

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Impacto da desnutrição proteico-energética na infecção experimental por**  
*Schistosoma mansoni*

**por**

**Poliane Silva Maciel**

**Belo Horizonte**

**2019**

<b>DISSERTAÇÃO</b>	<b>MCS-IRR</b>	<b>P.S. MACIEL</b>	<b>2019</b>
--------------------	----------------	--------------------	-------------

**POLIANE SILVA MACIEL**

**Impacto da desnutrição energético-proteica na infecção experimental por**

*Schistosoma mansoni.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Cristina Toscano Fonseca

Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

**Belo Horizonte**

**2019**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

M152i Maciel, Poliane Silva.  
2019

Impacto da desnutrição proteico-energética na infecção experimental por *Schistosoma mansoni* / Poliane Silva Maciel – Belo Horizonte, 2019.

XV, 103, f.: il.: 210 x 297mm.

Bibliografia: 80-102

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Desnutrição proteico/parasitologia 2. Esquistossomose 3. Sistema Imune I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano; Antonelli, Lis Ribeiro do Valle (Orientação).

CDD – 22. ed. –616.963

**POLIANE SILVA MACIEL / 2019**

**Impacto da desnutrição energético-proteica na infecção experimental por  
*Schistosoma mansoni*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca (IRR/Fiocruz Minas) - Presidente

Profa. Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (IRR/Fiocruz Minas) - Presidente

Profa. Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR/Fiocruz Minas) – Titular

Profa. Dra. Joana Ferreira do Amaral (UFOP) - Titular

Profa. Dra. Marina de Moraes Mourão (IRR/Fiocruz Minas) – Suplente

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 25/02/2019.**

*Ao meu esposo Jonathan  
por ter sido essencial nesta jornada!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força nos momentos difíceis e por todas as bênçãos concedidas.

Às minhas queridas orientadoras Kika e Lis, por terem aberto as portas do laboratório para mim e pela confiança. Mesmo, a princípio, eu sendo uma desconhecida, vocês acreditaram em mim e me deram a oportunidade de realizarmos em conjunto um projeto que envolvesse Nutrição, Esquistossomose, Imunologia. Serei eternamente grata por esta excelente oportunidade. Muito obrigada também pela orientação e ensinamentos valiosos, compartilhados nestes dois anos. E que venham novos desafios!

Ao Professor Ricardo Gonçalves por toda amizade, a qual foi iniciada na minha amada UFOP. Se hoje estou na Fiocruz Minas, devo isso a você também. Agradeço a você e à Flávia pela colaboração em nosso projeto.

À Dra. Rosiane Pereira por toda colaboração, atenção e ensinamentos. Aprendi muito com você.

Às amigas Gardenia e Luara por terem me ensinado a dar os primeiros passos nesta jornada acadêmica. O apoio e o suporte de vocês foram imprescindíveis. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim. Vocês são muito especiais.

Às amigas Gabriela, Patrícia e Priscilla, por serem pessoas tão especiais em minha vida. A amizade de vocês foi fundamental para que essa jornada tenha sido mais leve, prazerosa e feliz. Obrigada por todos os momentos que vivenciamos juntas e por toda ajuda.

Às amigas Clarice e Mariana por serem sido tão solícitas nos momentos em que precisei de ajuda.

À Sueleny e Rafaela pela valiosa ajuda nos experimentos realizados no biotério.

A todos do Grupo de Pesquisa em Biologia e Imunologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias, muito obrigada. Tenham a certeza que cada um de vocês contribuiu para que esse projeto fosse realizado. Vocês foram muito importantes por esta conquista.

Ao meu esposo Jonathan por todo amor, compreensão, incentivo e por acreditar em mim. Seu apoio foi fundamental para que esta jornada fosse concluída. Amo você.

Aos meus pais, Antônio e Efigênia, a minha irmã Sheila e ao meu sobrinho, Matheus, pelo apoio incondicional nos momentos alegres e nos mais difíceis também. Obrigada pela compreensão nas diversas vezes que precisei ficar ausente.

À equipe do Biotério e à Plataforma de Citometria de Fluxo do IRR, em especial à Lorena, pelo excelente serviço prestado.

À equipe da Plataforma de Microscopia Confocal e Fluorescência do IRR por todo suporte.

À equipe do Núcleo de Esterilização e do Biotério, pelo apoio e pela colaboração.

À Coordenação e funcionários da Pós-Graduação e a todos os colegas de curso.

À Biblioteca do IRR por fornecer acesso à informação técnico-científica.

Aos funcionários do IRR que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

A todos vocês, que fazem parte da minha história, muito obrigada!

## **AGRADECIMENTO À AGÊNCIA FINANCIADORA**

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de mestrado concedida.

