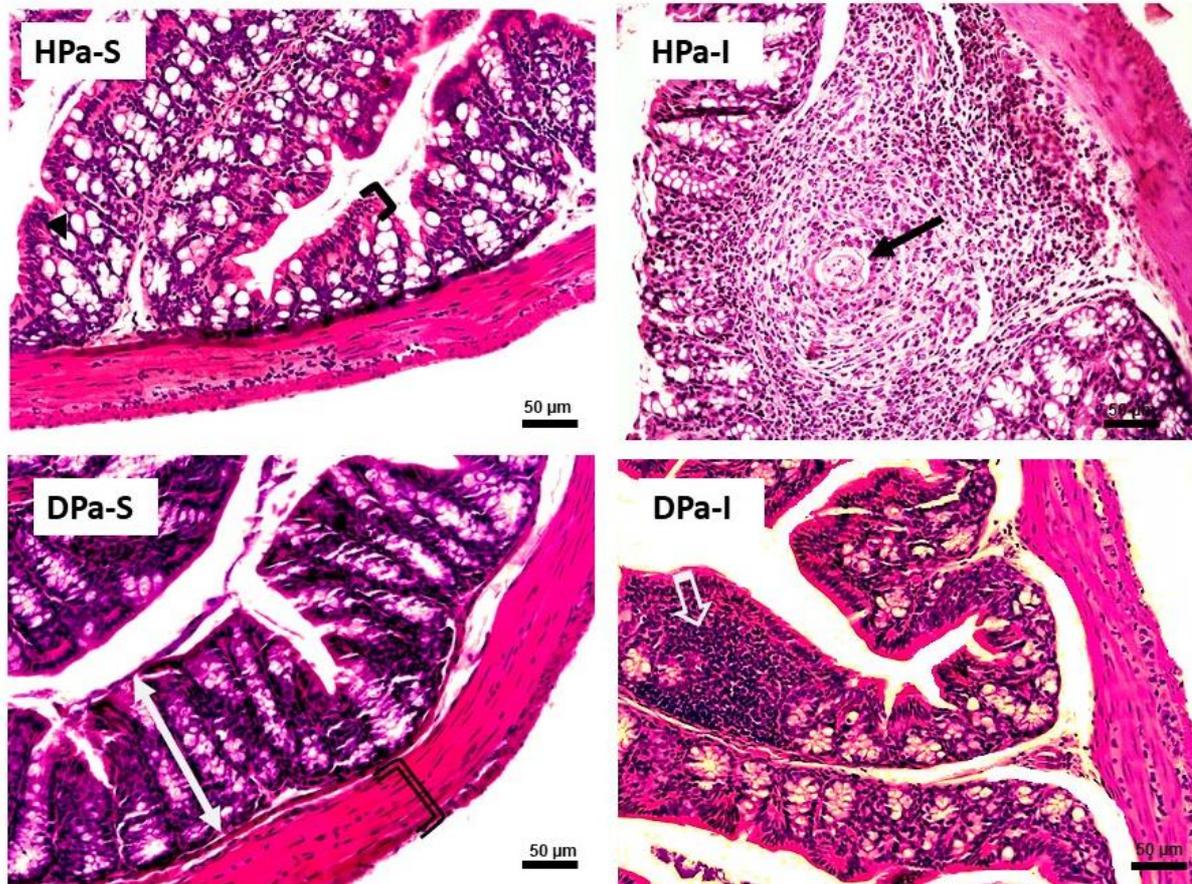
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise teste t student.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO INTESTINO

Em camundongos sadios (HPa-S e DPa-S) foi observada microestrutura intestinal preservada, com característica bem definida das camadas mucosa, submucosa e muscular da parede do intestino grosso. Além disso, o epitélio intestinal apresentou células absortivas e caliciformes evidentes, principalmente distribuídas nas criptas intestinais. Nos animais submetidos à infecção, foi possível observar a presença de ovos e granulomas na mucosa e submucosa do órgão intestinal, além de criptas intestinais menores. Nessas regiões, foi identificado intenso infiltrado inflamatório, o qual também foi observado na camada muscular. Nos animais do grupo DPa-I, a presença de ovos e granulomas não foi evidente. Entretanto, encurtamento de criptas intestinais e marcante infiltrado inflamatório nas camadas mucosa, submucosa e muscular também foi detectado (FIGURA 17).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni* com dieta padrão e hiperproteica na fase aguda da infecção.



Fonte: Da autora

Nota: Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina. HPa-S, grupo sadio, dieta hiperproteica, fase representativa de infecção aguda; HPa-I, grupo infectado, dieta hiperproteica, fase aguda; DPa-S, grupo sadio, dieta padrão, fase representativa de infecção aguda; DPa-I, grupo infectado, dieta padrão, fase aguda. Nos grupos sadios notam-se estruturas intestinais preservadas. Ponta de seta: célula caliciforme; colchete simples: epitélio intestinal; colchete duplo: camada muscular; seta de duas pontas: camada mucosa; seta: ovo de *S. mansoni*; seta vazada: infiltrado inflamatório.

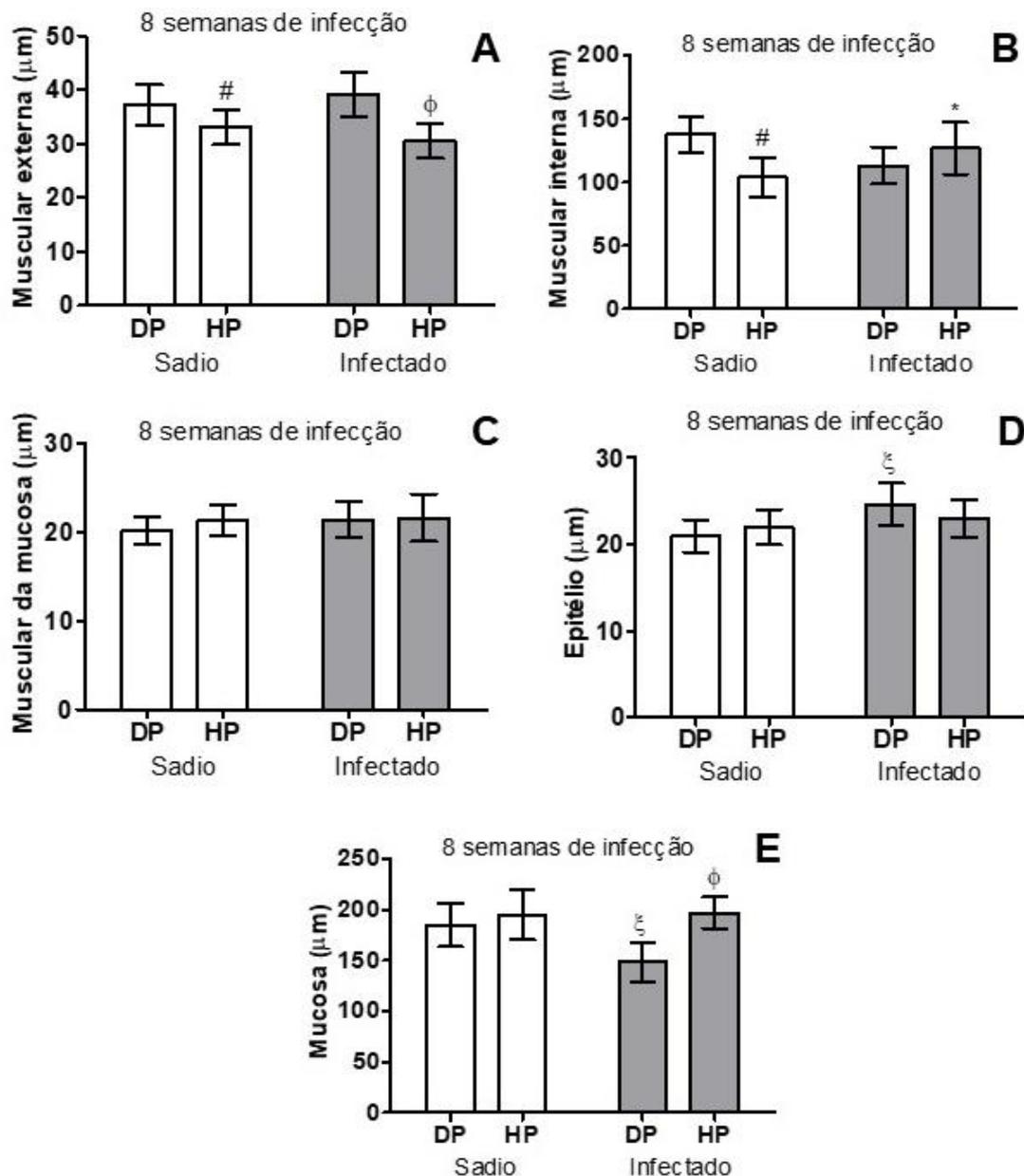
4.6.1 Morfometria do intestino

Como pode se observar nas Figuras 18A e 18B, os animais sadios com dieta hiperproteica apresentaram menor espessura das camadas musculares externa e interna quando comparados com os animais com dieta padrão ($P < 0,05$). Os animais infectados também se comportaram da mesma forma quando se analisou a espessura da camada muscular externa, diferindo estatisticamente entre os animais com dieta padrão e hiperproteica ($P < 0,05$). Entretanto, na espessura da muscular interna a dieta não interferiu no resultado dos animais infectados, sendo que a espessura somente diferiu entre os animais com dieta hiperproteica

(infectados x sadios) ($P < 0,05$). A espessura da muscular da mucosa (FIGURA 18C) foi semelhante entre os grupos e não apresentou diferença estatística.

Os animais do grupo infectado com dieta padrão apresentaram maior espessura do epitélio em relação ao grupo sadio com dieta padrão, os quais apresentaram diferença estatística entre si ($P < 0,05$), às 8 semanas de infecção (FIGURA 18D). Quanto à espessura da mucosa (FIGURA 18E), o mesmo aconteceu entre os animais com dieta padrão ($P < 0,05$). Além disso, o grupo infectado com dieta hiperproteica apresentou espessura maior da mucosa quando se comparou ao grupo infectado com dieta padrão ($P < 0,05$).

Figura 18 – Espessura das camadas da mucosa (epitélio, mucosa e muscular da mucosa) e da camada muscular (muscular externa e muscular interna) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas pós-infecção.

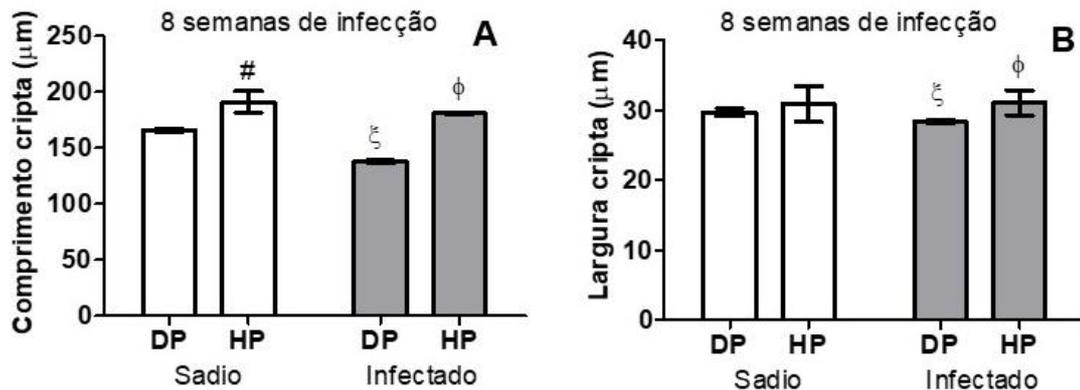


Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ξ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P<0,05$); ϕ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo infectado com dieta hiperproteica ($P<0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P<0,05$); #Diferença do grupo sadio com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P<0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

Como observado na Figura 19A, os animais com dieta hiperproteica infectados ou sádios apresentaram maior média de comprimento de cripta em relação aos animais com dieta padrão, às 8 semanas de infecção ($P<0,05$). Além disso, houve diferença quando se comparou os animais infectados e sádios que receberam dieta padrão, sendo maior no grupo sadio ($P<0,05$). A largura da cripta apresentou as mesmas diferenças, exceto entre os animais sádios que não apresentaram diferença quando se comparou os tipos de dieta ($P>0,05$) (FIGURA 19B).

Figura 19 – Comprimento (A) e largura (B) das criptas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas pós-infecção.



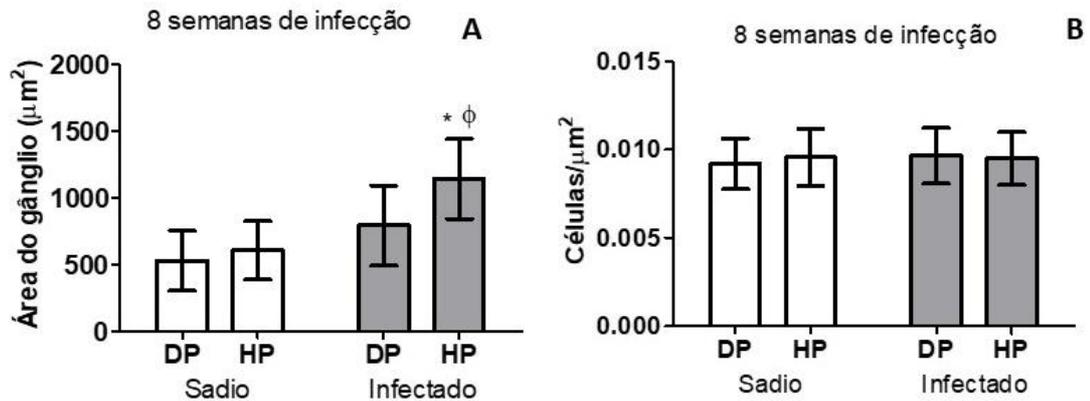
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ξ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P<0,05$); ϕ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo infectado com dieta hiperproteica ($P<0,05$); *Diferença do grupo sadio com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P<0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

A área dos gânglios mioentéricos e o número de células pela área dos gânglios encontram-se apresentados nas Figuras 20A e 20B. Os animais infectados apresentaram aumento da área dos gânglios em relação ao grupo não infectado, sendo que a área foi significativamente maior no grupo experimental infectado com dieta hiperproteica comparado ao grupo infectado com dieta padrão ($P<0,05$). Além disso, a doença impactou na área do gânglio quando se comparou os grupos de animais com dieta hiperproteica, de forma que os animais infectados apresentaram maior medida do que o grupo sadio com a mesma dieta ($P<0,05$). A quantificação de células pela área do gânglio mostrou número semelhante entre os

grupos sádios e infectados, independente da dieta, os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($P>0,05$), às 8 semanas de infecção (FIGURA 20B).

Figura 20 – Área dos gânglios mioentéricos (A) e número de células dos gânglios (B) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 8 semanas pós-infecção.



Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ϕ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo infectado com dieta hiperproteica ($P<0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P<0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.7 MORTALIDADE

A taxa média de mortalidade dos animais foi $15,6 \pm 0,05\%$, não diferindo estatisticamente entre os grupos. Curiosamente, os animais não infectados apresentaram média de mortalidade maior (20%) que os grupos infectados ($11,25 \pm 1,76\%$). Por outro lado, foi possível verificar que os animais alimentados com dieta padrão apresentaram média de mortalidade maior ($16,25 \pm 5,3\%$) que os grupos alimentados com dieta hiperproteica (10%).

Tabela 4 – Taxa de mortalidade

Grupos experimentais	Número de camundongos experimentados	Mortalidade (Eventos/grupo)	Taxa de mortalidade (%)
DPa-I	8	1	12,5
DPa-S	10	2	20,0
HPa-I	10	1	10,0
HPa-S	10	2	20,0

Fonte: Da autora

Nota: DPa-I: animais infectados, dieta padrão e fase aguda; DPa-S: animais sádios, dieta padrão e fase representativa de infecção aguda; HPa-I: animais infectados, dieta hiperproteica, fase aguda; HPa-S: animais sádios, dieta hiperproteica, fase representativa de infecção aguda.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Modelos induzidos por dieta têm se mostrado benéficos para avaliar as mudanças fisiológicas que ocorrem durante a patogênese das doenças. A maioria dos estudos experimentais sobre esquistossomose demonstrou que a relação parasita-hospedeiro pode ser modificada pelo estado nutricional do hospedeiro (MEKONNEN et al., 2014; ADENOWO et al., 2015; GOES et al., 2012; BARROS et al., 2014). Entretanto, o efeito combinado entre a dieta hiperproteica e a esquistossomose na fisiopatologia e na progressão da doença ainda é pouco conhecido (MARQUES et al., 2018).

Os resultados encontrados demonstraram que a dieta hiperproteica não mostrou diferença estatística para ganho de peso e Índice de *Lee*. Esse índice é semelhante ao índice de massa corporal (IMC) em humanos e serve para avaliar o peso do roedor em relação ao seu tamanho corporal, sendo um preditor para obesidade (NOVELLI et al., 2007). Foi possível observar que mesmo não apresentando diferença estatística entre os grupos nesses parâmetros, os camundongos, independentemente da dieta e da condição de saúde, apresentaram sobrepeso na fase representativa de fase aguda. Esse estado nutricional pode refletir a falta de gasto energético diante das condições ambientais controladas em que os animais foram mantidos no laboratório.

Mas, mesmo com peso acima do normal, é possível que não tenha havido diferença no ganho de peso dos animais com dieta hiperproteica ao longo do tratamento porque a infecção por *S. mansoni* pode aumentar o gasto metabólico do hospedeiro, requerendo um maior consumo energético na tentativa de amplificar a resposta imunológica para restringir as lesões teciduais causadas pelos parasitos (COUTINHO et al., 2010; ZAPATERA et al., 2015). Diante disso, os grupos infectados realmente apresentaram maior ingestão energética quando se analisou a interação dos fatores sobre esse dado, mostrando a interferência da doença neste resultado.

O consumo de dieta e a ingestão energética foram maiores nos animais alimentados com dieta hiperproteica, corroborando com o alto coeficiente de eficiência alimentar. Em relação ao consumo diário de dieta, o tratamento influenciou, mas a doença não. Mesmo sabendo-se que a proteína é o macronutriente mais saciável tanto os animais infectados quanto os sadios tiveram maior consumo da dieta hiperproteica, provavelmente por ser a mais palatável (PESTA; SAMUEL, 2014).

De qualquer forma, confirmou-se que o conteúdo proteico disponibilizado aos animais foi aproveitado devido à alta absorção de nitrogênio da dieta obtida. A digestibilidade é

determinada pela fração de nitrogênio ingerido que o animal absorve, sendo que o nitrogênio absorvido é obtido pela diferença do nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes (COSTA et al., 2014). Esperava-se o resultado encontrado, visto que foi oferecida uma dieta hiperproteica utilizando-se a caseína como principal fonte. A caseína apresenta alto valor nutricional comparada a outras fontes proteicas devido ao conteúdo relativamente alto de aminoácidos essenciais e boa digestibilidade (HOFFMAN; FALVO, 2004; DÍAZ-RÚA et al., 2017). Por outro lado, a digestibilidade aparente não leva em conta o nitrogênio excretado nas fezes como resultado de perda endógena da microbiota intestinal ou descamação celular do tubo digestivo, assim o nitrogênio fecal pode estar superestimado porque não foi proveniente apenas da proteína da dieta (COSTA et al., 2014). Liisberg et al. (2016) também avaliaram a digestibilidade de nitrogênio aparente em camundongos saudáveis alimentados com dieta com alto teor de proteína e encontraram alta digestibilidade, independente da fonte proteica.