## RESUMO

Esquistossomose e desnutrição são importantes problemas de saúde pública que acometem uma parcela significativa da população mundial, sendo mais frequentes em países em desenvolvimento. A imunidade ou a susceptibilidade a diversas doenças infecto-parasitárias estão diretamente relacionadas ao estado nutricional dos indivíduos. Desse modo, devido às lacunas existentes nos mecanismos que medeiam essa relação, mais estudos são necessários. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar o impacto de diferentes dietas restritivas na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*. Para isso, os animais foram divididos em cinco grupos: Controle (CTL) (alimentados com dieta contendo 14% de proteína e 10% de lipídios); Hipoproteico 3% e 8% (HPT 3% e 8%) (alimentados com dieta hipoproteica contendo 3% e 8% de proteína, respectivamente); Hipolipídico 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%) (alimentados com dieta hipolipídica contendo 2,5 e 5% de lipídios, respectivamente). No momento em que houve uma diferença de peso de, aproximadamente, 20% entre os animais do grupo HPT 3% e o CTL, procedeu-se à infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Cinquenta dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e os vermes recuperados do sistema porta hepático por perfusão das veias mesentéricas. Fragmentos de fígado e intestino foram retirados e digeridos com KOH a 10%, a fim de determinar o número de ovos presentes nesses órgãos. Para avaliação do perfil de reposta imune, amostras de sangue foram coletadas em três momentos do período experimental: tempo zero, antes da infecção e antes da perfusão. Animais do grupo HPT 3% apresentaram perda ponderal significativa, além de diminuição dos níveis séricos de albumina e do consumo de ração e de proteínas, em relação ao CTL, caracterizando um quadro de desnutrição proteico-energética (DPE). Em nenhum dos grupos houve diferença na média do número de vermes recuperados pela perfusão e de ovos presentes no fígado. Porém, foi observado uma redução significativa no número de ovos retidos no intestino e na área do granuloma hepático do grupo HPT 3%. A dieta hipoproteica 3% impactou na fecundidade de fêmeas de *S. mansoni*, uma vez que houve uma redução na postura de ovos no intestino de animais que receberam essa dieta. Em animais do grupo HPT 3%, após a infecção, não se detectou aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ . A restrição de lipídios na dieta aumentou a produção de IL-2 e IL-17, em camundongos do grupo HPL 2,5% e de IL-10 no grupo HPL 5%, com relação ao CTL. Além disso, os resultados mostraram que a dieta hipoproteica 3% induziu um quadro de DPE em camundongos, os quais apresentaram alterações características desse quadro de carência nutricional. Portanto, os dados deste trabalho demonstram que se estabeleceu um modelo de DPE, com a utilização da dieta hipoproteica 3%, a qual será utilizada em um próximo passo para avaliar o impacto da desnutrição no desenvolvimento da resposta imune protetora induzida pela vacinação com o antígeno Sm14 do *Schistosoma mansoni*.

**Palavras-chave:** desnutrição proteico-energética, esquistossomose, sistema imune.

## **ABSTRACT**

Schistosomiasis and malnutrition are important public health problems that affect a significant portion of the world's population, being more frequent in developing countries. Immunity or susceptibility to various infectious parasitic diseases are directly related to the nutritional status of the individuals. Thus, due to the gaps in the mechanisms that mediate this relation, more studies are needed. This work aimed to evaluate the impact of different restrictive diets on experimental infection by *Schistosoma mansoni*. Hence, the animals were separated into five groups: Control (CTL) (fed with diet containing 14% of protein and 10% of lipids); Hypoproteic 3% and 8% (HPT 3% and 8% respectively) (fed with a low-protein diet containing 3% and 8% of protein); Hypolipid 2,5% and 5% (HPL 2,5% and 5%) (fed a low-fat diet containing 2,5% and 5% lipids, respectively). At the moment when there was a weight difference of approximately 20% between the animals of the HPT 3% group and the CTL, they were infected with *Schistosoma mansoni*. Fifty days after infection, the animals were euthanized and the worms were recovered from the hepatic portal system by perfusion of the mesenteric veins. Fragments of liver and intestine were removed and digested with 10% KOH in order to determine the number of eggs present in these organs. To evaluate the immune response profile, blood samples were collected at three moments of the experimental period: at the start of the study at zero time, before infection and before perfusion. Animals from the HPT 3% group showed significant weight loss, as well as a decrease in serum albumin levels. In addition, these animals consumed less food in comparison to CTL group, resulting in reduced protein consumption, characterizing protein-energy malnutrition (PEM). Neither of the groups presented differences between the mean number of worms recovered by perfusion and number of eggs present in the liver. However, a significant reduction in the number of trapped eggs in the intestine and in the area of the hepatic granuloma of the HPT 3% group was observed. The 3% hypoproteic diet had an impact on the fecundity of *S. mansoni* females, since there was a reduction in egg laying in the intestine of animals that received this diet. In the animals from the HPT 3% group, after infection, no increase of TNF- $\alpha$  levels was detected. The dietary lipid restriction increased IL-2 and IL-17 production in mice of the HPL 2,5% group and IL-10 in the HPL 5% group, in relation to CTL group. Furthermore, the results demonstrated that the hypoproteic diet 3% induced a pattern of protein-energy malnutrition in mice, which presented a typical change of this nutritional deficiency. Therefore, in this study it was established a model of malnutrition using the hypoproteic diet 3%, which will be used in a next step of the study to evaluate the impact of malnutrition on the development of protective immune response induced by vaccination with *Schistosoma mansoni* Sm14 antigen.

**Key words:** protein-energy malnutrition, schistosomiasis, immune system.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> - Mapa da fome 2017. ....	15
<b>Figura 2</b> - Relação entre desnutrição, infecção e imunidade.....	19
<b>Figura 3</b> - Principais parâmetros do sistema imune afetados pela DPE.....	24
<b>Figura 4</b> - Distribuição da esquistossomose no mundo.....	25
<b>Figura 5</b> - Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	28
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática do delineamento experimental.....	42
<b>Figura 7</b> - Evolução da massa corporal ao longo do período experimental em camundongos alimentados com diferentes dietas.....	52
<b>Figura 8</b> - Consumo diário de ração e de proteína em camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais. ....	53
<b>Figura 9</b> - Concentrações de proteínas totais, albumina e hemoglobina ao longo do tempo em camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais. ....	57
<b>Figura 10</b> - Número de vermes recuperados de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.....	58
<b>Figura 11</b> - Número de ovos retidos no fígado e intestino de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.....	59
<b>Figura 12</b> - Fecundidade das fêmeas de <i>S. mansoni</i> de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.....	60
<b>Figura 13</b> - Área do granuloma hepático de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.....	62
<b>Figura 14</b> - Avaliação do perfil de resposta celular de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.....	65

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Sumário das principais alterações encontradas em modelos experimentais de desnutrição .....	35
<b>Tabela 2</b> - Composição das dietas experimentais .....	41
<b>Tabela 3</b> - Quantidade de cada componente necessário para avaliação sérica de proteínas totais .....	44
<b>Tabela 4</b> - Quantidade de cada componente necessário para avaliação sérica de albumina ...	45
<b>Tabela 5</b> - Quantidade de cada componente necessário para avaliação sérica de hemoglobina .....	46
<b>Tabela 6</b> - Limite de detecção de citocinas.....	49

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**A<sub>i</sub>**: Antes da infecção

**A<sub>p</sub>**: Antes da perfusão

**ASPEN**: Sociedade Americana de Nutrição Parenteral e Enteral, do inglês: *American Society for Parenteral and Enteral*

**BIOP**: Biotério de Produção

**CBA**: Ensaio com beads em citometria, do inglês: *Cytometric Bead Array*

**CEUA**: Comissão de Ética de Uso de Animais

**CTL**: Controle

**DALY**: *Disability-Adjusted Life Years*

**DBR**: Dieta básica regional

**DPE**: Desnutrição proteico-energética

**EDTA**: Etilenodiaminotetracético, do inglês: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

**FABPs**: Proteínas ligadoras de ácidos graxos, do inglês: *fatty acid binding proteins*

**FAO**: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês, *Food and Agriculture Organization*

**HE**: Hematoxilina e Eosina

**HI**: Hemiglobina

**HiCN**: Cianeto de hemiglobina

**HPL 2,5%**: Hipolipídico 2,5%

**HPL 5%**: Hipolipídico 5%

**HPT 8%**: Hipoproteico 8%

**HPT3%**: Hipoproteico 3%

*Lista de siglas e abreviaturas*

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IFN- $\gamma$ :** Interferon-gama

**IFPRI:** Instituto Internacional de Pesquisas sobre Políticas Alimentares, do inglês: *International Food Policy Research Institute*

**Ig:** Imunoglobulina

**IgAs:** IgA secretora

**IL:** Interleucina

**KOH:** Hidróxido de Potássio

**LDL:** Lipoproteína de baixa densidade, do inglês: *Low Density Lipoproteins*

**NK:** células *natural killer*

**ONU:** Organização das Nações Unidas

**POF:** Pesquisa de Orçamentos Familiares

**T<sub>0</sub>:** tempo zero

**TfR-1:** Receptor de transferrina 1, do inglês, *transferrin receptor 1*

**TGF- $\beta$ 1:** Fator de crescimento transformador beta 1, do inglês: *Transforming Growth factor beta-1*

**Th1:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 1, do inglês: *T helper cells type 1*

**Th2:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 2, do inglês: *T helper cells type 2*

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ , do inglês: *tumor necrose factor  $\alpha$*