A digestibilidade não ter sido afetada, mesmo diante das alterações intestinais causadas pela infecção, também é coerente pelo fato de que a maior parte dos nutrientes já foram absorvidos no intestino delgado e ao intestino grosso competem outras funções tais como fermentação e absorção de água (WIELEN; MOUGHAN; MENSINK, 2017). Assim, não necessariamente a alteração no intestino implicaria em uma alteração na digestibilidade. Mas, de qualquer forma, faz-se essencial avaliar o intestino grosso, porque ele é o principal foco de escape dos ovos para as fezes (AMARAL et al., 2017; DIAS et al., 2018).

As alterações dos pesos do fígado estão relacionadas com a esquistossomose que ocorre devido a um grande número de ovos que ficam presos em tecidos como o fígado, em que a reação do hospedeiro resulta em inflamação granulomatosa (STAVITSKY, 2004). Nesse sentido, a análise da carga parasitária no fígado mostrou maior número de ovos nos animais com dieta hiperproteica, mas não diferiu estatisticamente do grupo com dieta padrão.

De qualquer forma, a hepatomegalia guardou relação com a infecção pelo *S. mansoni* e também com a ingestão proteica. Embora esta condição patológica tenha sido observada em ambos os grupos infectados, apresentou-se de forma mais acentuada nos animais com dieta hiperproteica. O aumento das reservas proteicas e a presença dos granulomas e seus constituintes explicam o maior aumento ponderal verificado no grupo hiperproteico. Coutinho et al. (2003) demonstraram que o estado nutricional do hospedeiro é fator importante na esquistossomose, considerando que os animais com dieta balanceada possuem uma maior reserva de proteínas no fígado do que aqueles com dieta hipoproteica.

A determinação da gordura visceral em animais tem recebido importância devido a sua associação com alterações metabólicas, bioquímicas e aumento do risco de aparecimento de

doenças crônicas (ESTADELLA et al., 2004). Nesse trabalho, mesmo não apresentando diferença estatística, foi possível perceber que os animais infectados apresentaram menor peso de gordura do que os animais sadios. A doença tem provado ser importante fator de risco para o desenvolvimento de má nutrição e deterioração orgânica associada à infecção (KATONA; KATONA-APTE, 2008).

A análise do número de ovos nas fezes, no fígado e no intestino grosso evidenciou maior contagem nos animais com dieta hiperproteica, mas não apresentou diferença estatística do grupo com dieta padrão. De qualquer forma, Barros et al. (2014) quando avaliaram o número de ovos no fígado e no intestino de animais que recebiam dietas com teor proteico diferenciado, caracterizando-os em bem nutridos e desnutridos, confirmou esse dado de que animais que recebem teor proteico maior na alimentação podem depositar maior número de ovos nos tecidos. A avaliação da distribuição dos ovos do parasito nos tecidos de um hospedeiro é importante para entender mais claramente a dinâmica da infecção esquistossomótica (AMARAL et al., 2017). Percebemos a importância do desenvolvimento de novos estudos pré-clínicos *in vitro*, a fim de determinar e elucidar o efeito da dieta hiperproteica na postura de ovos pelos parasitos em meios de cultura com aminoácidos isolados.

O remodelamento hepático está diretamente associado ao recrutamento de leucócitos e à ativação de resposta imune por antígenos de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado (COLLEY et al., 2014; HAMS et al., 2013). A estimulação antigênica contínua, resultante do aprisionamento de ovos em órgãos-alvo, leva a uma resposta inflamatória intensa em 6–8 semanas após a infecção associada à uma resposta imune dependente de células T CD4 (DIAS et al., 2018). Sendo que, no controle dessa reação estão, principalmente, as interleucinas IL-4, IL-10 e IL-13 (PEARCE; MACDONALD, 2002).

A quantificação da lesão do fígado baseada na estereologia tem sido uma ferramenta útil para estudos de esquistossomose mansônica (FRIIS et al., 1998; NEVES et al., 2006; BARROS et al., 2009; MACHADO-SILVA, 2010). Os resultados aqui apresentados demonstram que a análise estereológica indicou moderado remodelamento patológico do fígado em ambos os grupos infectados. A infecção causou danos na estrutura hepática, porque houve redução no número e volume de hepatócitos. Além disso, o aumento da densidade de volume do tecido conjuntivo nos grupos infectados sugere um processo reativo compensatório do estroma em resposta à lesão do parênquima hepático (CORDERO-ESPINOZA & HUCH, 2018).

Quanto a essas alterações hepáticas, na fase representativa de infecção aguda, foram evidenciadas também diferenças significativas entre as duas estratégias dietéticas, sendo menor

a densidade de número de hepatócitos nos grupos com dieta hiperproteica em comparação aos grupos com dieta padrão, independente da presença de infecção. Díaz-Rúa e seus colaboradores (2017) mostraram que a ingestão prolongada de dieta hiperproteica rica em caseína pode aumentar os sinais de lesão hepáticos em ratos, visto que ao analisarem marcadores séricos (proteína C-reativa e AST) como indicadores de disfunção hepática, evidenciaram-se aumento da inflamação, pois ambos estavam elevados no grupo com dieta hiperproteica (45% proteína) em comparação ao grupo com dieta padrão (20% proteína).

Embora animais infectados recebendo dieta padrão e hiperproteica tenham apresentado semelhanças na amplitude do remodelamento do fígado, o número e o tamanho dos granulomas apresentaram diferenças marcantes nesses grupos. Os animais com dieta hiperproteica apresentaram maior número de granulomas em relação à dieta padrão. Neste caso, a oviposição contínua e a retenção de ovos no fígado podem desencadear hiperestimulação imunológica e intenso recrutamento celular, eventos necessários para a organização de novos granulomas (HAMS et al., 2013). Por outro lado, evidenciou-se granulomas de maior área e volume no grupo com dieta padrão. O maior tamanho do granuloma evidenciado pode ser devido ao seu aspecto exsudativo-produtivo, característico de fase aguda (RODRIGUES et al., 2017; SILVA et al., 2000).

A esquistossomose aguda é caracterizada pela presença de numerosos granulomas periovulares em múltiplos órgãos, especialmente no fígado, intestinos e pulmões. Esses granulomas são grandes, com componente predominantemente exsudativo rico em eosinófilos, periferia mal delimitada e necrose periovular frequente (DIAS et al., 2019). Tais características condizem, em geral, com nossos achados. O tamanho e a composição do granuloma refletem a intensidade da reação inflamatória dirigida aos ovos de *S. mansoni* (AMARAL et al., 2017).

Após quantificação da celularidade da bainha do granuloma, verificou-se que na fase aguda as células polimorfonucleares foram predominantes, sendo que quando se comparou os tipos de dieta foi encontrado maior número nos animais com dieta padrão. Da mesma forma, quando se quantificaram os leucócitos totais a mesma diferença foi encontrada. Somente o número de mononucleares foi superior no grupo com dieta hiperproteica, mas não diferiu do grupo com dieta padrão.

Os animais com dieta padrão apresentaram predominância de granulomas exsudativos-produtivos, enquanto os animais com dieta hiperproteica mostraram maior número de granulomas fibrosos. Granulomas exsudativos-produtivos são característicos no fígado durante a fase aguda da esquistossomose mansônica em camundongos (DIAS et al., 2018). Isto indica exacerbação da resposta inflamatória nesta fase da infecção, uma vez que este tipo de

granuloma é volumoso e grandemente enriquecido em células inflamatórias e também é predominantemente encontrado durante a esquistossomose mansoni aguda em humanos (LAMBERTUCCI, 2010).

Notadamente, o grupo que recebeu dieta hiperproteica não diferiu do grupo com dieta padrão quanto ao conteúdo de colágeno na bainha do granuloma. A nutrição adequada do hospedeiro favorece a modulação da resposta inflamatória, contribuindo para o aumento da colagenização (COUTINHO, 2004). Assim, como ambos os grupos receberam uma alimentação balanceada, apenas com diferença no teor proteico ofertado, pode ter favorecido a distribuição semelhante de colágeno nesses animais. Por outro lado, análise morfométrica com coloração picrosírius realizada para comparar animais desnutridos e bem nutridos, por Barros e seus colaboradores (2014), mostrou que durante a fase aguda a porcentagem de tecido fibroso no fígado do grupo desnutrido foi similar à observada nos animais bem nutridos. Além disso, os autores detectaram alta expressão de colágeno tipo I nos granulomas periovulares de camundongos bem nutridos, mas, a deposição de colágeno tipo I foi menos evidente nos desnutridos e restrita a poucos granulomas com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

No nosso estudo, não foi feita a quantificação dos tipos de colágeno, no entanto, pode-se perceber a presença dos tipos de colágeno I e III através da microscopia. Picrosírius é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo. Quando observada sob luz polarizada, pela diferença na interferência de cores, na intensidade e na birrefringência dos tecidos corados, essa coloração permite a diferenciação principalmente das fibras tipo I (birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha) e tipo III (birrefringência verde ou verde-amarela) (BEDOYA et al., 2016).

A forma hepatoesplênica da esquistossomose é caracterizada por fibrose hepática e hipertensão portal, que, ao se propagarem aos ramos intestinais terminais, pode levar a alterações na arquitetura da mucosa intestinal, como uma redução da altura das vilosidades intestinais do intestino delgado (SIQUEIRA et al., 2010).

Comparados aos camundongos alimentados com dieta padrão, os animais com dieta hiperproteica demonstraram maior espessura da mucosa e tamanho de criptas e menores espessuras das camadas musculares externa e interna e do epitélio, principalmente os animais infectados com *S. mansoni*. Embora a esquistossomose afete a mucosa intestinal, há poucos estudos sobre sua avaliação em termos de mudanças na mucosa. As alterações histológicas podem ser devido à presença de ovos e granulomas observados nas camadas muscular e mucosa. Couto e seus colaboradores (2002) avaliaram alterações estruturais na mucosa jejunal

de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hipoproteica (5% de proteína) e normoproteicas (20% de proteína) e consideraram que nos seus estudos morfométricos a espessura da mucosa jejunal foi maior nos animais infectados devido à inflamação e formação dos granulomas, tendo as dietas pouca influência nesse resultado. Por outro lado, Azevedo et al. (2014) relataram que a perda da mucosa é uma ocorrência frequente nos animais desnutridos (4% de proteína) quando comparados aos bem nutridos (20% de proteína), que normalmente apresentam a mucosa do intestino mais espessa.

Camundongos pertencentes aos grupos sadios apresentaram estruturas intestinais bem preservadas, como esperado. Nos animais submetidos à infecção, foi possível observar a presença de ovos na mucosa e submucosa do órgão, com ou sem a presença de granulomas.

Alencar et al. (2012) analisaram a diferença na morfologia do granuloma de acordo com cada dieta testada e o tempo de infecção. Camundongos com uma dieta rica em gordura possuíam granulomas em diferentes estágios de maturação, enquanto o grupo controle exibiram apenas granulomas exsudativos durante a fase aguda. Os autores sugerem que essas diferenças podem estar relacionadas à dieta. No nosso estudo, observou-se presença de granulomas mais organizados e com muitas células nos animais com dieta hiperproteica. Da mesma forma que o trabalho com dieta hiperlipídica, é possível que a resposta induzida por uma dieta rica em proteína possa aumentar o recrutamento de células do granuloma ou tal resultado possa ser devido a maior carga intestinal (NEVES et al., 2007; ALENCAR et al., 2012).

Portanto, paralelamente às análises morfométricas das camadas do intestino, poderia ter sido realizada avaliação morfométrica dos granulomas e infiltrados inflamatórios do intestino para se esclarecer melhor o efeito da dieta hiperproteica sobre a mucosa intestinal. Entretanto, ao avaliar granulomas nos intestinos delgado e grosso autores visualizaram granulomas com poucas variações no tamanho e fases evolutivas, com predomínio do granuloma tipo exsudativo-produtivo e consideraram que os granulomas intestinais não sofrem nenhuma imunomodulação pronunciada observada em granulomas hepáticos (SILVA et al., 2000; DIAS et al., 2018). No intestino grosso dos animais infectados com *S. mansoni* a resposta inflamatória ao redor dos ovos do parasito é útil para que estes consigam atravessar as camadas do intestino em direção à luz do órgão para serem eliminados juntamente com as fezes, completando o ciclo de vida do parasito (AMARAL et al., 2017; DIAS et al., 2018).

Sabe-se que no intestino encontramos dois plexos ganglionares que fazem parte do sistema nervoso entérico, o mioentérico e o submucoso. Os sistemas nervoso e endócrino controlam em conjunto movimentos intestinais, secreção de suas glândulas, participam indiretamente nos processos de digestão e absorção de nutrientes. Além disso, estão envolvidos

em muitos processos fisiológicos e até mesmo em processos patológicos do trato digestivo (FREITAS-RIBEIRO et al., 2012). Portanto, avaliamos a área de gânglios dispersos ao longo do intestino grosso dos animais e verificamos que as áreas dos gânglios estavam aumentadas no grupo de animais infectados, principalmente àqueles recebendo dieta hiperproteica. O plexo mioentérico constitui uma rede de pequenos gânglios neuronais interconectados por feixes nervosos situados entre as camadas musculares (interna e externa) do trato gastrintestinal. Os gânglios encontrados neste plexo variam no tamanho e na forma. Essas diferenças podem estar relacionadas à porção do intestino analisada e à espécie de animal em questão (GABELLA, 1981). Por outro lado, na presença da infecção os gânglios podem ser mais exigidos para garantir o peristaltismo e, portanto, apresentarem-se aumentados.

A taxa de mortalidade analisada ao longo do experimento não evidenciou diferença significativa na sobrevivência dos grupos experimentais avaliados, de forma que nem a infecção e nem a dieta influenciaram nesse resultado. Sugere-se que o cuidado no manejo rotineiro e na manutenção dos animais no decorrer da pesquisa tenha contribuído para aumentar o bem-estar animal.

Assim, os achados histopatológicos e estereológicos indicaram remodelamento patológico do fígado em ambos os grupos infectados. Esse achado foi consistente com os danos teciduais tipicamente causados pela esquistossomose aguda (LENZI et al., 2008; ANDRADE, 2009). Além disso, a dieta foi capaz de induzir danos morfológicos hepáticos e intestinais evidentes, os quais variaram de acordo com a dieta. Foram observados danos no fígado desses animais, que além dos granulomas esquistossomóticos, apresentaram hipertrofia hepática e processo inflamatório.

6 CONCLUSÃO

Considerados em conjunto, os nossos achados indicaram que embora os animais infectados por *S. mansoni* tenham apresentado marcante remodelamento microestrutural no intestino grosso, essas alterações não foram suficientes para modificar a digestibilidade da dieta hiperproteica. Além disso, os animais infectados e tratados com dieta hiperproteica apresentaram maior coeficiente de eficiência alimentar, consumo de dieta e ingestão energética. Como esses não influenciaram a massa corporal, é possível que a infecção por *S. mansoni* aumente o custo metabólico do hospedeiro, requerendo um maior consumo energético na tentativa de amplificar a resposta imunológica para restringir as lesões teciduais causadas pelos parasitos, incluindo a inflamação granulomatosa que se estabelece em múltiplos órgãos e tecidos. Essa proposição é reforçada pelo drástico aumento do número de granulomas e pela marcante hipertrofia hepática, a qual é acompanhada de redução da densidade de hepatócitos em animais tratados com dieta hiperproteica. Assim, os nossos achados evidenciaram que a dieta hiperproteica amplificou a inflamação granulomatosa, favorecendo o desenvolvimento de lesões teciduais mais graves, especialmente no fígado, cuja sobrecarga hepática morfofuncional é a característica patológica mais grave da esquistossomose.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA DIETA HIPERPROTEICA NA FASE CRÔNICA DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, incluindo o *S. mansoni*, responsável pela doença no Brasil, afetando principalmente o fígado e os intestinos (KATZ; PEIXOTO, 2000). Neste país, os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados e estima-se que 2,5 milhões de indivíduos brasileiros estão infectados, principalmente em áreas rurais e pobres onde a sanitização e a qualidade de vida são precárias (KATZ; PEIXOTO, 2000; VITORINO et al., 2012).

No mundo, a prevalência mundial é de 249 milhões de indivíduos infectados em 78 países e 800 milhões de pessoas moram em áreas endêmicas para a doença. Regiões do Oriente Médio, América do Sul, Sudoeste da Ásia e especialmente África são as regiões do mundo de maior incidência e prevalência de esquistossomose (WHO, 2017; DIAS et al., 2019).

Nessa parasitose, as formas adultas do trematódeo habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro (vertebrado/homem) e as formas intermediárias (esporocistos primários, esporocistos secundários, cercárias) se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*, sendo o mais importante vetor do *S. mansoni* a espécie *B. glabrata* (ALVES et al., 2016).

A esquistossomose se desenvolve em humanos em duas fases, aguda e crônica, sendo que a fase aguda é geralmente assintomática e representa uma forma leve com envolvimento hepatointestinal (DIAS et al., 2019) e a fase crônica, quando sintomática, se manifesta como hepatoesplenomegalia e hipertensão portal e é reconhecida como uma forma hepatoesplênica avançada (NEVES, 2010).

Na doença crônica, ovos retidos em vários tecidos induzem a formação da inflamação granulomatosa, que juntamente com a fibrose subsequente é responsável pela patogênese da doença, causando inflamação grave, eosinofilia tecidual, deposição de colágeno, fibrose e hipertensão portal (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

Essa inflamação granulomatosa é considerada uma reação de hipersensibilidade tipo tardia mediada por células T CD4. Ao longo da infecção, os antígenos liberados pelos ovos podem estimular as células do hospedeiro a desencadear uma resposta Th1, com produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ que estimulam um processo inflamatório e ativam principalmente macrófagos; e com o início da postura dos ovos há atenuação da resposta Th1 e aumento de uma resposta do tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que suprimem a produção e as funções efetoras dos mediadores proinflamatórios, ativando principalmente as

células B, estimulando a produção de anticorpos particularmente IgE e aumentam a proliferação de eosinófilos (ABATH et al., 2006; CHUAH et al., 2014; PEARCE; MACDONALD, 2002).

No início da fase crônica, os granulomas são observados em vários estágios de evolução, incluindo formas involutivas com baixa celularidade e alta densidade de colágeno; e, em geral, os granulomas da esquistossomose são menores na fase crônica. A fase crônica mais avançada é grave, sendo predominantemente caracterizada por fibrose hepática periportal (AMARAL et al., 2017).