**T<sub>0</sub>:** tempo zero

**UNICEF:** Fundo das Nações Unidas para a Infância

**WHO:** Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Desnutrição .....	14
1.2 Desnutrição e sua relação com o sistema imune .....	18
1.3 A Esquistossomose.....	24
1.3.1 Ciclo de desenvolvimento do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	26
1.3.2 Imunopatologia da Esquistossome mansoni.....	28
1.4 Desnutrição e esquistossomose .....	31
1.5 Modelos experimentais de desnutrição .....	34
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 Animais .....	40
4.2 Dietas experimentais .....	40
4.3 Delineamento experimental.....	41
4.4 Avaliação nutricional dos animais .....	43
4.4.1 Proteínas totais .....	43
4.4.2 Albumina.....	44
4.4.3 Hemoglobina .....	45
4.5 Infecção dos animais .....	46
4.6 Perfusão dos animais.....	47
4.7 Contagem do número de ovos e avaliação histopatológica.....	47
4.8 Avaliação da fecundidade de fêmeas .....	48
4.9 Avaliação do perfil de resposta imune dos animais .....	48
4.10 Análise estatística.....	49
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1 Avaliação do estado nutricional dos animais estudados.....	51
5.1.1 Evolução ponderal ao longo do período experimental .....	51
5.1.2 Determinação do consumo de ração e proteínas .....	52
5.1.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	54
5.2 Avaliação parasitológica: determinação da carga parasitária e do número de ovos .....	58
5.3 Avaliação da produção de citocinas .....	62
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>

*Sumário*

<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO I - Licença do CEUA.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

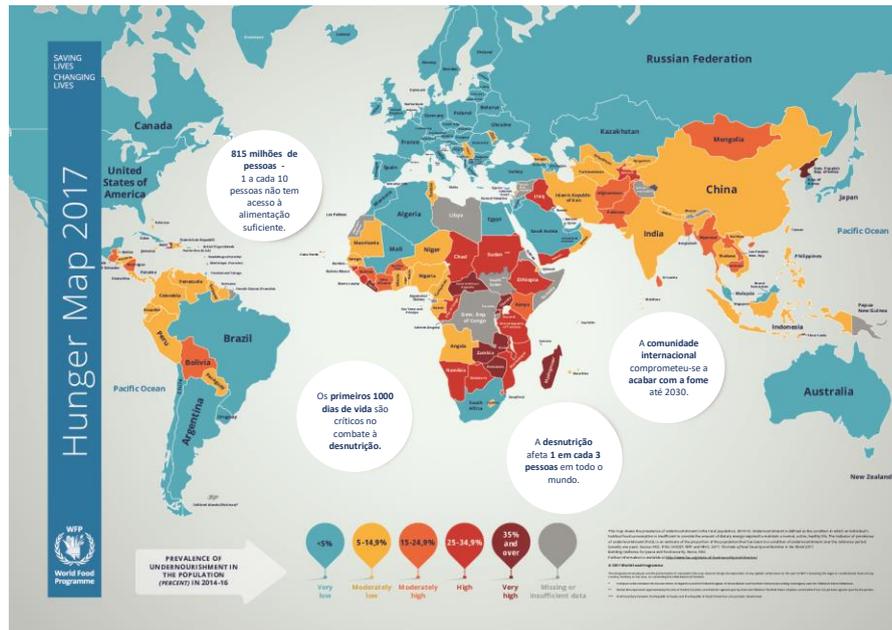
### 1.1 Desnutrição

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a desnutrição é uma condição fisiológica anormal, desencadeada pelo consumo inadequado, desbalanceado ou excessivo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios) e/ou micronutrientes (vitaminas e minerais), fundamentais para o desenvolvimento do organismo (FAO, 2012). Recentemente, tem-se discutido sobre a obesidade ser classificada como um terceiro tipo de desnutrição; neste caso, não relacionada à falta de alimentos, mas sim à ingestão excessiva ou desbalanceada de nutrientes. Assim, a desnutrição pode ser classificada em três categorias: (a) desnutrição, (b) deficiência de micronutrientes e (c) sobrepeso e obesidade (WHO, 2018a).

Apesar dos numerosos avanços nos cuidados com a saúde, a desnutrição ainda é um dos principais problemas de saúde pública do século XXI. O relatório *The State of Food Security and Nutrition in the World*, publicado em 2018 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), mostra que o número de pessoas acometidas pela desnutrição crônica aumentou de 804 milhões, em 2016, para 815 milhões em 2017, o que corresponde a 11% da população mundial. (FAO; WHO, 2018). A distribuição global da desnutrição está representada na **figura 1**.

Indivíduos acometidos pela desnutrição crônica encontram-se predominantemente em regiões em desenvolvimento: são 515,1 milhões na Ásia (11,4%), 256,5 milhões na África (20,4%), 39,3 milhões na América Latina e Caribe (6,1%) e 2,8 milhões na Oceania (7%). Ainda que exista uma tendência global de diminuição no número de indivíduos desnutridos, em algumas nações da África subsaariana, por exemplo, a desnutrição incide de forma alarmante em 23,2% de seus habitantes. Em regiões desenvolvidas, a desnutrição acomete cerca de 15 milhões de pessoas (FAO; WHO, 2018).

Globalmente, a desnutrição crônica afeta 151 milhões de crianças menores que 5 anos, o que corresponde a uma prevalência de 22,2% (UNICEF; WHO, 2018). Dados mais recentes da OMS apontam que a desnutrição é responsável por 3,1 milhões de mortes em crianças (45% da mortalidade infantil). Dada a importância epidemiológica e a relevância da doença, a OMS cita a desnutrição como a maior ameaça à saúde pública mundial (COHEN, et al., 2017).