A forma crônica pode apresentar grandes variações clínicas, dependendo de serem as alterações predominantemente intestinais, hepatointestinais ou hepatoesplênicas (NEVES, 2010). E dessa forma, em indivíduos que desenvolvem esquistossomose hepatoesplênica, a fibrose dos espaços periportal hepático leva a lesões vasculares obstrutivas, hipertensão portal, varizes, ascite, organomegalia (GRAY et al., 2011). Os intestinos apresentam uma resposta granulomatosa da mucosa característica levando à pseudopolipose, microulceração e sangramento superficial (GRYSSELS, 2012).

Geralmente, as pessoas residentes em regiões endêmicas são também expostas a hábitos alimentares inadequados (ADENOWO et al., 2015). O *S. mansoni* e a desnutrição modulam o sistema imune do hospedeiro, com efeito direto sobre o desenvolvimento do parasito e progressão da doença (KATONA & KATONA-APTE, 2008; COUTINHO et al., 2010; DA SILVA et al., 2012). Por esse motivo, muitos autores estudaram dietas hipoproteicas associadas à esquistossomose (COUTINHO et al., 1997; COUTINHO et al., 2010; BARROS et al., 2014).

A ingestão alimentar nutricionalmente ajustada é um requerimento básico para a manutenção de um adequado estado de saúde geral. Há evidências que deficiências de macronutrientes, especialmente proteínas e micronutrientes estão relacionadas ao déficit de crescimento, ao prejuízo no desenvolvimento intelectual, ao aumento da susceptibilidade a doenças e ao risco de morte (CALDER, 2013; CZERWONOGRODZKA-SENCZYNA et al., 2016). Por outro lado, a adequada disponibilidade de macronutrientes e micronutrientes é essencial para o desenvolvimento de células imunes, reconhecimento de antígenos, ativação e expressão de fenótipos efetores celulares e humorais (KRAWINKEL, 2012; CALDER, 2013).

Assim, além dos efeitos de dietas hipoproteicas na esquistossomose experimental, a dieta hiperlipídica também é alvo de pesquisas (ALENCAR et al., 2009; ALENCAR et al., 2012; DA SILVA et al., 2012). Outras estratégias dietéticas como o aumento do teor de açúcar, restrição de vitaminas e suplementação de zinco foram menos estudadas na esquistossomose (MAGALHÃES et al., 1978; AKPOM; WARREN, 1975; HELMY et al., 2009). E, independente da dieta utilizada na esquistossomose experimental, os estudos avaliaram

principalmente a formação do granuloma, a fibrose hepática, a carga parasitária e a mortalidade (MARQUES et al., 2018).

Devido a implicações éticas, evidências sobre a relação entre esquistossomose e composição da dieta, em humanos, são baseadas principalmente em estudos clínicos-epidemiológicos, nos quais o desenho metodológico prejudica o entendimento dos mecanismos patofisiológicos dessa interação (MEKONNEN et al., 2014; MUNISI et al., 2016). Por outro lado, camundongos são altamente susceptíveis ao *S. mansoni* e desenvolvem características patofisiológicas similares à infecção em humanos, bem como são também utilizados em estudos envolvendo intervenções dietéticas. Dessa forma, os modelos pré-clínicos *in vivo* têm fornecido uma valiosa contribuição no entendimento de como a composição da dieta interfere na patogênese das doenças infecciosas (OLIVEIRA et al., 2004; BARROS et al., 2014).

Diante do exposto, este capítulo discute o efeito da dieta hiperproteica na fase crônica da esquistossomose experimental, em camundongos, principalmente no desenvolvimento de granulomas hepáticos e no perfil imunológico. Como este tipo de dieta foi menos estudado, busca-se elucidar se existe interação entre a infecção e a dieta e o quanto essa interação pode modificar a patogênese nas infecções por *S. mansoni*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da dieta hiperproteica na fase crônica da esquistossomose experimental em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) avaliar o efeito da dieta hiperproteica no perfil de crescimento corporal dos camundongos não infectados e infectados por *S. mansoni*.
- b) comparar a digestibilidade da dieta hiperproteica em camundongos não infectados e infectados por *S. mansoni*.
- c) investigar a distribuição de ovos de *S. mansoni* nas fezes, no fígado e no intestino dos camundongos.
- d) analisar o impacto da dieta hiperproteica no remodelamento microestrutural hepático e intestinal dos camundongos infectados por *S. mansoni*.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Quarenta camundongos *Swiss* machos (n=40), com três a quatro semanas de idade e pesando de 10 a 15 g foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e mantidos sob condições padronizadas de iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h/12h), temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UNIFAL-MG. Os camundongos foram alojados em caixas de polipropileno com tampas de tela em aço inoxidável com cinco animais em cada caixa.

3.2 INFECCÃO POR *S. mansoni*

Os animais foram infectados por via subcutânea, com 25 cercárias de *S. mansoni* cepa LE (Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil) obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou.

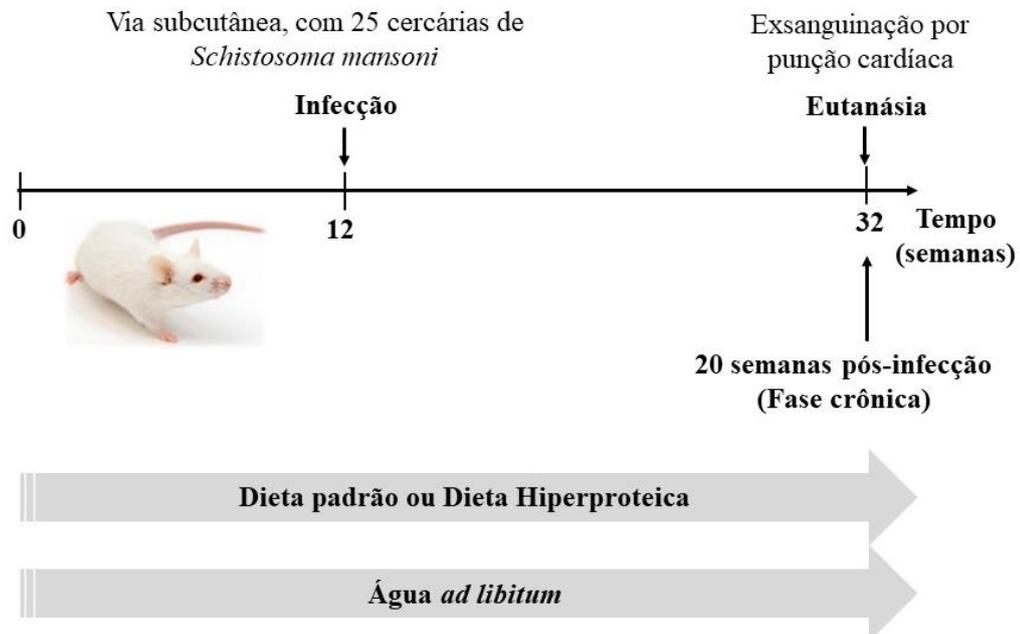
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O experimento teve duração de 32 semanas (FIGURA 21). Durante todo o período os animais receberam água *ad libitum* e dieta padrão e hiperproteica, de forma que inicialmente 20 animais receberam dieta padrão e 20 animais receberam dieta hiperproteica.

Na 12^a semana do experimento, metade dos animais (n=20; grupos DPc-I e HPc-I) foram infectados por *S. mansoni*.

Os camundongos foram eutanasiados vinte semanas pós-infecção, fase relativa à infecção crônica (grupos DPc-I, DPc-S, HPc-I e HPc-S).

Figura 21 – Delineamento experimental



Fonte: Da autora.

3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram randomizados em quatro grupos com 10 animais em cada grupo, assim denominados e caracterizados:

Grupo DPc-I: animais infectados com *S. mansoni*, com dieta padrão e eutanásia na fase crônica da infecção (20 semanas);

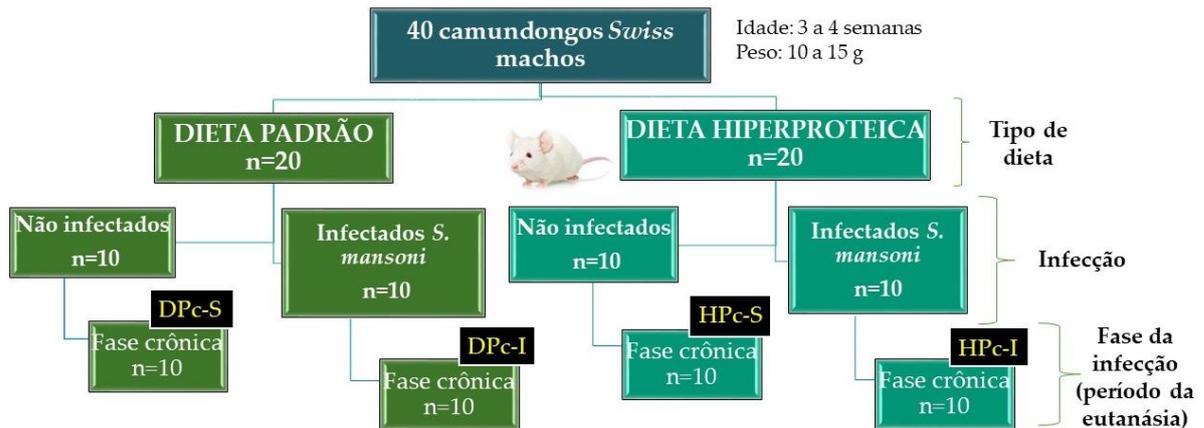
Grupo HPc-I: animais infectados com *S. mansoni*, com dieta hiperproteica e eutanásia na fase crônica da infecção (20 semanas);

Grupo DPc-S: animais não infectados, com dieta padrão e eutanásia na fase representativa de infecção crônica (20 semanas);

Grupo HPc-S: animais não infectados, com dieta hiperproteica e eutanásia na fase representativa de infecção crônica (20 semanas).

A Figura 22 resume as características dos grupos experimentais.

Figura 22 – Fluxograma da randomização dos grupos experimentais e suas características.



Fonte: Da autora.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e o projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UNIFAL-MG (Protocolo nº 06/2017) (ANEXO 1).

3.6 DIETAS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas dieta padrão para roedores de laboratório (Nuvilab[®], São Paulo, SP, Brasil) normoproteica (proteína 22,6%) e dieta hiperproteica (proteína 38%). Para a elaboração da dieta hiperproteica considerou-se que a caseína continha, no mínimo, 85% de proteína (REEVES et al., 1993) e que a dieta padrão já continha 22 g de proteína para cada 100g de dieta. Assim, para se obter uma dieta hiperproteica com teor de proteína aproximado de 40% (PESTA; SAMUEL, 2014) foi necessário adicionar 24% de caseína à dieta padrão. Após a pesagem nas proporções indicadas, os ingredientes foram homogeneizados e umedecidos para formar uma massa (à moda caseira) utilizada para moldar os *pellets*, os quais foram submetidos à secagem em estufa e congelados até o momento do uso.

A dieta padrão foi disponibilizada pelo Biotério Central da UNIFAL-MG e o ingrediente caseína foi adquirido de fornecedor especializado (Rhooster[®] Indústria e Comércio Ltda). A composição centesimal das dietas está descrita na Tabela 1.

A ingestão de dieta foi controlada com a observação de quantidade ingerida no período de aclimatação pelos grupos experimentais, ofertando aproximadamente 10g de dieta

hiperproteica e padrão, diariamente por camundongo para todos os grupos em forma de *pellets*. Sendo assim, disponibilizava-se 100g de dieta para cada caixa a cada dois dias.

A análise da composição centesimal das rações foi realizada no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição da UNIFAL-MG, sendo as determinações de umidade, cinzas e lipídeos realizadas de acordo com o método proposto pela AOAC (AOAC, 2000). As determinações de proteínas foram realizadas de acordo com o Método de Kjeldahl (AOAC, 2000), com amostras em triplicata, utilizando-se o fator 6,25 para a conversão dos teores de nitrogênio em proteínas. Os carboidratos foram determinados por diferença, diminuindo-se a soma dos demais componentes de 100.

Para a determinação do valor energético das dietas, considerou-se que os carboidratos fornecem 4kcal/g, as proteínas 4 kcal/g e os lipídios 9 kcal/g.

3.7 EXAME PARASITOLÓGICO

A confirmação da infecção por *S. mansoni* foi avaliada pela quantificação de ovos na excreção fecal no dia da eutanásia e as fezes foram analisadas em duplicata pela técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). Utilizando-se kit diagnóstico próprio (Kit Helm Teste), para cada amostra de fezes, duas lâminas foram preparadas e examinadas ao microscópio. Para determinar o número de ovos por grama de fezes, o número médio de ovos encontrados nas lâminas foi multiplicado pela constante 24 (BARBOSA et al., 2017).

3.8 NÚMERO DE OVOS PRESENTES NO FÍGADO E NO INTESTINO

Para obter a contagem do número de ovos presentes no fígado e no intestino dos camundongos infectados com *S. mansoni* realizou o processo de digestão tecidual por KOH a 10% para a recuperação dos ovos após a eutanásia dos animais na fase crônica da doença (ALVES et al., 2016). Fragmentos dos órgãos foram pesados e acondicionados em tubos *falcons* com KOH 10% overnight na geladeira. No dia seguinte, os fragmentos foram incubados a 37°C durante um hora e meia em banho-maria e, imediatamente após os órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 1400 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em salina 0,85%. Esta etapa foi repetida três vezes. Após a última centrifugação, ressuspendeu-se o sedimento em 2 mL de salina 0,85%. A suspensão contendo ovos do parasito foi aplicada em lâminas de vidro, e o número de ovos foi determinado com o uso de um um

microscópio de luz. Foram realizadas três contagens de 200 µL da solução de cada órgão a fim de se determinar o número de ovos por grama de tecido.

3.9 DIGESTIBILIDADE APARENTE DA PROTEÍNA DA DIETA

Na 32ª semana de experimento, a fim de se determinar a digestibilidade aparente, as dietas foram coradas com índigo carmim (200 mg/100 g de dieta) e foram disponibilizadas aos animais no primeiro e no quarto dia dessa semana (MORAES et al., 2012). As fezes foram coletadas durante quatro dias, sendo que no segundo dia forma coletadas as fezes marcadas com carmim, nos dois dias seguintes todas as fezes, e no quinto dia as fezes não coradas. As fezes coletadas foram armazenadas em sacos plásticos identificados para cada grupo e mantidas em congelador até a análise. As fezes foram secadas em estufa com circulação de ar a 105°C por 24 h, logo após foram resfriadas em dessecador (Marconi®), maceradas, homogeneizadas e pesadas para determinação da concentração de nitrogênio pelo método de *Kjeldahl*, com amostras em triplicata (AOAC, 2000).

A digestibilidade aparente (DA) foi calculada por mensuração do conteúdo de nitrogênio ingerido (NI) e excretado nas fezes (NF) dos grupos-teste, de acordo com a seguinte fórmula: $DA (\%) = (NI - NF) \times 100 / NI$ (COSTA et al., 2014).

3.10 ANÁLISE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR E BIOMETRIA

Para avaliar a eficiência alimentar, foram obtidos os seguintes parâmetros: coeficiente de eficiência alimentar (CEA), peso corporal (g), comprimento naso-anal (cm) e índice de *Lee*.

O CEA representa a relação entre o ganho de peso pela quantidade de alimento consumido: $CEA = (PF - PI) / TA$, em que PF: peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento; PI: peso corporal do animal no início do experimento em gramas, TA: quantidade total de alimento ingerido no período em gramas (CAMPBELL et al., 1963).

A ingestão dietética foi avaliada pelo registro do consumo da dieta por caixa, a cada dois dias, sendo o consumo alimentar obtido através da subtração entre a cota alimentar oferecida e o rejeito verificado dois dias depois (NERY et al., 2011). Levou-se em consideração o número de dias avaliados e o número de animais por caixa para obtenção do consumo alimentar diário e total dos animais. A ingestão energética dos animais foi obtida pelo cálculo do valor calórico desse consumo alimentar dos animais.

A pesagem dos animais foi registrada semanalmente desde o início do experimento para cálculo do ganho de peso: $PF - PI$, onde PF: peso final (g) do animal durante o período de acompanhamento; PI: peso corporal (g) do animal no início do experimento. Utilizou-se uma balança eletrônica digital (Marte[®]).

Ao final do experimento, o comprimento naso-anal foi obtido após anestesia do animal, com as medidas registradas em papel milimetrado e o índice de *Lee* foi determinado por meio da raiz cúbica do resultado obtido na divisão do peso corporal (g) pelo comprimento naso-anal (cm) de cada animal: $[\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}}]$. O Índice de *Lee* é um preditor para obesidade e tem forte correlação com massa gorda, sendo um indicativo do estado nutricional do animal (NOVELLI et al., 2007). Um Índice de *Lee* igual ou inferior a 0,300 indica peso normal e no caso de valores superiores a 0,300, os animais são classificados como acima do peso ideal (BERNARDIS & PATTERSON, 1968).

Os órgãos coletados foram pesados e o peso relativo do fígado e da gordura periepídimal foi calculado por meio da divisão do peso do órgão pelo peso corporal do animal. Além disso, determinou-se o volume do fígado usando o método de imersão descrito por Scherle (SCHERLE, 1970).

3.11 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL

Os camundongos foram eutanasiados por exsanguinação por punção cardíaca após anestesia com administração intraperitoneal de quetamina (0,1 mg/kg de peso corporal) e xilazina (0,05 mg/kg de peso corporal). O sangue foi coletado e colocado em tubos *ependorfs* contendo heparina e centrifugado imediatamente para obtenção do plasma, mantido armazenado a -80 °C até o momento da análise bioquímica e das citocinas. Realizaram-se toracotomia e laparotomia mediana para coleta de fígado e intestino grosso, os quais foram fixados em solução de formaldeído para análises posteriores.

A taxa de mortalidade durante o período experimental foi calculada por meio de registro diário.

3.12 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA MICROSCOPIA

Fragmentos do lóbulo esquerdo do fígado e da primeira porção do intestino grosso de camundongos não-infectados e infectados foram removidos e fixados em solução de formaldeído 4% tamponada neutra. Após a fixação histológica, os órgãos foram desidratados

em concentrações crescentes de álcool a partir de 70% até álcool absoluto (99,8%). Em seguida os órgãos foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina a 60°C. Para a montagem das lâminas, os cortes microscópicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados, de acordo com as normas do Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG, com HE para observação dos aspectos histomorfológicos do tecido e análise estereológica e com picrosírius para identificação e análise de fibras colágenas. As imagens das lâminas histológicas foram capturadas com uma câmera fotográfica digital (QColor 3, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz convencional (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens obtidas foram processadas e analisadas por software de captura e análise de imagens *Axion Vision LE* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.13 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na análise microscópica do fígado foram investigadas qualitativamente a necrose tecidual, a hipertrofia de hepatócitos, o padrão de organização e distribuição das células do parênquima e do estroma, a distribuição das células intersticiais, bem como a distribuição de focos inflamatórios, granulomas esquistossomóticos e áreas de fibrose tecidual. A análise microscópica foi realizada em 6 campos histológicos aleatórios para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×), perfazendo uma área total do fígado de $18,5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ para cada animal (NOVAES et al., 2013).

3.14 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

O método estereológico foi utilizado para avaliar a amplitude do remodelamento morfológico do parênquima e estroma do fígado (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995). A densidade de volume, parâmetro utilizado para medir o percentual da área ocupada pela estrutura de interesse (hepatócitos, tecido conjuntivo) e densidade de número (hepatócitos, células intersticiais, granulomas esquistossomóticos) foram obtidos de acordo com Novaes et al. (2013).

Para estas análises, foi usado um sistema de teste com 100 pontos presentes em uma área de teste (A_t) de $31 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ao nível do tecido. A densidade de volume (V_v , %) dos hepatócitos e do tecido conjuntivo foi estimada pela contagem de pontos, de acordo com a seguinte fórmula: $V_v = \Sigma P / P_t$, em que ΣP representa o número de pontos do sistema de teste que

incidem sobre a estrutura de interesse e P_t corresponde ao número total de pontos do sistema de teste. A análise estereológica foi realizada com o auxílio do software de análise de imagens Image-Pro Plus 5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA) em 6 campos histológicos aleatórios de cortes corados em HE para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×) (NOVAES et al., 2013).

A intensidade do processo inflamatório no fígado foi obtida pela densidade de número de células intersticiais (QA_{int}) e de número de hepatócitos (QA_h). A celularidade tecidual nas áreas remotas ao granuloma foi avaliada em 6 campos histológicos aleatórios de cortes corados em HE com a utilização de lente objetiva de 40× (ampliação de 400×), numa área total do fígado de $18,5 \times 10^4 \mu m^2$ por animal. Para isso, foi aplicado um sistema de teste quadrático (A_t) sobre as imagens histológicas. O número de núcleos celulares na área de teste (QA_{int}) foi determinado por meio de software de análise de imagens Image-Pro® plus 5 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA). O número de núcleos celulares por unidade de área (células / mm^2) foi determinado pela fórmula: $QA_{int} = \Sigma_{int} / A_t$, onde Σ_{int} representa o somatório do número de núcleos de células inflamatórias (intersticiais) na área de teste e A_t corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($31 \times 10^3 \mu m^2$), conforme metodologia de Caldas et al. (2008 a,b) e Novaes et al. (2013). Procedeu-se da mesma maneira para se determinar a contagem dos núcleos dos hepatócitos.

3.15 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GRANULOMAS

Nos animais infectados com *S. mansoni* foi obtido o número e dimensão dos granulomas esquistossomóticos. O estágio evolutivo dos granulomas (exudativos-produtivos ou fibróticos) também foi quantificado, diferenciando-se de acordo com uma caracterização morfológica previamente estabelecida (LENZI et al., 1999; ARAÚJO et al., 2019) em cortes de fígado corados pelo corante vermelho picrosírius.

A análise de distribuição total e diferencial do granuloma da esquistossomose hepática foi avaliada pelo método estereológico. Para a análise da densidade de número de granulomas por unidade de área (QA_g , n/mm^2), foi utilizada a fórmula $QA_g = \Sigma_g / A_t$, onde Σ_g representa somatório do número de granulomas e A_t corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($37 \times 10^5 \mu m^2$). A QA_g foi estimada a partir de 10 campos histológicos aleatórios de cortes corados com HE para cada animal, obtidos com a utilização de lente objetiva de 5× (ampliação de 50×).

A área dos granulomas e as medidas dos diâmetros menor e maior foram determinadas diretamente por meio da ferramenta de contorno e medidas do programa *Axion Vision* em objetiva de 20×. Para cada animal foram medidos 10 granulomas e obtida a média do grupo e as medidas foram realizadas apenas nos granulomas em que o ovo de *S. mansoni* foi claramente observado (REIS et al., 2001).

O volume do granuloma foi estimado pelo princípio do esferoide prolato, de acordo com a fórmula: $V = (4/3)\pi a^2 b$, onde a é o diâmetro menor e b é o diâmetro maior de uma estrutura esferoide.

A análise do colágeno dos granulomas hepáticos foi feita a partir de 10 granulomas aleatórios por grupo de animais, em cortes corados com picrossírius, sob microscopia de polarização obtidos com a utilização de lente objetiva de 20×. A análise foi realizada pelo software de análise de imagem, ImageJ (*National Institutes of Health, USA*). As intensidades foram equalizadas usando a ferramenta threshold do programa ImageJ. O Threshold é usado para limitar um objeto de interesse em uma imagem eliminando os efeitos de *background*, no qual todos os pixels na imagem que estão abaixo deste limite são convertidos em preto e todos os pixels com valores acima deste limite são convertidos em branco ou vice-versa. A área da foto foi determinada por meio de *software* de análise de imagens Image-Pro® plus 5 (*Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA*). Para saber a quantidade de colágeno na área histológica, foi utilizada a fórmula: $\text{área de colágeno/mm}^2 = [\% \text{ colágeno da imagem} \times \text{dimensão da área da foto utilizada (37 x 10}^{-2} \text{ mm}^2)]/100$.

3.16 ANÁLISE DA CELULARIDADE DA BAINHA DO GRANULOMA

O número de células polimorfonucleares (PMNs – predominantemente neutrófilos) e mononucleares (MNs - macrófagos, linfócitos) foi avaliado na bainha do granuloma. Foram analisadas 6 imagens por lâmina de cada animal com área de $48 \times 10^2 \mu\text{m}^2$, com utilização de lente objetiva de 100×, aplicando-se um sistema de teste quadrático (At) sobre as imagens. O número de células (QA) na área de teste foi determinado por meio de software de análise de imagens Image-Pro® plus 5 (*Media Cybernetics Inc., Silver Spring, Maryland, EUA*). O número de núcleos celulares por unidade de área (células / mm^2) foi determinado pela fórmula: $QA = \Sigma \text{cél} / At$, onde $\Sigma \text{cél}$ representa somatório do número de células polimorfonucleares ou mononucleares na área de teste e At corresponde a dimensão da área de teste utilizada ($48 \times 10^2 \mu\text{m}^2$) de acordo com a metodologia encontrada em Caldas et al. (2008a,b) e Novaes et al. (2013).

3.17 MORFOMETRIA INTESTINAL

A espessura das camadas da mucosa (epitélio, mucosa e muscular da mucosa) e da camada muscular (muscular externa e muscular interna) foram determinadas diretamente pela ferramenta de medidas do programa *Axion Vision* em objetiva de 20× (ampliação de 200×), em 6 campos histológicos aleatórios em 4 regiões diferentes (total de 24 medições/animal) de cortes corados com HE, numa área total do intestino de $24,3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. A largura e o comprimento de 15 criptas por corte foram mensurados e as medidas foram realizadas apenas nas criptas em que a base e o ápice foram observadas.

A área de gânglios e o número de células por gânglio foram avaliados nas camadas musculares. Foram analisados 20 gânglios por lâmina de cada animal com área de $59,5 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, determinando-se a área por meio da ferramenta de contorno do programa *Axion Vision*, em lente objetiva de 40×. Para determinação do número de células por gânglios por μm^2 , dividiu-se o número de células pela área do seu respectivo gânglio.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram relatados utilizando-se valores de média e erro padrão. A normalidade na distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para a análise de dois fatores (dieta × infecção), os valores de média foram comparados entre os grupos por meio do teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste *Student-Newman-Keuls*. Para a análise unifatorial entre dois grupos, dados paramétricos foram comparados pelo teste t de *student* e dados não paramétricos foram comparados pelo teste Mann-Whitney U. Resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Plot versão 14.0 (*Systat Software Inc.*) e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad-Prism versão 5.0 (*Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA*).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA DIETA NO PERFIL DE CRESCIMENTO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS

Os animais alimentados com dieta hiperproteica apresentaram maior consumo de dieta e ingestão de energia como mostrado na Tabela 5. Assim, em relação ao consumo de dieta, tanto os animais infectados quanto os sadios com dieta hiperproteica consumiram maior quantidade de dieta do que os alimentados com dieta padrão na fase crônica da infecção ($P < 0,05$). O mesmo ocorreu em relação à ingestão energética, mas esse parâmetro também apresentou diferença quando se comparou os animais infectados e não infectados com a mesma dieta ($P < 0,05$).

A Tabela 5 mostra que com 20 semanas, a eficiência alimentar nos grupos com dieta padrão foi maior nos animais infectados ($P < 0,05$), mas não houve diferença estatística entre os grupos infectados e não infectados com dieta hiperproteica ($P > 0,05$). Além disso, o CEA diferiu com relação à dieta nos grupos não infectados ($P < 0,05$), sendo maior no grupo com dieta hiperproteica.

O ganho de peso e o índice de *Lee* não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$). Mas, ao considerar os pesos e tamanhos corporais dos animais, os camundongos foram considerados com sobrepeso, independente da dieta consumida.

Tabela 5 - Parâmetros biométricos e ingestão dietética dos grupos experimentais infectados/não infectados que receberam dietas padrão/hiperproteica e foram eutanasiados 20 semanas pós-infecção.

Parâmetros	Dieta padrão		Dieta hiperproteica	
	Infectados	Sadios	Infectados	Sadios
Ganho de peso (g/dia)	0,06 ± 0,02 ^{aA}	0,05 ± 0,04 ^{aA}	0,07 ± 0,03 ^{aA}	0,07 ± 0,04 ^{aA}
Consumo de dieta (g/dia)	7,42 ± 0,18 ^{aA}	7,06 ± 1,70 ^{aA}	8,32 ± 0,24 ^{bB}	8,5 ± 0,00 ^{bB}
Ingestão energética (kcal/dia)	30,40 ± 0,75 ^{aA}	28,93 ± 6,96 ^{aB}	32,85 ± 0,94 ^{bA}	33,55 ± 0,003 ^{bB}
CEA (%)	0,86 ± 0,02 ^{aA}	0,73 ± 0,1 ^{aB}	0,86 ± 0,03 ^{aA}	0,88 ± 0,01 ^{bA}
Índice de <i>Lee</i>	0,39 ± 0,02 ^{aA}	0,37 ± 0,02 ^{aA}	0,37 ± 0,01 ^{aA}	0,37 ± 0,02 ^{aA}

Fonte: Da autora

Nota: CEA, coeficiente de eficiência alimentar. Médias seguidas de letras minúsculas (a, b) na mesma linha referem-se à dieta padrão e hiperproteica e quando seguidas de letras maiúsculas (A, B) referem-se a infectados e não infectados (sadios). Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos (P<0,05). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.2 DIGESTIBILIDADE DA DIETA HIPERPROTEICA

Para avaliar o percentual de absorção de nitrogênio, o Coeficiente de Digestibilidade Aparente (DA) foi adotado. Quando se comparou animais infectados com animais sadios, houve diferença na fase crônica da infecção ($P < 0,05$) (TABELA 6).

Em relação ao nitrogênio ingerido da dieta pelos grupos durante o teste, a condição de saúde do animal não influenciou na ingestão de nitrogênio, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos sadio e infectado ($P > 0,05$). Quanto ao nitrogênio fecal, observou-se diferença entre os animais infectados e não infectados de fase crônica, sendo maior a excreção de nitrogênio no grupo sadio ($P < 0,05$).

Tabela 6 - Nitrogênio ingerido, nitrogênio fecal e digestibilidade aparente da dieta hiperproteica dos grupos experimentais infectados/não infectados na fase representativa de infecção crônica.

	Infectados	Sadios
NI (g)	$3,53 \pm 0,19^A$	$3,52 \pm 0,28^A$
NF (g)	$0,23 \pm 0,01^A$	$0,26 \pm 0,01^B$
DA (%)	$93,49 \pm 0,24^A$	$92,71 \pm 0,27^B$

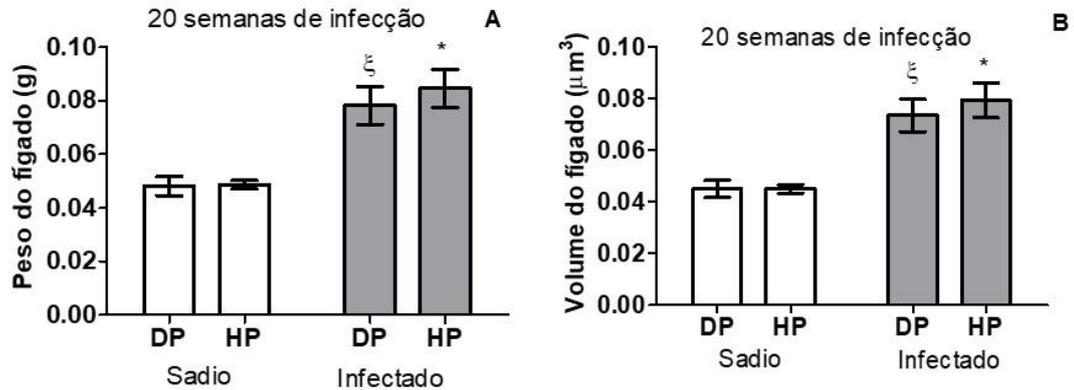
Fonte: Da autora

Nota: NI, nitrogênio ingerido; NF, nitrogênio fecal; DA, coeficiente de digestibilidade aparente. Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha referem-se a infectados e não infectados (sadios). Diferentes letras nas linhas indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). Análise teste t student.

4.3 PESO E VOLUME RELATIVO DOS ÓRGÃOS

Os resultados do peso e volume relativo do fígado encontram-se representados nas Figuras 23A e 23B. Como pode ser observado, os animais infectados com dieta padrão ou hiperproteica apresentaram maior média de peso e volume do fígado em relação ao grupo sadio com dieta padrão ou hiperproteica, respectivamente ($P < 0,05$), 20 semanas pós-infecção.

Figura 23 – Peso (A) e volume (B) relativos do fígado de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sádios e infectados com 20 semanas pós-infecção por *S. mansoni*.

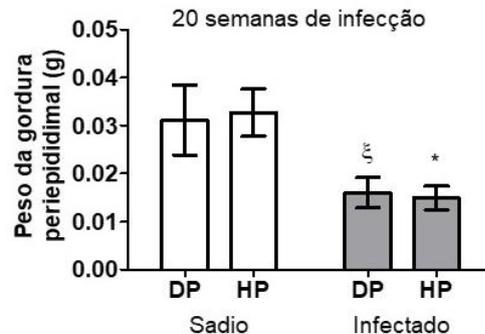


Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. [§]Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P<0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P<0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

Quanto à gordura periepididimal, houve aumento da gordura entre os animais sádios com dieta padrão ou hiperproteica em relação ao grupo infectado com dieta padrão ou hiperproteica, respectivamente ($P<0,05$) (FIGURA 24).

Figura 24 - Peso relativo da gordura periepididimal de camundongos alimentados com dieta padrão e hiperproteica, sádios e infectados com 20 semanas pós-infecção por *S. mansoni*.



Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=8) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. [§]Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P<0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P<0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.4 DISTRIBUIÇÃO DE OVOS DE *S. mansoni* NAS FEZES, NO FÍGADO E NO INTESTINO DOS CAMUNDONGOS

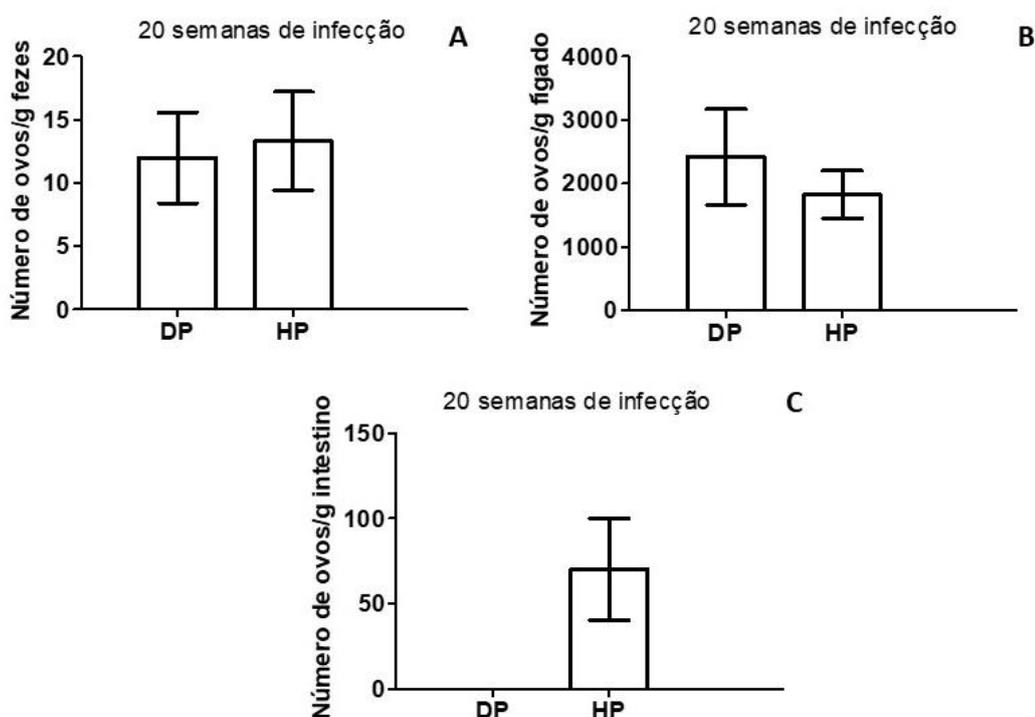
No que diz respeito à eliminação de ovos nas fezes (FIGURA 25A), a média de ovos quantificados nos grupos ($12,00 \pm 9,49$ ovos/g de fezes nos camundongos DP e $13,33 \pm 11,65$

ovos/g de fezes nos camundongos HP), foi similar na fase crônica, não apresentando diferença significativa ($P>0,05$).

A quantidade de ovos retidos no fígado de camundongos infectados por *S. mansoni* com dieta padrão foi ligeiramente superior aos animais com dieta hiperproteica (FIGURA 25B), mas não foi detectada diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).

Quanto ao intestino, quantificou-se um número pequeno de ovos, de forma que foram encontrados ovos apenas no grupo de animais com dieta hiperproteica, mas não foi encontrada diferença significativa quando a média foi comparada à dieta padrão (FIGURA 25C).

Figura 25 - Número de ovos presentes nas fezes (A) e retidos no fígado (B) e no intestino (C) de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da doença.



Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise test t de *student*.