**Figura 1 - Mapa da fome 2017.** Fonte: Adaptado de WHO, 2018.

No Brasil, dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), através da Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008-2009, mostraram redução nos índices de desnutrição em crianças com idade inferior a 5 anos. Nas regiões Norte e Nordeste, os índices são entre 8,5% e 5,9%. Já nas regiões Sudeste e Sul, esse percentual encontra-se entre 6,1% e 3,9% e na região Centro-oeste corresponde a 6,1% (POF, 2008-2009) (BRASIL, 2010). No Brasil, estimativas da POF (2008-2009) e da FAO/WHO (2018) mostram que as taxas de desnutrição se encontram entre 6% a 7%, em crianças menores de 5 anos de idade.

A implementação de programas sociais que garantem a segurança alimentar da população contribuiu de forma significativa para essa redução (IFPRI, 2016). Não temos dados mais recentes de inquéritos nacionais, a respeito dos dados antropométricos da população brasileira. Essas informações serão coletadas na futura Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS), segundo informações do IBGE.

Todavia, um relatório elaborado por cerca de 20 entidades da sociedade civil e apresentado em julho de 2017, sobre o desempenho do Brasil no cumprimento dos 17 objetivos de desenvolvimento sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU), traz um alerta sobre o risco de o país retornar ao Mapa da Fome. Intitulado “Relatório Luz”, o estudo indica a iminência de o Brasil voltar ao mapa da fome apenas três anos após deixar de figurar entre os países que o integram, um resultado preocupante diante dos compromissos de erradicar a pobreza e eliminar a fome, assumidos como parte dos Objetivos do Desenvolvimento

## *Introdução*

Sustentável, a serem cumpridos até 2030. O relatório revela ainda que o risco se deve a uma combinação de fatores registrados desde 2015, como a alta do desemprego, o avanço da pobreza e o congelamento de gastos públicos (FIOCRUZ, 2018).

Etiologicamente, a desnutrição está associada à fome, ao consumo de dietas inadequadas em termos qualitativos e quantitativos e a outras doenças que, por ventura, aumentam a demanda pelo uso de nutrientes pelo organismo e/ou causam um desequilíbrio na absorção, digestão e excreção dos mesmos (JENSEN et al., 2009; GAT-YABLONSKI et al., 2013). Assim, vários tipos de desnutrição podem ser desencadeados de forma independente ou simultânea a diversas patologias (STINNETT, 1983; SAUNDERS; SMITH, 2010).

A desnutrição desenvolve-se progressivamente no organismo e modifica a biodisponibilidade de nutrientes no sangue, levando a alterações metabólicas adaptativas, com o intuito de manter a homeostase (MONTE, 2000). Sua instalação e gravidade dependem das causas, intensidade e duração da carência, e nos casos severos pode levar o indivíduo a óbito (BONANNI, 2011)

Atualmente, o tipo de desnutrição que prevalece no âmbito mundial é a desnutrição proteico-energética (DPE) (KEUSCH, 2003; IYER et al., 2012; RHO et al., 2017; SISODIA; AKERKAR, 2018), que segundo a OMS caracteriza-se como uma gama de condições patológicas com deficiência simultânea de proteínas e calorias em diversas proporções e comumente acompanhada de infecções (WHO, 1973). A relação desnutrição-infecção pode ser vista sob a ótica de dois aspectos: no primeiro deles, a desnutrição é responsável por alterar os mecanismos de defesa do indivíduo, e no segundo, a infecção leva ao agravamento do quadro de deficiência nutricional previamente instalado (BRUNDTLAND, 2000; SCRIMSHAW, 2003).

O consumo de dietas com reduzido teor de proteínas e calorias, associado ou não à ingestão inadequada de lipídios, vitaminas e minerais, estabelece a base do desequilíbrio metabólico que acomete o indivíduo na DPE (WATERLOW et al., 1996). A DPE ao modificar o metabolismo proteico, induz um estado catabólico, no qual o balanço nitrogenado é negativo, o que afeta a capacidade de síntese e distribuição de proteínas no organismo (POWANDA; BEISEL, 2003; MITHAL et al., 2013).

A DPE também altera o metabolismo de carboidratos, o que pode levar a um quadro de hipoglicemia, modificações nas concentrações séricas de insulina e glucagon, além do aumento na gliconeogênese (NUTTALL et al., 2008; JIA et al., 2012). Uma vez que as proteínas são o principal componente estrutural das células e os carboidratos são a fonte primária de energia,

## *Introdução*

caso o fornecimento dessas macromoléculas seja continuamente menor que o adequado, o metabolismo perde a sua capacidade adaptativa e todos os tecidos, órgãos e sistemas tornam-se propensos à falência (IMNA, 2005; WAITZBERG, 2006).

Além disso, a DPE pode provocar efeitos psicossociais deletérios, como depressão e ansiedade (SAUNDERS; SMITH, 2010), ocasionar retardo no crescimento e no desenvolvimento (MONTEIRO et al., 2009) e diminuir a função cognitiva do indivíduo (WHO, 2011).

Recém-nascidos, crianças, idosos, indivíduos com distúrbios alimentares e/ou sob dietas radicais ou ainda pacientes hospitalizados, portadores de neoplasias e/ou doenças crônicas constituem os grupos mais susceptíveis à DPE (WAITZBERG et al., 1999; BRUNDTLAND, 2000; AKNER; CEDERHOLM, 2001; NOVA et al., 2002; SAWAYA, 2006).

A DPE é capaz de comprometer a homeostase do organismo e gerar efeitos adversos que podem ser clinicamente diagnosticados (LEAN, 2010; SAUNDERS et al., 2011). Suas manifestações clínicas variam de acordo com a gravidade da deficiência proteico-energética, com a idade do paciente e com sua possível associação à outras doenças. A DPE pode manifestar-se clinicamente como Marasmo e Kwashiorkor, as quais podem ocorrer de forma isolada ou combinada (síndrome Kwashiorkor-marasmática), sendo que ambas as formas são classificadas como desnutrição aguda grave.

Considerando-se a avaliação antropométrica, segundo a OMS, o Marasmo é definido por um valor de peso para estatura (P/E) com índices inferiores a 3 desvios-padrão (DP) abaixo da média (score z de P/E <-3). Enquanto que o Kwashiorkor é caracterizado pela presença de edema depressível bilateral, independente de valores antropométricos. Os pacientes também podem se apresentar com Kwashiorkor-marasmático, com edema sobreposto a grande perda de peso (WHO, 2006; IBRAHIM et al., 2017).

O Marasmo, a forma mais comum de DPE, caracteriza-se por uma privação crônica na ingestão de energia e instala-se nos primeiros anos de vida, preferencialmente no decorrer do primeiro ano. Tem sido frequentemente observado em crianças com seis meses de idade em fase de desmame precoce, quando passam a receber alimentação deficiente (VOLTARELLI; MELLO, 2008). A criança marasmática é muito magra, apresenta retardo no crescimento, evidente perda de massa muscular, gordura subcutânea escassa ou ausente e extremidades muito delgadas e abdômen às vezes proeminente. A face tem uma aparência de “velho” e as pregas frouxas da pele podem ser vistas, principalmente nas nádegas. (MONTE, 2000; IBRAHIM, 2017).

## *Introdução*

Kwashiorkor é caracterizada pela predominância da carência proteica e manifesta-se com maior frequência nos três primeiros anos de vida (VOLTARELLI; MELLO, 2008). Ocorre em populações nas quais o alimento básico, como a mandioca, é deficiente em proteínas, ou as proteínas presentes nos alimentos, como o milho, são de má qualidade (SHILS et al., 2003). As principais características da manifestação do Kwashiorkor são retardo de crescimento, edema depressível que se localiza principalmente nos membros inferiores, mas que pode atingir todo o corpo, hepatomegalia acentuada devido à esteatose hepática, alterações mentais e de humor. Podem ocorrer alterações na textura e cor dos cabelos, assim como queda e perda de brilho, e também lesões de pele, como despigmentação e descamação. Sintomas como anorexia, diarreia, infecções e deficiências de micronutrientes (vitamina A, zinco e ferro) são também frequentemente encontradas (MONTE, 2000; IBRAHIM, 2017).

### **1.2 Desnutrição e sua relação com o sistema imune**

A relação entre as áreas da Nutrição e Imunologia foi formalmente reconhecida no início da década de 1970, quando avaliações da função do sistema imune foram introduzidas como parte da avaliação do estado nutricional de pacientes (BISTRAN et al., 1975). Atualmente, tem sido amplamente aceito que a imunidade ou a susceptibilidade a diversas doenças infecto-parasitárias estão diretamente relacionadas ao estado nutricional dos indivíduos (BAPAT et al., 2015; BOURKE et al., 2016).