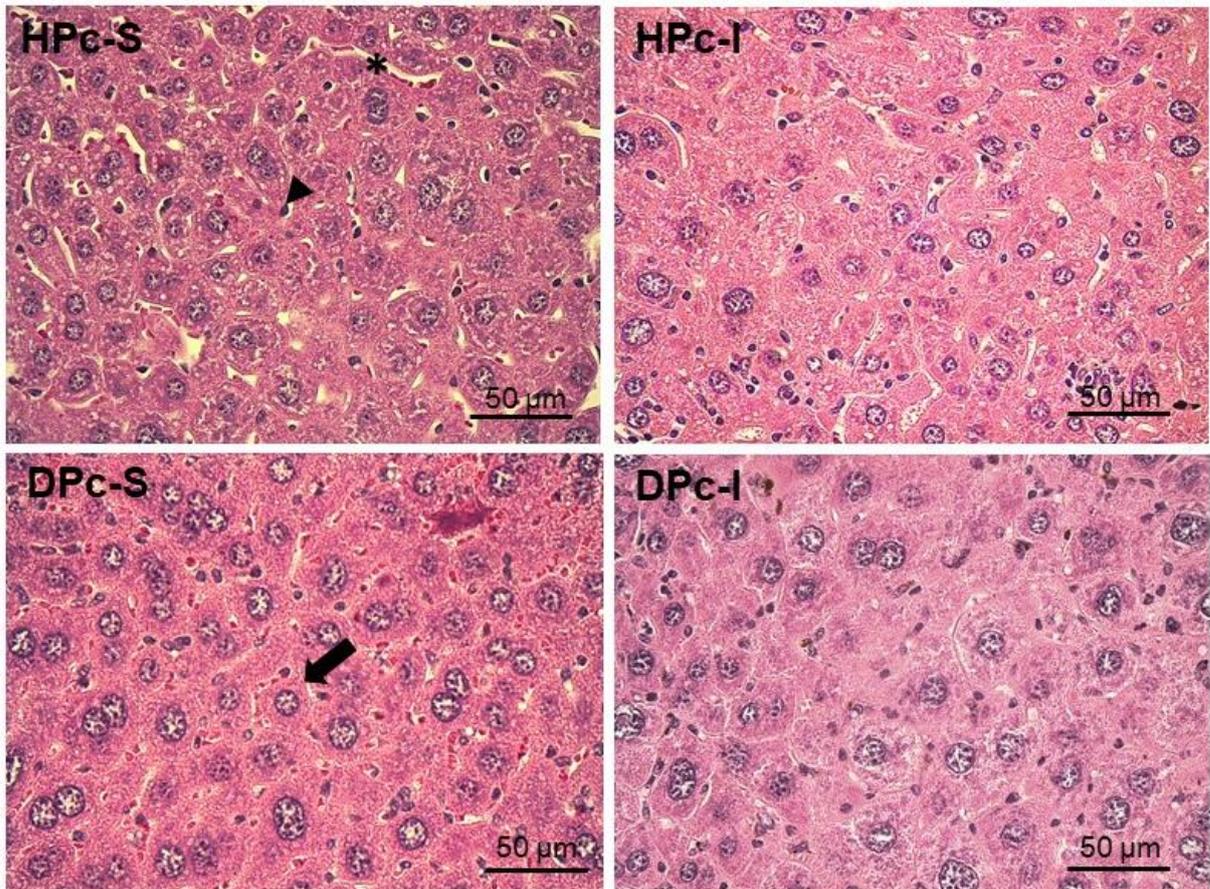
4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO FÍGADO

4.5.1 Análise Histopatológica

A análise microscópica do tecido hepático (FIGURA 26) demonstrou que os animais não infectados apresentaram morfologia normal, com cordões de hepatócitos organizados

radialmente em relação à veia centrolobular, capilares sinusóides com aspecto regular distribuídos entre os cordões de hepatócitos. Nos animais infectados com dieta hiperproteica, o tecido hepático em área remota aos granulomas apresentou leve dilatação de capilares sinusoidais e discreto infiltrado inflamatório. Os animais infectados com dieta padrão apresentaram estreitamento do leito capilar, menor densidade de hepatócitos e aparente expansão conjuntiva. Em todos os grupos não foram observadas evidências de alterações nucleares, sendo que o núcleo de hepatócitos apresentou morfologia típica com áreas eucromáticas e heterocromáticas bem definidas e nucléolos evidentes.

Figura 26 - Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos com dieta hiperproteica e padrão, sadios e infectados com *S. mansoni* na fase representativa de infecção crônica (20 semanas de infecção).



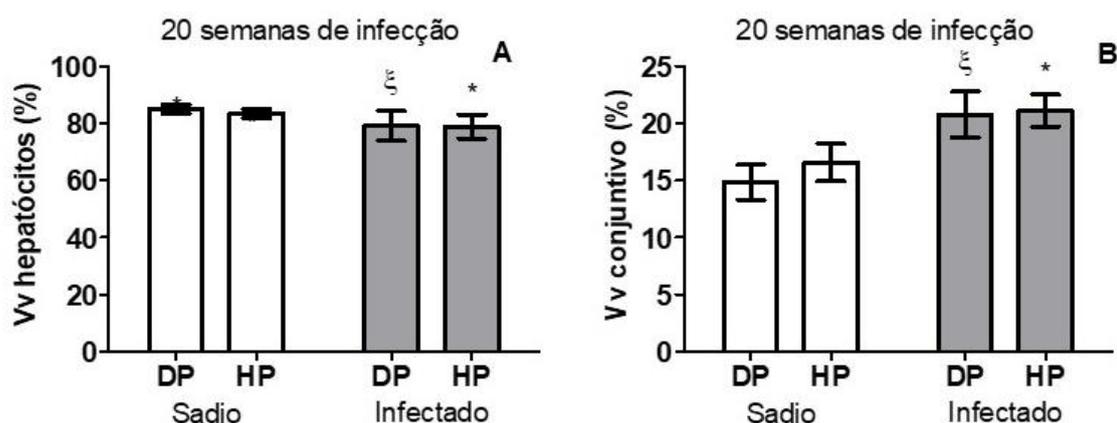
Fonte: Da autora

Nota: (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina). HPC-S, grupo sadio com dieta hiperproteica, fase representativa de infecção crônica; HPC-I, grupo infectado com dieta hiperproteica, fase crônica; DPc-S, grupo sadio com dieta padrão, fase representativa de infecção crônica; DPc-I, grupo infectado com dieta padrão, fase crônica. Os grupos sadios (HPC-S e DPc-S) evidenciam padrão de organização dos hepatócitos preservados em relação aos animais infectados. Seta grossa: hepatócito; asterisco: capilar sinusóide; ponta de seta: núcleo de célula intersticial.

4.5.2 Parâmetros estereológicos do tecido hepático

A densidade de volume de hepatócitos (V_v hepatócitos [%]) aumentou significativamente nos animais do grupo sadio com DP quando comparados com os animais do grupo infectado com DP, 20 semanas pós-infecção ($P < 0,05$) como apresentado na Figura 27. Os animais do grupo sadio com HP se comportaram da mesma forma quando comparados com os animais do grupo infectado com HP ($P < 0,05$). Resultado inverso ocorreu com a densidade de volume de tecido conjuntivo (V_v conjuntivo [%]), que aumentou significativamente nos animais dos grupos infectados tanto com DP quanto HP, quando comparados aos animais dos grupos sadios com DP e HP, respectivamente ($P < 0,05$).

Figura 27 - Densidade de volume (V_v) de hepatócitos (A) e tecido conjuntivo (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, 20 semanas pós-infecção.



Fonte: Da autora

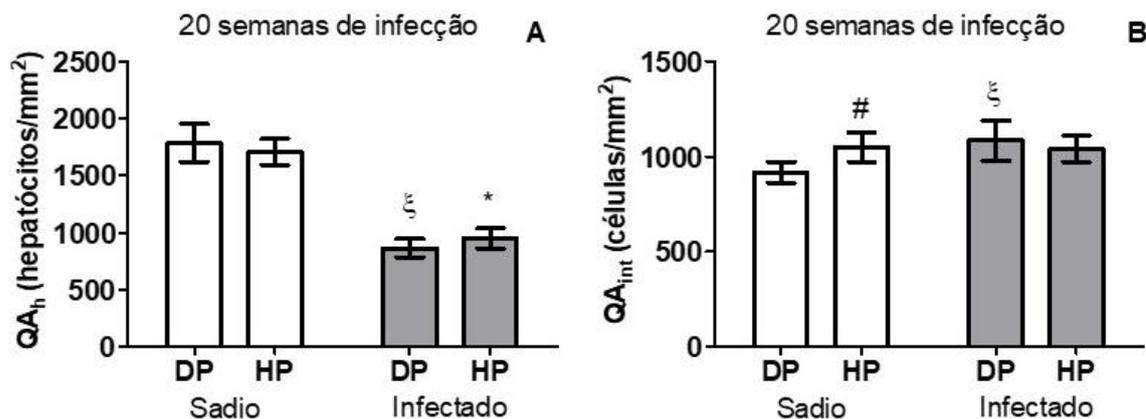
Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sadios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. [‡]Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P < 0,05$). ^{*}Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

A densidade de número de hepatócitos (QA_h [hepatócitos/mm²]) encontra-se apresentada na Figura 28A. Os animais infectados apresentaram diminuição do número de hepatócitos em relação ao grupo não infectado, sendo que a densidade de número de hepatócitos foi significativamente maior nos dois grupos experimentais (DP e HP) sadios comparado aos grupos infectados (DP e HP, respectivamente) na fase crônica da infecção ($P < 0,05$).

Quanto à densidade de número de células intersticiais (QA_{int} [células/mm²]) o grupo infectado com dieta padrão diferiu estatisticamente do grupo não infectado com a mesma dieta ($P < 0,05$) (FIGURA 28B). Outra diferença foi encontrada nos grupos de animais não infectados,

sendo que os animais HP apresentaram maior densidade de células intersticiais quando comparados aos animais DP ($P < 0,05$).

Figura 28 - Densidade de número de hepatócitos (QA_h) (A) e células intersticiais (QA_{int}) (B) no fígado de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas pós-infecção.



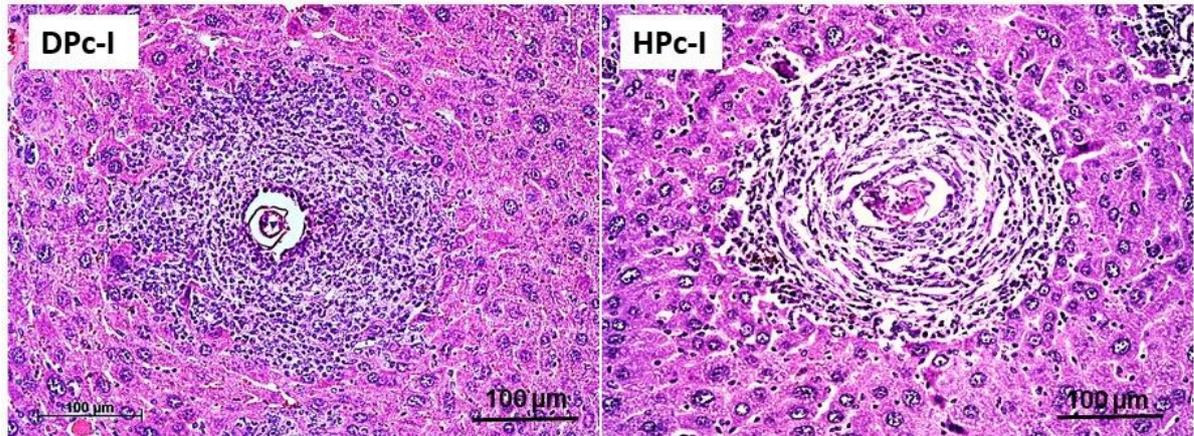
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sádios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. §Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão ($P < 0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$); #Diferença do grupo sadio com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.5.3 Análise microscópica dos Granulomas hepáticos – Coloração HE

A partir da análise microscópica, os granulomas hepáticos de camundongos infectados por *S. mansoni* apresentaram característica morfológica involutiva, caracterizada por granulomas menores, com celularidade menos pronunciada e um acúmulo acentuado de material amorfo eosinofílico ao redor dos ovos de *S. mansoni* (FIGURA 29). Os animais com dieta hiperproteica apresentaram bainha granulomatosa bem definida, baixa celularidade, fibras colágenas circunferenciais ao redor dos ovos. Animais tratados com dieta padrão apresentaram tamanho semelhante do granuloma, porém com maior celularidade do infiltrado inflamatório ao redor do ovo de *S. mansoni*.

Figura 29 - Fotomicrografias representativas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase crônica da infecção.



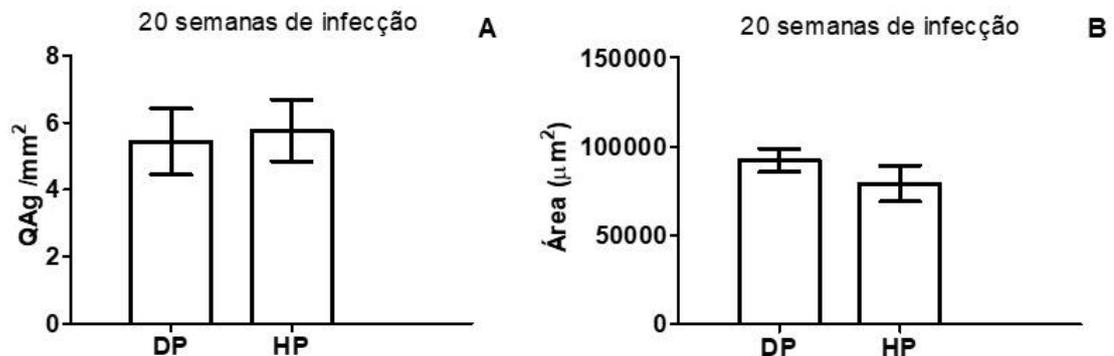
Fonte: Da autora

Nota: (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina). HPc-I, grupo infectado, dieta hiperproteica, fase crônica; DPc-I, grupo infectado, dieta padrão, fase crônica. Os cortes evidenciam granulomas caracterizados pelo ovo do parasito disposto centralmente circundado por um intenso infiltrado inflamatório.

4.5.3.1 Análise Histomorfométrica dos granulomas

Os resultados da análise dos granulomas dos animais infectados com *S. mansoni* encontram-se apresentados nas Figuras 30 e 31. Como pode se observar na Figura 30, o número e a área dos granulomas foi similar entre os grupos, não apresentando diferença estatística na comparação entre os animais com dieta hiperproteica e os animais com dieta padrão ($P > 0,05$).

Figura 30 - Densidade de número (QAg) (A) e área dos granulomas esquistosomóticos (B) no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.

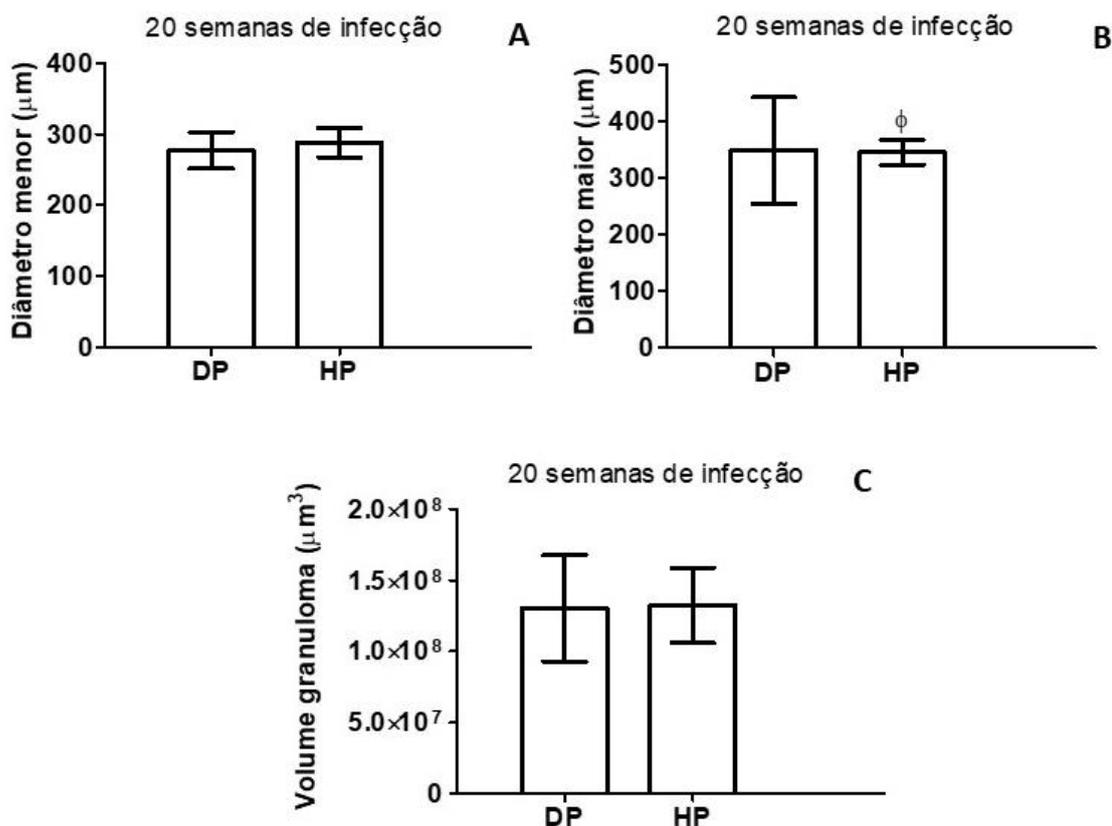


Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise teste t de *student*.

Em relação aos diâmetros e volume do granuloma (FIGURA 31), houve diferença estatística apenas quando se avaliou o diâmetro maior ($P < 0,05$); o diâmetro menor e o volume do granuloma não apresentaram diferença significativa do grupo com dieta hiperproteica em relação ao grupo com dieta padrão ($P > 0,05$).

Figura 31 – Diâmetro menor (A), diâmetro maior (B) e volume (C) dos granulomas esquistosomóticos no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.



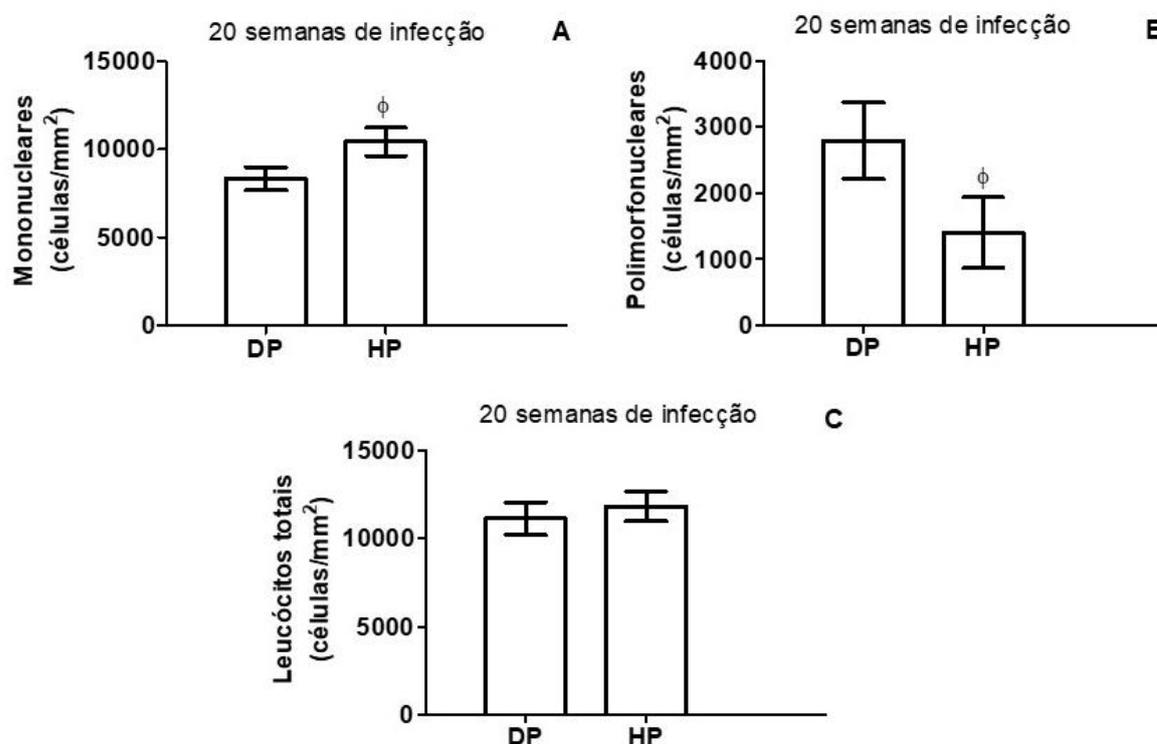
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ^φ Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo infectado com dieta padrão ($P < 0,05$). Análise teste t de *student*.

4.5.3.2 Quantificação da celularidade

A contagem das células MN na bainha do granuloma mostrou aumento significativo ($P < 0,05$) na fase crônica no grupo HPC-I ($10413,85 \pm 2372,22/\text{mm}^2$) quando comparado ao grupo DPC-I ($8323,43 \pm 1743,15/\text{mm}^2$) (FIGURA 32A). Em relação as células PMN, como mostrado na Figura 32B, ocorreu o inverso, as células PMN mostraram-se aumentadas nos animais DPC-I ($2790,86 \pm 1522,79/\text{mm}^2$) quando comparado ao grupo HPC-I ($1402,53 \pm 1098,19/\text{mm}^2$). A contagem de leucócitos totais foi semelhante nos dois grupos e não foi encontrada diferença estatística ($P > 0,05$) (FIGURA 32C).

Figura 32 - Contagem do número de células mononucleares (A), polimorfonucleares (B) e leucócitos totais (C) na bainha de granulomas esquistossomóticos do fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.



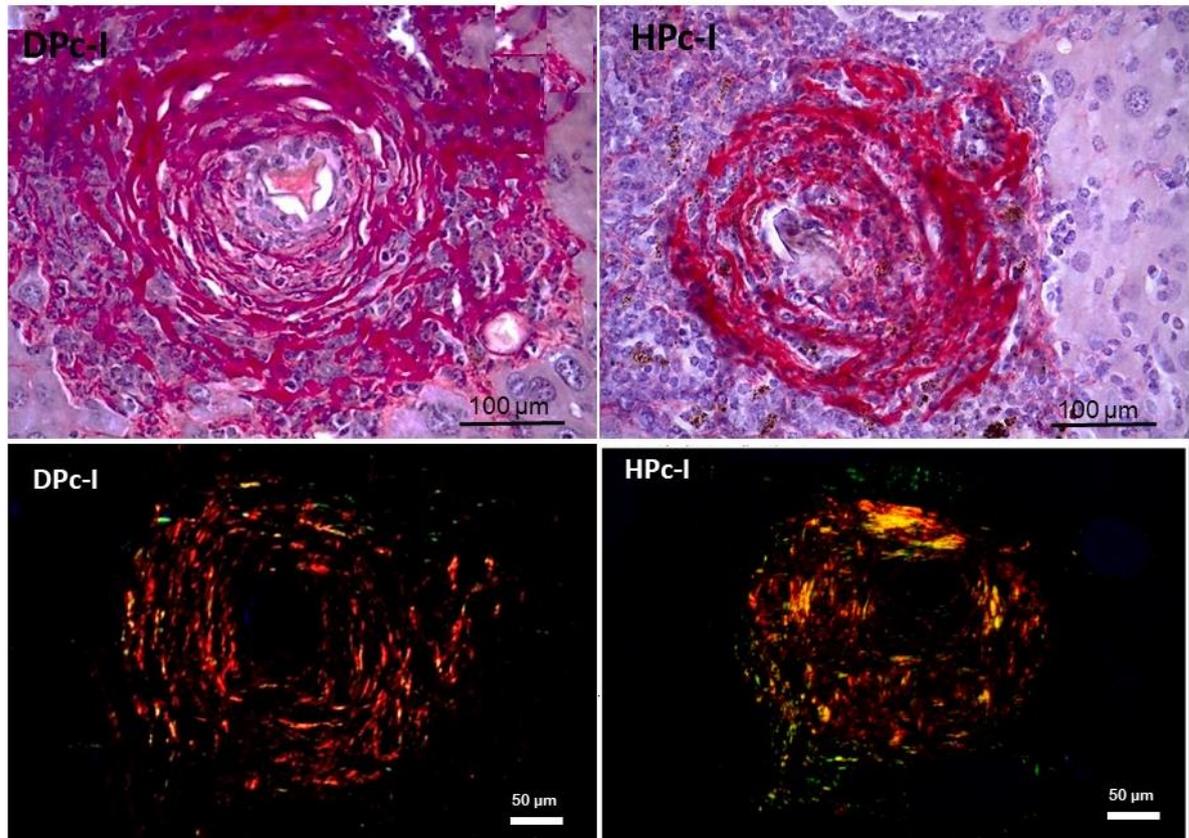
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ^φ Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo infectado com dieta padrão (P<0,05). Análise teste t de *student*.

4.5.4 Análise microscópica dos granulomas hepáticos – Coloração picrosirius

Na Figura 33 pode-se observar granulomas com fibras colágenas evidenciadas em vermelho (microscopia de campo claro) ou em tons brilhantes de vermelho, amarelo ou verde (microscopia de polarização). A acentuada deposição, bem como a organização das fibras de colágeno mais espessas reforçam a caracterização granulomatosa involutiva predominante em ambos os grupos infectados. Sob luz polarizada, foi possível identificar a presença de fibras de colágeno em diferentes estágios de maturação. O colágeno mais espesso (tipo I) marcado pela birrefringência laranja e vermelha, e o colágeno mais recente formado por fibras delgadas (tipo III) com birrefringência verde-amarelada (BEDOYA et al., 2016). Os animais com DP apresentaram maior acúmulo de colágeno, especialmente do tipo I, e bainha granulomatosa mais espessa. Os animais com HP apresentaram moderado acúmulo de fibras colágenas com maior grau de compactação e organização circunferencial em torno dos ovos de *S. mansoni* (FIGURA 33).

Figura 33 - Fotomicrografias representativas dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hiperproteica e padrão na fase crônica da infecção.



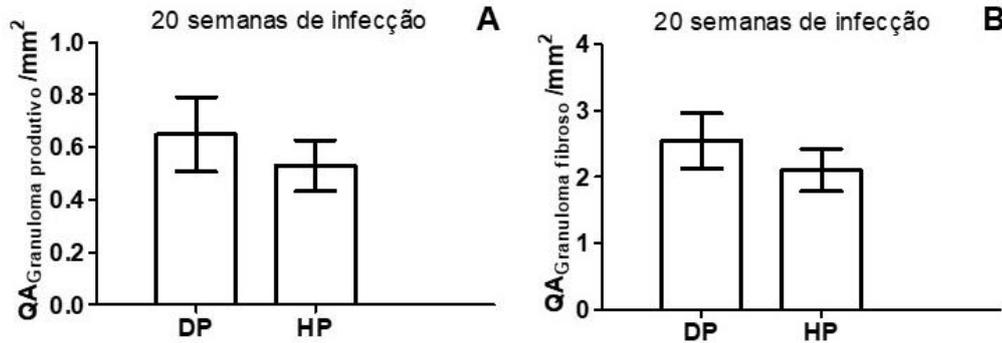
Fonte: Da autora

Nota: (Imagens primeira linha: Microscopia de campo claro, coloração: picosirius; Imagens segunda linha: Microscopia sob luz polarizada, coloração: picosirius). HPc-I, grupo infectado, dieta hiperproteica, fase crônica; DPc-I, grupo infectado, dieta padrão, fase crônica. Os cortes evidenciam granulomas caracterizados pelo ovo do parasito central circundado por fibras colágenas.

4.5.4.1 Análise histomorfométrica dos granulomas

Em relação ao estágio evolutivo dos granulomas, foi possível observar nas Figuras 34A e 34B que o número de granulomas produtivos e de granulomas fibrosos foi ligeiramente maior nos animais com dieta padrão em comparação aos animais com dieta hiperproteica, mas não diferiu estatisticamente entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 34 – Densidade de número de granulomas esquistossomóticos - granulomas produtivos (A) e granulomas fibrosos (B) no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.



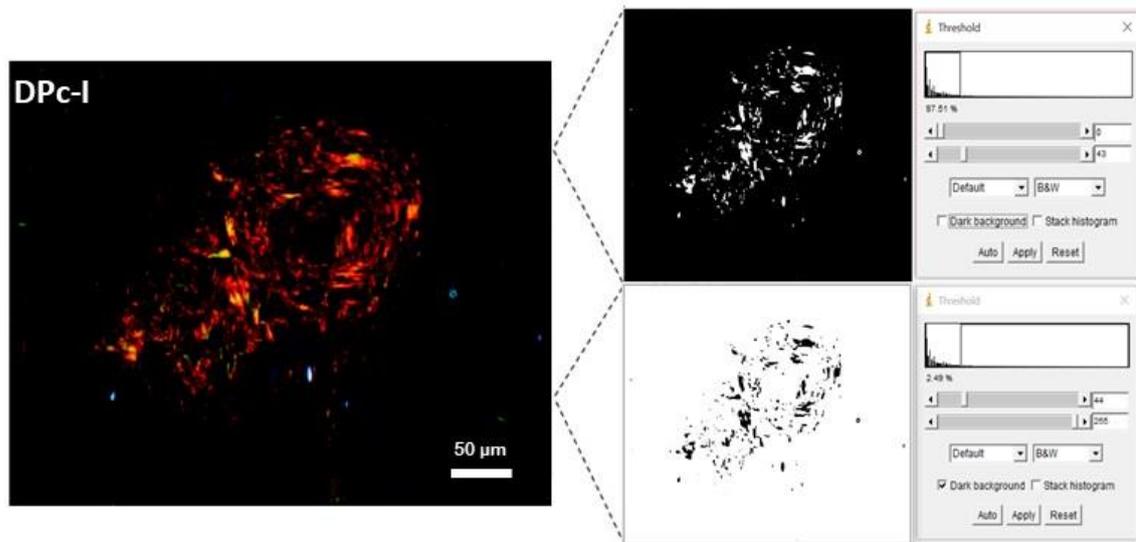
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise teste t de *student*.

4.5.4.2 Quantificação de colágeno

A Figura 35 ilustra como foram obtidos os resultados de quantificação do colágeno a partir das imagens coradas com picosirius sob luz polarizada.

Figura 35 - Fotomicrografia representativa de granuloma hepático de camundongo infectado com *S. mansoni* alimentado com dieta padrão na fase crônica da infecção e suas respectivas imagens no Programa ImageJ.

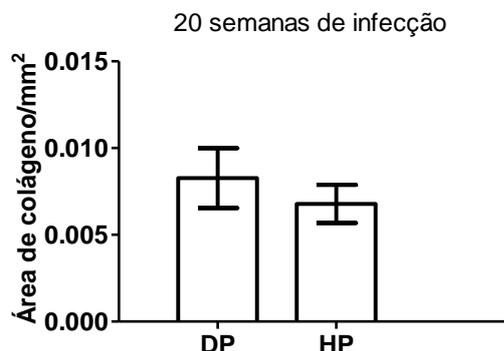


Fonte: Da autora

Nota: (Microscopia de luz polarizada, coloração: picosirius). DPc-I, grupo infectado, dieta padrão, fase crônica. A figura mostra o conteúdo de colágeno na imagem à direita inferior como pontos pretos em fundo branco.

A distribuição de colágeno no grupo com dieta padrão foi superior aos animais com dieta hiperproteica (FIGURA 36), mas tal diferença não foi significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Figura 36 – Área relativa de colágeno no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica, na fase crônica da infecção.



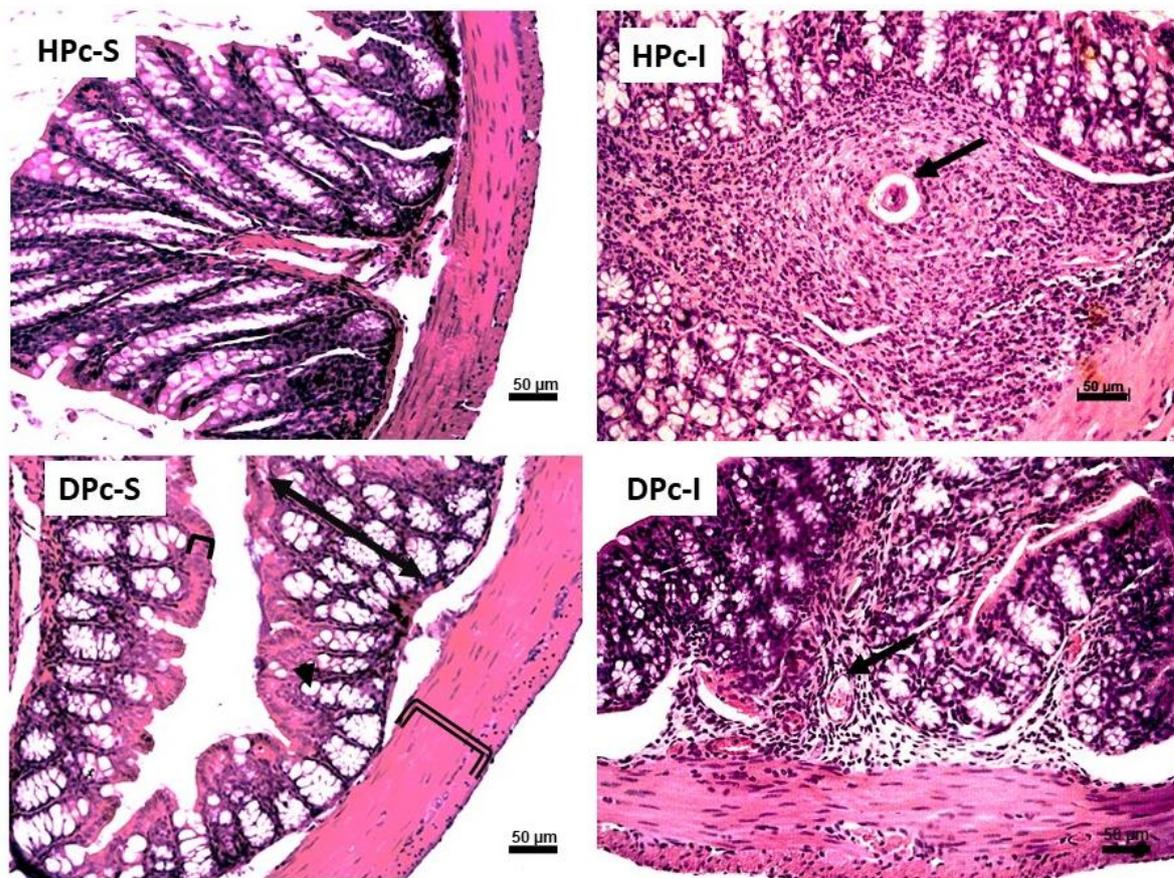
Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. DP (n=7) e HP (n=9). DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise teste t de *student*.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO INTESTINO

Em camundongos sadios (HPc-S e DPc-S) foi observada microestrutura intestinal preservada, com característica bem definida das camadas mucosa, submucosa e muscular da parede do intestino grosso. Além disso, o epitélio intestinal apresentou células absortivas e caliciformes evidentes, principalmente distribuídas nas criptas intestinais. Nos animais com dieta HP submetidos à infecção, foi possível observar a presença de ovos e granulomas na mucosa e submucosa do órgão intestinal, além de criptas intestinais menores. Nessas regiões, foi identificado intenso infiltrado inflamatório. Nos animais do grupo DPa-I, notou-se deposição de ovos, mas a presença de granulomas não foi evidente. Entretanto, encurtamento de criptas intestinais e marcante infiltrado inflamatório nas camadas mucosa, submucosa e muscular também foi detectado (FIGURA 37).

Figura 37 - Fotomicrografias representativas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperproteica na fase crônica da infecção.