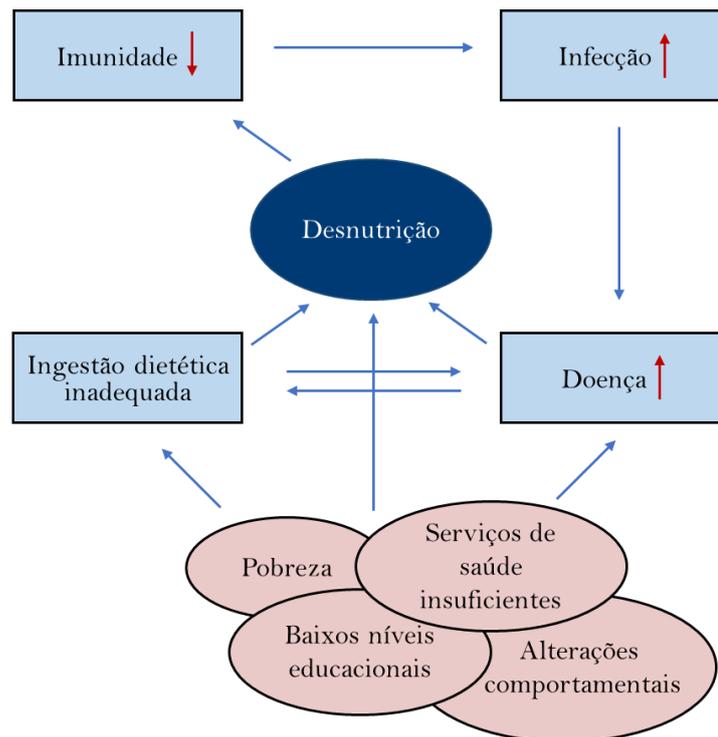
Já foi demonstrado que deficiências nutricionais de vitaminas e de minerais afetam as funções do sistema imune (BEISEL, 1982). O grau de extensão deste comprometimento relaciona-se ao nutriente envolvido, da sua interação com outros nutrientes, da gravidade da deficiência, da presença de infecção e da idade do indivíduo (CHANDRA, 1997).

Dessa forma, o estado nutricional se inclui entre os fatores capazes de alterar o perfil da resposta imunológica. A desnutrição modifica a defesa do organismo, tendo efeitos tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que as deficiências nutricionais alteram a imunocompetência e aumentam o risco de infecção, sendo a desnutrição reconhecida como a causa mais comum de imunodeficiência em todo o mundo (CHANDRA, 1997; COHEN et al., 2017). Essas deficiências são complexas, frequentemente envolvendo escassez calórica, proteica e graus variados de carência de vitamina A, vitamina E, vitamina B6, folato, zinco, ferro, cobre e selênio (CHANDRA, 1986; NEUMANN et al., 2004; THAKUR et al., 2004).

## Introdução

Existe uma relação dinâmica entre doença, imunidade e nutrição. A imunidade do hospedeiro depende da proliferação celular e da síntese proteica, por essa razão é diretamente afetada pelo estado nutricional do indivíduo, que determina a habilidade metabólica celular e a eficiência com que a célula reage aos estímulos, dando início e continuidade às respostas imunes (BRUNETTO et al., 2007).

Dessa forma, as deficiências nutricionais afetam o funcionamento do sistema imune, que por sua vez pode alterar a suscetibilidade do indivíduo a infecções parasitárias e/ou a desordens imunológicas. Além disso, muitos fatores afetam o grau e a distribuição da desnutrição em todo o mundo, sendo a pobreza o principal motivo. Outros fatores incluem: instabilidade socioeconômica, baixos níveis educacionais, condições de vida insalubres, hábitos alimentares inadequados, escassez ou ineficácia dos programas relacionados à nutrição e transtornos alimentares (RYTTER et al., 2004; BAPAT et al., 2015). A **figura 2** ilustra a relação entre desnutrição, infecção e imunidade.



**Figura 2 - Relação entre desnutrição, infecção e imunidade.** Existe uma relação direta entre desnutrição e aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Fatores socioeconômicos (pobreza e baixos níveis educacionais), serviços de saúde insuficientes e alterações comportamentais (transtornos alimentares) contribuem para uma ingestão alimentar inadequada, a qual pode levar à desnutrição. Deficiências nutricionais afetam o funcionamento do sistema imune, que por sua vez pode alterar a suscetibilidade do indivíduo a infecções e/ou a desordens imunológicas. Fonte: Adaptado de Bapat et al., 2015.

## *Introdução*

De uma forma geral, os trabalhos mostram que a natureza precisa da imunodeficiência na desnutrição permanece incerta; no entanto, o consenso das evidências disponíveis é que tanto a imunidade inata quanto a adaptativa são prejudicadas pela desnutrição. Os defeitos na função imune inata incluem: função de barreira epitelial comprometida na pele e no intestino, atividade microbicida reduzida de granulócitos, menor número de células dendríticas e de proteínas do complemento circulantes. Os defeitos na imunidade adaptativa compreendem: níveis reduzidos de IgA solúvel na saliva e lágrimas, atrofia dos órgãos linfoides primários, redução de células B circulantes, uma mudança do perfil de citocinas produzidas do tipo Th1 para Th2 (RYTTER et al., 2014).

Já é bem estabelecido na literatura que a atrofia do timo é uma alteração importante na desnutrição, com significativa diminuição da função das células T e um aumento do número de células com falhas no processo de diferenciação (CHANDRA, 1974; KEUSCH et al., 1987; JAMBON, 1988; PARENT, 1994; GARLY, 2008). Foi evidenciado que a DPE prejudica a linfoproliferação e diminui a quantidade de linfócitos no timo, baço e em regiões timo-dependentes dos linfonodos (FOCK et al., 2010; NAKAJIMA et al., 2014). A redução dessas células é decorrente da diminuição da população de progenitores linfoides e de alterações nos processos de proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (SAVINO, 2002; NAJERA et al., 2004; FOCK et al., 2010; NAKAJIMA et al., 2014).