Fonte: Da autora

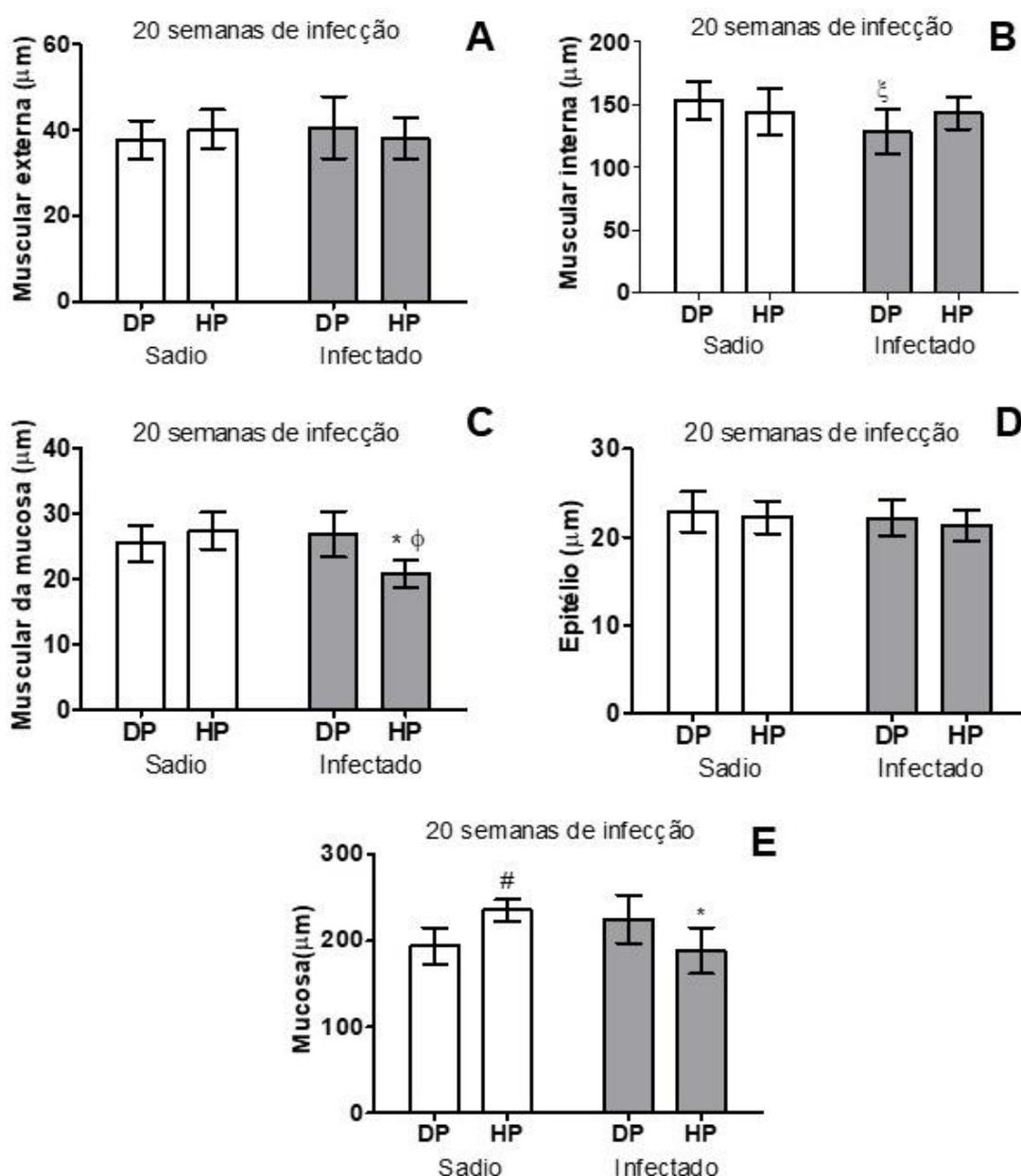
Nota: Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina. HPc-S, grupo sadio com dieta hiperproteica, fase representativa de infecção crônica; HPc-I, grupo infectado com dieta hiperproteica, fase crônica; DPc-S, grupo sadio com dieta padrão, fase representativa de infecção crônica; DPc-I, grupo infectado com dieta padrão, fase crônica. Nos grupos HPc-S e DPc-S notaram-se preservação das estruturas intestinais. Ponta de seta: célula caliciforme; colchete simples: epitélio intestinal; colchete duplo: camada muscular; seta de duas pontas: camada mucosa; seta: ovo de *S. mansoni*.

4.6.1 Morfometria do intestino

A camada muscular interna aumentou significativamente nos animais do grupo sadio com DP quando comparados com os animais do grupo infectado com DP, 20 semanas pós-infecção ($P < 0,05$) como apresentado na Figura 38B. Quando se avaliou a espessura da muscular da mucosa (FIGURA 38C) verificou-se que os animais sadios com HP diferiram estatisticamente dos animais infectados com a mesma dieta. Além disso, quando comparou-se os animais infectados, o grupo com DP apresentou maior medida em comparação ao grupo com HP ($P < 0,05$). Na análise da camada muscular externa (FIGURA 38A) observou-se resultados semelhantes aos apresentados na Figura 38C, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Da mesma forma, a espessura do epitélio (FIGURA 38D)

mostrou-se regular em todos os grupos e não diferiu entre os mesmos quando fez-se a comparação ($P>0,05$). Quanto à espessura da mucosa (FIGURA 38E), os animais do grupo sadio com dieta hiperproteica apresentaram maior espessura em relação aos outros grupos, encontrando-se diferença estatística quando comparados ao grupo infectado com a mesma dieta e ao grupo sadio com DP ($P<0,05$).

Figura 38 – Espessura das camadas da mucosa (epitélio, mucosa e muscular da mucosa) e da camada muscular (muscular externa e muscular interna) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas pós-infecção.



Fonte: Da autora

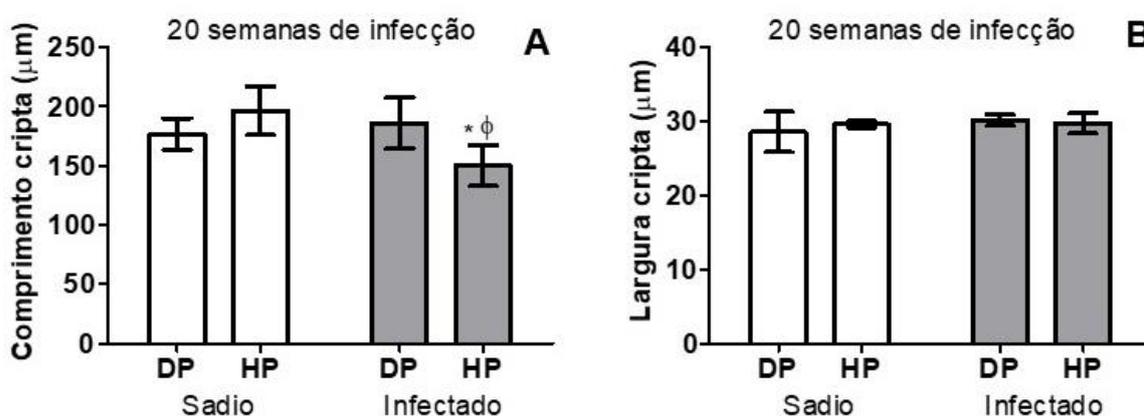
Nota: Os valores representam a média \pm desvio padrão. Grupos sadios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica.

§Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta padrão

($P < 0,05$); ϕ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo infectado com dieta hiperproteica ($P < 0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$); #Diferença do grupo sadio com dieta padrão em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

Como observado na Figura 39A, os animais sadios apresentaram média de comprimento de cripta ligeiramente superior às dos animais infectados, mas houve diferença apenas quando se comparou os animais infectados e sadios que receberam dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Além disso, entre os animais infectados, o grupo com dieta hiperproteica apresentou menor comprimento de cripta comparado ao grupo com DP ($P < 0,05$). Já na Figura 39B, pode-se perceber que a largura da cripta foi semelhante entre os grupos e não diferiram estatisticamente quando comparados ($P > 0,05$).

Figura 39 – Comprimento (A) e largura (B) das criptas do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas pós-infecção. Os valores representam a média \pm erro padrão.

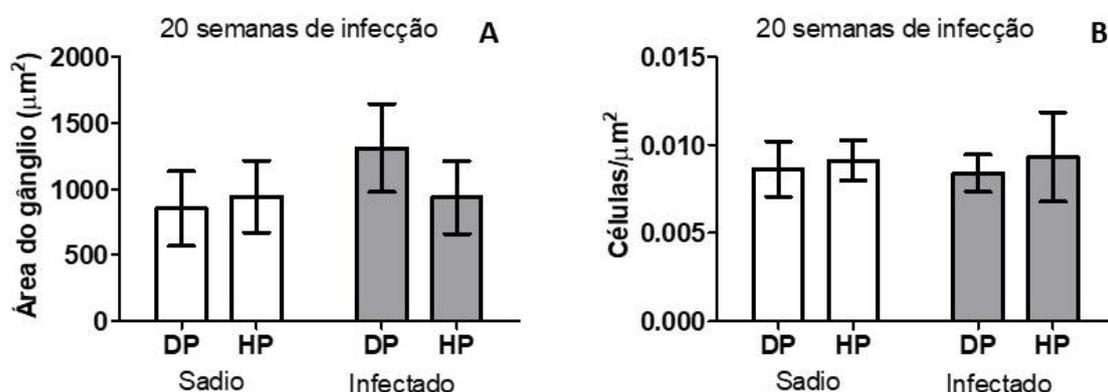


Fonte: Da autora

Nota: Grupos sadios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. ϕ Diferença do grupo infectado com dieta padrão em relação ao grupo infectado com dieta hiperproteica ($P < 0,05$); *Diferença do grupo infectado com dieta hiperproteica em relação ao grupo sadio com dieta hiperproteica ($P < 0,05$). Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

A área dos gânglios mioentéricos e o número de células pela área dos gânglios encontram-se apresentados nas Figuras 40A e 40B. Os animais infectados apresentaram aumento da área dos gânglios em relação ao grupo não infectado, principalmente no grupo com dieta padrão, mas não houve diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). A quantificação de células pela área do gânglio mostrou número semelhante entre os grupos sadios e infectados, independente da dieta, os quais não apresentaram diferença estatística entre si ($P > 0,05$), às 20 semanas de infecção (FIGURA 40B).

Figura 40 – Área dos gânglios (A) e número de células dos gânglios (B) do intestino grosso de camundongos não infectados e infectados com *S. mansoni*, alimentados com dieta padrão e hiperproteica, com 20 semanas pós-infecção.



Fonte: Da autora

Nota: Os valores representam a média \pm erro padrão. Grupos sadios (DP, n=8; HP, n=9) e infectados (DP, n=7; HP, n=9) 20 semanas pós-infecção. DP, dieta padrão; HP, dieta hiperproteica. Análise Two-way ANOVA post-test Student-Newman-Keuls.

4.7 MORTALIDADE

A taxa média de mortalidade dos animais foi $15,5 \pm 0,06\%$, não diferindo estatisticamente entre os grupos. Foi possível verificar que os animais alimentados com dieta hiperproteica apresentaram média de mortalidade menor (10%) que os grupos alimentados com dieta padrão ($21,1 \pm 1,55\%$). Quando se avaliou o efeito da doença na taxa de mortalidade, a média foi semelhante quando se comparou os grupos de animais infectados ($16,1 \pm 8,62$) e sadios ($15 \pm 7,07$).

Tabela 7 – Taxa de mortalidade

Grupos experimentais	Número de camundongos experimentados	Mortalidade (Eventos/grupo)	Taxa de mortalidade (%)
DPc-I	9	2	22,2
DPc-S	10	2	20,0
HPc-I	10	1	10,0
HPc-S	10	1	10,0

Fonte: Da autora

Nota: DPc-I: animais infectados, dieta padrão e fase crônica; DPc-S: animais sadios, dieta padrão e fase representativa de infecção crônica; HPc-I: animais infectados, dieta hiperproteica, fase crônica; HPc-S: animais sadios, dieta hiperproteica, fase representativa de infecção crônica.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A elucidação dos mecanismos responsáveis pela patogênese da esquistossomose mansônica requer o desenvolvimento de um modelo experimental que contribua para esclarecer aspectos imunopatológicos da parasitose, particularmente aqueles associados à formação de granulomas e subsequente fibrogênese hepática (ABATH et al., 2006). No entanto, são escassas, na literatura, referências sobre o perfil patológico e imunológico de camundongos infectados com dieta hiperproteica, considerando que o estado nutricional do hospedeiro é tido como um dos prováveis fatores coadjuvantes nessa infecção parasitária (MEKONNEN et al., 2014; ADENOWO et al., 2015; GOES et al., 2012; BARROS et al., 2014).

Os resultados encontrados demonstraram que o consumo de dieta e a ingestão energética foi maior nos animais alimentados com dieta hiperproteica na fase crônica da doença. Mesmo sabendo-se que a proteína é o macronutriente mais saciável, tanto os animais infectados quanto os sadios tiveram maior consumo da dieta hiperproteica, provavelmente por ser a mais palatável (PESTA; SAMUEL, 2014). Além da influência da dieta na ingestão energética, a análise da interação dos fatores mostra que a doença também interferiu no resultado, uma vez que os animais sadios com diet hiperproteica apresentaram maior ingestão na fase crônica da doença. Em relação ao consumo diário de dieta, o tratamento influenciou, mas a doença não. De qualquer forma, sabe-se que a infecção por *S. mansoni* pode aumentar o gasto metabólico do hospedeiro, requerendo um maior consumo energético na tentativa de amplificar a resposta imunológica para restringir as lesões teciduais causadas pelos parasitos, entretanto, a menor ingestão alimentar pelos animais infectados pode ser devido aos sintomas clínicos característicos da forma hepatointestinal da doença crônica que em geral apresentam-se como sensação de plenitude gástrica, náuseas, vômitos, flatulência e anorexia, associados à dor abdominal (COUTINHO et al., 2010; ZAPATERA et al., 2015; SOUZA et al., 2011).

É possível que esse seja também um dos motivos pelos quais a dieta hiperproteica não mostrou diferença estatística para ganho de peso e Índice de *Lee*, que é um preditor para obesidade e tem forte correlação com massa gorda (NOVELLI et al., 2007). Entretanto, Hernandez-Alonso et al. (2015) avaliaram o efeito do consumo de dieta hiperproteica a longo prazo sobre mudanças de peso corporal de indivíduos sadios e concluíram que esse alto consumo de proteínas pode estar relacionado com um maior risco de ganho de peso. Por outro lado, outros estudos indicam que dietas hiperproteicas (>30% de ingestão de energia), têm promovido perda de peso, melhora da composição corporal e resposta glicêmica controlada em humanos e modelos animais (FRENCH et al., 2017).

Mesmo diante das alterações intestinais observadas nos animais infectados, confirmou-se que o conteúdo proteico disponibilizado aos animais foi aproveitado, em função da alta absorção de nitrogênio da dieta obtida. A digestibilidade é determinada pela fração de nitrogênio ingerido que o animal absorve, sendo que o nitrogênio absorvido é obtido pela diferença do nitrogênio ingerido e aquele que aparece nas fezes (COSTA et al., 2014). Esperava-se o resultado encontrado, uma vez que a maior parte dos nutrientes já foram absorvidos no intestino delgado e ao intestino grosso competem outras funções tais como fermentação e absorção de água (WIELEN; MOUGHAN; MENSINK, 2017). Assim, não necessariamente a alteração no intestino implicaria em uma alteração na digestibilidade. Mas, de qualquer forma, faz-se essencial avaliar o intestino grosso, porque ele é o principal foco de escape dos ovos para as fezes (AMARAL et al., 2017; DIAS et al., 2018).

Por outro lado, ofereceu-se uma dieta contendo caseína como principal fonte, sendo que esta apresenta alto valor nutricional comparada a outras fontes protéicas e tem conteúdo relativamente alto de aminoácidos essenciais e boa digestibilidade (HOFFMAN; FALVO, 2004; DÍAZ-RÚA et al., 2017). De qualquer forma, não se sabe se o nitrogênio fecal foi proveniente apenas da proteína da dieta, já que a digestibilidade aparente não leva em conta o nitrogênio excretado nas fezes como resultado de perda endógena da microbiota intestinal ou descamação celular do tubo digestivo (COSTA et al., 2014).

As alterações dos pesos do fígado estão relacionadas com a patologia da esquistossomose que ocorre devido a um grande número de ovos que ficam presos em tecidos como o fígado, em que a reação do hospedeiro resulta em inflamação granulomatosa, com consequente desenvolvimento de hepatoesplenomegalia, quadro característico da fase avançada da esquistossomose mansônica, tanto nos camundongos infectados com dieta padrão como nos alimentados com dieta hiperproteica (ANDRADE, 2009; STAVITSKY, 2004; GRYSSELS, 2012; SILVA et al., 2012).

Além disso, a hepatomegalia guardou relação com a infecção pelo *S. mansoni* e também com a ingestão proteica. O aumento das reservas protéicas e a presença dos granulomas e seus constituintes explicam o maior aumento ponderal verificado no grupo hiperproteico infectado.

A determinação da gordura visceral em animais tem recebido importância devido a sua associação com alterações metabólicas, bioquímicas e aumento do risco de aparecimento de doenças crônicas (ESTADELLA et al., 2004). Nesse trabalho, a dieta não impactou de forma diferente na gordura periepídídima, mas a doença sim, uma vez que os animais infectados apresentaram menor peso de gordura do que os animais sadios. A doença tem provado ser

importante fator de risco para o desenvolvimento de má nutrição e deterioração orgânica associada à infecção (KATONA; KATONA-APTE, 2008).

A quantificação da lesão do fígado baseada na estereologia tem sido uma ferramenta útil para estudos de esquistossomose mansônica (FRIIS et al., 1998; NEVES et al., 2006; BARROS et al., 2009; MACHADO-SILVA, 2010). A análise da interação do tipo de dieta e a condição de saúde dos animais, mostrou que a doença influenciou nos danos na estrutura hepática, mas a dieta não. Isso porque houve redução no volume e número de hepatócitos dos camundongos infectados. Além disso, o aumento da densidade de volume do tecido conjuntivo nos grupos infectados sugere um processo reativo compensatório do estroma em resposta à lesão do parênquima hepático (CORDERO-ESPINOZA; HUCH, 2018). Curiosamente, quando se avaliou a densidade de número de células intersticiais nos animais saudáveis, verificou-se maior número no grupo com dieta hiperproteica. O fígado é o principal órgão que manipula os macronutrientes ingeridos e está associado ao início de diferentes patologias. Nesse sentido, Díaz-Rúa et al. (2017) explicam que ao analisar o fígado de ratos com ingestão prolongada de dieta hiperproteica rica em caseína (45%), os parâmetros relacionados à lesão hepática ficam aumentados e resulta em elevação dos sinais de risco à saúde (aumento da inflamação, alterações no equilíbrio ácido-base e estresse oxidativo).

No início da fase crônica, os granulomas são observados em vários estágios de evolução, incluindo formas involutivas com baixa celularidade e alta densidade de colágeno (DIAS et al., 2019). Durante a fase crônica, a reação inflamatória é contrabalançada pela destruição dos granulomas mais antigos e, em geral, os granulomas da esquistossomose são menores (HAMS et al., 2013; AMARAL et al., 2017). A fase crônica mais avançada é grave, sendo predominantemente caracterizada por fibrose hepática periportal (DIAS et al., 2019).

Em 1964, Andrade e Warren demonstraram uma diminuição no tamanho dos granulomas formados ao redor dos ovos do *S. mansoni* que ocorre na fase crônica da doença, assim como alterações nos constituintes celulares e não celulares que participam desse processo inflamatório. Esse fenômeno na diminuição do tamanho do granuloma observado na infecção tardia tem sido chamado de modulação ou modulação imunológica (RASO et al., 2012). A resposta imune do hospedeiro contra os antígenos dos ovos é mais intensa na fase aguda da infecção, diminuindo durante a fase crônica. Isso acontece porque durante a fase crônica ocorre uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios Th1 (IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ) ao mesmo tempo em que se verifica um ligeiro aumento na secreção de mediadores Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-17), bem como moléculas de células T reguladoras (IL-10 e TGF- β) (BARSOU; ESMAT; EL-BAZ, 2013). Essa transição no perfil de citocinas produzidas leva a uma

diminuição do tamanho dos granulomas recentemente formados (PEARCE; MACDONALD, 2002). Entretanto, não foram evidenciadas diferenças na modulação de acordo com o tipo de dieta consumido pelos animais, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao tamanho e número de granulomas. Sabe-se que o número de granulomas também pode variar de acordo com a oviposição por fêmeas de *S. mansoni*, nível de retenção de ovos nos tecidos do hospedeiro, linhagem do animal e do parasito (LENZI et al., 2006; ARAÚJO et al., 2019)

A composição celular do granuloma esquistossomótico inclui eosinófilos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (SOUZA et al., 2011). Após quantificação da celularidade da bainha do granuloma, verificou-se que na fase crônica as células polimorfonucleares estavam aumentadas no grupo com dieta padrão e as células mononucleares foram predominantes no grupo com dieta hiperproteica. Sendo que em geral, a fase crônica apresentou células mononucleares em maior número. Esse aumento de células mononucleares está intimamente ligado à resposta Th2 que está relacionada com o desenvolvimento da doença crônica (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Na fase crônica, os animais infectados com *S. mansoni* apresentaram granulomas involutivos mais pronunciados, com presença de mais fibras de colágeno, entretanto, não houve diferença entre os grupos com dieta hiperproteica em relação aos animais com dieta padrão. Estudo recente de infecção por *S. mansoni* realizado por Araújo et al. (2019) também encontrou bainha granulomatosa com reduzida celularidade, marcada deposição de matriz colagenosa eosinofílica e fibras de colágeno dissociadas. Como consequência da imunomodulação, granulomas tendem a reduzir seus tamanhos e tornarem-se mais fibróticos (AMARAL et al., 2017).

Da mesma forma, o grupo que recebeu dieta hiperproteica não diferiu do grupo com dieta padrão quanto ao conteúdo de colágeno na bainha do granuloma. Esse dado pode ter sofrido interferência do baixo número de áreas histológicas analisadas nos grupos em estudo. De qualquer forma, a nutrição adequada do hospedeiro favorece a resposta inflamatória, contribuindo para o aumento da colagenização (COUTINHO, 2004). Por outro lado, a deficiência de proteínas interfere diretamente nas alterações do tecido conjuntivo que ocorrem na esquistossomose hepática murina (COUTINHO et al., 2003). Em análise morfométrica (coloração picrosírius) realizada por Barros et al. (2014) revelaram que durante a fase crônica, a síntese de colágeno nos camundongos desnutridos é menor que no grupo bem nutrido. Além disso, esses mesmos autores avaliaram o conteúdo de colágeno por hidroxiprolina no estágio crônico da esquistossomose, e também verificaram menor quantidade de colágeno

(aproximadamente quatro vezes menor) no grupo com dieta hipoproteica quando comparado aos animais bem nutridos (dieta normoproteica).

No nosso estudo, não foi feita a quantificação dos tipos de colágeno, mas pode-se perceber a presença dos tipos de colágeno I e III através da microscopia, sendo notável a presença de fibras de coloração avermelhada, tanto nos animais com dieta padrão quanto no grupo com hiperproteica. Picrosirius é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo que permite análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo. Quando observada sob luz polarizada, pela diferença na interferência de cores, na intensidade e na birrefringência dos tecidos corados, essa coloração permite a diferenciação principalmente das fibras tipo I (birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha) e tipo III (birrefringência verde ou verde-amarela) (BEDOYA et al., 2016).

Como esperado, camundongos pertencentes aos grupos sadios apresentaram estruturas intestinais preservadas. Nos animais submetidos à infecção, foi possível observar a presença de ovos na mucosa e submucosa do órgão, com ou sem a presença de granulomas. A presença de granulomas pode levar a alterações na arquitetura da mucosa intestinal (SIQUEIRA et al., 2010).

Comparados aos camundongos alimentados com dieta padrão, os animais com dieta hiperproteica demonstraram maior espessura das camadas mucosa, muscular da mucosa e comprimento de criptas e menores espessuras da camada muscular interna. Azevedo et al. (2014) relataram que os animais bem nutridos (20% de proteína) normalmente apresentam a mucosa do intestino mais espessa, quando comparados aos desnutridos, sendo a perda da mucosa uma ocorrência frequente nos animais com dieta hipoproteica (4% de proteína). Embora a esquistossomose afete a mucosa intestinal, há poucos estudos sobre sua avaliação em termos de mudanças na mucosa. As alterações histológicas podem ser devido à presença de ovos e granulomas observados nas camadas muscular e mucosa. Couto e seus colaboradores (2002) avaliaram alterações estruturais na mucosa jejunal de camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hipoproteica (5% de proteína) e normoproteicas (20% de proteína) e consideraram que nos seus estudos morfométricos a espessura da mucosa jejunal foi maior nos animais infectados devido à inflamação e formação dos granulomas, tendo as dietas pouca influência nesse resultado.

No intestino grosso dos animais infectados com *S. mansoni* a resposta inflamatória ao redor dos ovos do parasito é útil para que estes consigam atravessar as camadas do intestino em direção à luz do órgão para serem eliminados juntamente com as fezes, completando o ciclo de vida do parasito (AMARAL et al., 2017; DIAS et al, 2018).

Sabe-se que no intestino encontramos dois plexos ganglionares que fazem parte do sistema nervoso entérico, o mioentérico e o submucoso. Os sistemas nervoso e endócrino controlam em conjunto movimentos intestinais, secreção de suas glândulas, participam indiretamente nos processos de digestão e absorção de nutrientes. Além disso, estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e mesmo em processos patológicos do trato digestivo (FREITAS-RIBEIRO et al., 2012). Portanto, avaliamos a área de gânglios dispersos ao longo do intestino grosso dos animais e verificamos que as áreas dos gânglios se apresentaram maiores no grupo de animais infectados, mas não diferiram estatisticamente entre os grupos. Os gânglios encontrados neste plexo variam no tamanho e na forma (GABELLA, 1981). Por outro lado, na presença da infecção os gânglios podem ser mais exigidos para garantir o peristaltismo e, portanto, apresentarem-se aumentados.

A taxa de mortalidade analisada ao longo do experimento não evidenciou diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos grupos experimentais avaliados, de forma que nem a infecção e nem a dieta influenciaram nesse resultado. Sugere-se que o cuidado no manejo rotineiro e na manutenção dos animais no decorrer da pesquisa tenha contribuído para aumentar o bem-estar animal.

Diante disso, os achados histopatológicos e estereológicos indicaram que os grupos infectados sofreram remodelamento patológico. Esse achado foi consistente com os danos teciduais característicos da esquistossomose crônica, especialmente no fígado (LENZI et al., 2008; ANDRADE, 2009). Além disso, a dieta foi capaz de induzir danos morfológicos ao fígado e intestino desses animais, que além dos granulomas esquistossomóticos, apresentaram hipertrofia hepática, processo inflamatório e possível fibrose tecidual.

6 CONCLUSÃO

Considerados em conjunto, os nossos achados indicaram que embora os animais infectados por *S. mansoni* tenham apresentado marcante remodelamento microestrutural no intestino grosso, essas alterações não foram suficientes para modificar a digestibilidade da dieta hiperproteica. Além disso, os animais infectados e tratados com dieta hiperproteica apresentaram menor ingestão energética em relação aos sadios. Dessa forma, uma menor ingestão alimentar pode ser devido aos sintomas clínicos característicos da forma hepatointestinal da doença crônica, principalmente perda de apetite. Entretanto, a infecção por *S. mansoni* aumenta o gasto metabólico do hospedeiro, requerendo um maior consumo energético, sendo essa proposição reforçada pela drástica redução da gordura periepídimal nos grupos infectados. Isso pode acontecer na tentativa de amplificar a resposta imunológica para restringir as lesões teciduais causadas pelos parasitos, incluindo a inflamação granulomatosa que se estabelece em múltiplos órgãos e tecidos. Embora a dieta hiperproteica não tenha influenciado no número e volume dos granulomas, pôde-se evidenciar hipertrofia hepática acompanhada de redução da densidade de hepatócitos em animais tratados com dieta hiperproteica. Diante disso, evidencia-se que a dieta hiperproteica possa favorecer danos morfológicos teciduais, especialmente hepáticos, característicos da patogênese da esquistossomose.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, v.22, n.2, p. 85-91, 2006.
- ADENOWO, A. F. et al. Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 196–205, 2015.
- AJIBOLA, O. et al. Tools for detection of schistosomiasis in resource limited settings. **Medical Sciences**, v. 6, n. 39, p. 1-12, 2018.
- AKPOM, C. A.; WARREN, K. S. Calorie and protein malnutrition in chronic murine schistosomiasis mansoni: effect on the parasite and the host. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 1, 1975.
- ALENCAR, A. C. M. B. et al. High fat diet has a proeminente effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4. p. 608-613, 2009.
- ALENCAR, A. C. M. B. et al. Changes in the small intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice fed a high-fat diet. **Parasitology**, v. 139, p. 716-725, 2012.
- ALVES, C. C. et al. Parasitological, pathological, and immunological parameters associated with *Schistosoma mansoni* infection and reinfection in BALB/c and C57BL/6 mice. **Journal of Parasitology**, v. 3, n. 102, p. 336-341, 2016.
- AMARAL, K. B. et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 0184696, 2017.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v.31, p. 656-663, 2009.
- 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. 53-57, 1964.
- ARAÚJO, M. P. et al. Impact of *Paracoccidioides brasiliensis* coinfection on the evolution of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous liver injury in mice. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1-11, 2019.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Washington, 2000.
- AZEVEDO, J. F. et al. Probiotics protect the intestinal wall of morphological changes caused by malnutrition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1303-1314, 2014.

- BARBOSA, C. S. et al. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 53, n. 2, p. 110-114, 2017
- BARROS, L. A. et al. Effects of low-protein diet on *Schistosoma mansoni* morphology visualized by morphometry and confocal laser scanning microscopy. **Journal of Helminthology**, v. 83, p. 13-21, 2009.
- BARROS, A. F. et al. Low transformation growth factor- β 1 production and collagen synthesis correlate with the lack of hepatic periportal fibrosis development in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 210–219, 2014.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013.
- BRUNETTO, M. A. et al. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, supl. 2, p. 230-232, 2007.
- CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 109–17, 2008a.
- CALDAS, I. S. et al. Benzinidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Res**, v. 103, p. 413–421, 2008b.
- CALDER, P. C. Feeding the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.72, p. 299–309, 2013.
- CAMPBELL, J. A. **Food and nutrition board**. Committee on Protein Quality. Evaluation of Protein Quality. p. 31-32, 1963.
- CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 1124p.
- CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 141–150, 2014.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, p. 2253-2264, 2014.
- CORDERO-ESPINOZA, L.; HUCH, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 1, 2018.
- COSTA, N. M. B. et al. **Nutrição experimental – teoria e prática**. Rio de Janeiro: Rubio, 2014.
- COUTINHO, E. M. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 85-92, 2004.

COUTINHO, E. M. et al. Pathogenesis of schistosomal “pipestem” fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 78, p. 337–342, 1997.

COUTINHO, E. M. et al. Host nutritional status as a contributory fator to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7. p. 919-925, 2003.

COUTINHO, E. M. et al. Manson’s schistosomiasis in the undernourished mouse: Some recent findings. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 359–366, 2010.

COUTINHO, E. M. et al. The use of protein hydrolysate improves the protein intestinal absorption in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 585-590, 2002.

BEDOYA, S. A. O. et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**,v. 68, n. 1, p.147 -154, 2016.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-8, 1968.

COUTO, J. L. A. et al. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 601-607, 2002.

COUTO, J. L. A. et al. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropica**, v. 41, n. 4. p. 390-393, 2008.

COUTO, J. L. A. et al. Esquistossomose murina associada à desnutrição: alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 1, p. 54-66, jan.-abr, 2007.

CZERWONOGRODZKA-SENCZYNA, A. Nutrition and immune system in children with simple obesity. **Adv Exp Med Biol**, v. 878, p. 49-56, 2016.

DA SILVA, A. M. et al. A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice. **Experimental Parasitology**, v. 132, p.193-199, 2012.

DIAS, F. F. et al. Identification of piecemeal degranulation and vesicular transport of MBP-1 in liver-infiltrating mouse eosinophils during acute experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-14, 2018.

DIAS, M. V. et al. Doxycycline hyclate: A schistosomicidal agente *in vitro* with immunomodulatory potential on granulomatous inflammation *in vivo*. **International Immunopharmacology**, v. 70, p. 324-337, 2019.

DÍAZ-RÚA, R. et al. Long-term intake of a high-protein diet increases liver triacylglycerol deposition pathways and hepatic signs of injury in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 46, p. 39-48, 2017.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v.20, p. 218-224, 2004.

FREITAS-RIBEIRO, G. M. et al. Endocrine cells and nerve ganglia of the small intestine of the Opossum *Didelphis aurita* Wied-Neuwied, 1826 (Mammalia: Didelphidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 3, p. 747-757, 2012.

FRENCH, W. W. et al. A high-protein diet reduces weight gain, decreases food intake, decreases liver fat deposition, and improves markers of muscle metabolism in obese Zucker rats. **Nutrients**, v. 9, n. 587, 2017.

FRIIS, H. et al. The use of a stereological method to estimate the volume of *Schistosoma mansoni* granulomas: the effect of zinc deficiency. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 92, p. 785-792, 1998.

GABELLA, G. Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. **Neuroscience**, v. 6, p. 425-436, 1981.

GOES, V. C. et al. Effects of high-fat chow on heart tissue in acute and chronic experimental murine schistosomiasis mansoni. **Parasitology**, v. 139, 1462–1470, 2012.

GOMES, E. C. S. et al. Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 4, p. 822-834, 2016.

GRAY, D. J.; ROSS, A. G.; LI, Y. S.; McMANUS, D. P. Diagnosis and management of schistosomiasis. **BMJ**, v. 342, p. 1-11, 2011.

GRYSSELS, B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin N Am**, v. 26, p.383–397, 2012.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-8, 2013.

HELMY, M. M. F.; MAHMOUD, S. S.; FAHMY, Z. H. *Schistosoma mansoni*: effect of dietary zinc supplement on egg granuloma in Swiss mice treated with praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 310–317, 2009.

HERNÁNDEZ-ALONSO, P. et al. High dietary protein intake is associated with an increased body weight and total death risk. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 2, p. 496-506, 2015.

HOFFMAN, J. R.; FALVO, M. J. Protein – which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, p. 118-130, 2004.

KATONA, P.; KATONA-APTE, J. The interaction between nutrition and infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1582–8, 2008.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A. Simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop**, v.14, p.397- 400, 1972.

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

KRAWINKEL, M. B. Interaction of nutrition and infections globally: an overview. **Ann Nutr Metab**, v. 61 (suppl 1), p. 6139–45, 2012.

LINS, R. A. B. et al. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 173-178, 2008.

LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, (Suppl. I), p. 141-151, 1998.

LENZI, H. L. et al. In: *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico. 20. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p. 569–654.

LIISBERG, U. et al. The protein source determines the potential of high protein diets to attenuate obesity development in C57BL/6J mice. **Adipocyte**, v. 5, n. 2, p. 196-211, 2016.

MACHADO-SILVA, J. R. et al. Hepatic stereology of acute schistosomiasis mansoni infection in C57BL/10 and CBA mice. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 3, p. 211-219, 2010.

MAGALHÃES, L. A. et al. Influência da dieta hiperglicêmica e do diabetes aloxânico sobre a vitalidade do *Schistosoma mansoni* sambon, 1907, em camundongos experimentalmente infectados. **Revista de Saúde Pública**, v. 12, p. 267-76, 1978.

MAGALHÃES - FILHO, A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na esquistossomose mansônica humana. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 2, p. 251 - 259, 1961.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Braz Sci**, v. 75, p. 469-86, 2003.

MARQUES, D. V. B. et al. Could diet composition modulate pathological outcomes in schistosomiasis mansoni? A systematic review of *in vivo* preclinical evidence. **Parasitology**, v. 145, n. 9, p. 1127-1136, 2018.

MEKKONEN, Z. et al. *Schistosoma mansoni* infection and undernutrition among school age children in Fincha'a sugar estate, rural part of West Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 763, 2014.

MORAES E. A. et al. Qualidade proteica e eficiência alimentar de farinhas integrais de linhaça obtidas de sementes cruas e submetidas a tratamento térmico. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p-531-6, 2010.

MORAES, E. A. et al. In vivo protein quality of new sorghum genotypes for human consumption. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1549–1555, 2012.

MUNISI, D. Z. et al. *Schistosoma mansoni* infections, undernutrition and anaemia among primary schoolchildren in two onshore villages in Rorya District, North-Western Tanzania. **PLoS ONE**, v. 11, p. 0167122, 2016.

NERY, C. S. et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Rev Bras Med Esporte**, v. 17, n. 1, 2011.

NEVES, R. H. et al. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 (Suppl. I), p. 253-260, 2006.

NOVAES, R. D. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces morphological reorganization of the myocardium parenchyma and stroma, and modifies the mechanical properties of atrial and ventricular cardiomyocytes in rats. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 4, p. 270–279, 2013.

NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, p. 111-119, 2007.

OLIVEIRA, A. C. et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5688–5696, 2004.

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

PESTA, D. H.; SAMUEL, V. T. A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 53, 2014.

PORDEUS, C. L. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiol Serv Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163-75, 2008.

PRAZERES, F. G. et al. Exercício físico, crescimento e desenvolvimento: estudo em ratos jovens desnutridos pela dieta básica regional (DBR) e recuperados nutricionalmente. **Rev. bras. Educ. Fís. Esp**, v.18, n.1, p.7-16, 2004.

RASO, P. et al. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 627-632, 2012.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN- 93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J. Nutr**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

REIS, L. F. et al. Quantitave and qualitative interferences of pentoxifillyne on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 107–112, 2001.

RODRIGUES, G. C. et al. Forma pseudoneoplásica de esquistossomose pulmonar crônica sem hipertensão pulmonar. **J Bras Pneumol**, v. 35, n. 5, p. 484-488, 2009.

RODRIGUES, J. P. F. et al. *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43–52, 2017.

SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v.26, p.57-63, 1970.

SILVA, L. M. et al. Significance of schistosomal granuloma modulation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p., 353-361, 2000.

SILVA, K. E. R. et al. Alternativas terapêuticas no combate à esquistossomose mansônica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2012.

SIQUEIRA, L. T. et al. Analysis of plasma citrulline and intestinal morphometry in mice with hepatosplenic schistosomiasis. **Surgical Infections**, v. 11, n. 5, p. 419-426, 2010.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 300-7, 2011.

STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 1–12, 2004.

VITORINO, R. R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Bras Clin Med**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012.

WIELEN, N.; MOUGHAN, P. J.; MENSINK, M. Amino acid absorption in the large intestine of humans and porcine models. **The Journal of Nutrition**, v. 147, p. 1493–8, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**. Geneve, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> Acesso em: 10 Oct. 2017.

ZAPATERA, B. et al. Immunonutrition: methodology and applications. **Nutr Hosp**, v. 31 (Supl. 3), p. 145-154, 2015.

ANEXO 1 – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito da dieta hipeproteica no desenvolvimento da esquistossomose experimental", registrada com o nº 06/2017, sob a responsabilidade de Alessandro Antônio Costa Pereira, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 09/02/2017 a 01/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	120
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 09 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Coordenador CEUA-UNIFAL