Estudos que investigaram se o número de linfócitos T no sangue foi afetado em crianças desnutridas apresentaram resultados controversos. Em alguns trabalhos, nenhuma alteração na proporção de linfócitos T foi observada (NÁJERA et al., 2004; RIKIMARU et al., 1998; FAKHIR et al., 1988; NÁJERA et al., 2002); enquanto outros encontraram diminuição na proporção dessas células (OZHAN et al., 1993; PARENT et al., 1994; CHEVALIER et al., 1994; HAGEL et al., 2003). Com relação à contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, também não existe um consenso na literatura. Algumas publicações encontraram redução nos níveis dessas células (CHEVALIER et al., 1994; NOURELDIN et al., 1999), enquanto outras encontraram níveis similares ou aumentados (RIKIMARU et al., 1998; NÁJERA et al., 2002, 2004, 2007, 2017; NASSAR et al., 2007; HUGHES et al., 2009). De acordo com Nájera et al. (2004), esses resultados controversos podem estar associados a vários fatores, como a metodologia empregada, o tipo e o grau de desnutrição e à presença ou não de infecção.

No entanto, o processo de ativação dos linfócitos T parece ser um dos principais mecanismos que impedem a ativação completa da imunidade durante a desnutrição. Tem sido constatado que animais desnutridos apresentam redução na expressão de moléculas associadas

## Introdução

com o processo de ativação e proliferação, como é o caso de CD25 e CD71 (CORTÉS-BARBEREMA et al., 2008). Outros estudos mostraram que crianças com desnutrição apresentaram níveis reduzidos de linfócitos T efetores (CD62L e CD28) (NÁJERA et al., 2007), de linfócitos T ativados (CD69 e/ou CD25) (NÁJERA et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2007) e de linfócitos T de memória (CD45RO<sup>+</sup>) (NÁJERA et al., 2004; NÁJERA et al., 2017). Esta ativação comprometida de células T tem sido associada com baixa produção de citocinas, as quais são os principais mediadores solúveis da imunidade de célula T (RODRÍGUEZ et al., 2005).

A DEP prejudica a capacidade dos linfócitos de ratos de proliferarem e produzirem interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), citocina associada à resposta Th1 (MENGHERI et al., 1992). Similarmente, células T de camundongos, submetidos a jejum por 48 horas, quando ativadas *in vitro* apresentaram capacidade reduzida de produzir interleucina-2 (IL-2) e citocinas Th1, como o IFN- $\gamma$  (SAUCILLO et al., 2014). Resultados semelhantes também foram encontrados em crianças desnutridas, as quais apresentaram níveis diminuídos de citocinas importantes para a diferenciação de células T (IL-12, IL-18 e IL-21) e citocinas da resposta de células Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) (GONZALEZ-TORRES et al., 2013; HUGHES et al., 2009).

Estudos demonstram que a DPE reduz a captação de glicose por linfócitos e modifica a produção de citocinas por essas células, podendo afetar o metabolismo e a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e aumentar a secreção IL-4 por essas células, o que denota uma alteração no balanço Th1 / Th2 resultante da DPE (RODRIGUEZ et al., 2005; MACIVER et al., 2008; GONZALEZ-TORRES et al., 2008; SAUCILLO et al., 2014). Em conjunto, esses achados sugerem que a desnutrição, por favorecer um perfil de reposta Th2, predispõe à determinados tipos de infecção (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al., 2008).

A capacidade efetora de linfócitos antígeno-específicos é regulada por células apresentadoras de antígenos, com destaque para as células dendríticas e macrófagos (BOUSSO, 2008). Dados da literatura mostram que a DPE promove uma queda no número de células dendríticas no baço e sangue, reduz a sua capacidade de ativar linfócitos T e diminui a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  por essas células, comprometendo sua função (NIIYA et al., 2007; HUGHES et al., 2009). A DPE também altera a função dos macrófagos, uma vez que diminui sua produção de citocinas pró-inflamatórias e induz apoptose dessas células, desencadeando um estado de imunodeficiência (MCCARTER et al., 1998; RIVADENEIRA et al., 2001).

Além disso, a DPE reduziu a expressão de L-selectina, podendo impactar na capacidade de migração de leucócitos para os locais de inflamação (LANDGRAF et al., 2007). Os níveis e

## *Introdução*

atividade de proteínas do sistema complemento, como C3, C5 e fator B, estão diminuídos na desnutrição, o que prejudica a opsonização de patógenos e aumenta a probabilidade de infecções oportunistas (SIRISINHA et al., 1973; HALLER; ZUBLER; LAMBERT, 1978; CHANDRA, 1983; EKANEM et al., 1997; RIKIMARU et al., 1998).

Os níveis de linfócitos B circulantes encontram-se reduzidos em crianças desnutridas. Nájera et al. (2004) encontraram diminuição significativa nas proporções de células B em crianças que apresentavam DPE e infecções respiratórias e gastrointestinais, em comparação com crianças eutróficas (estado nutricional adequado) que também apresentavam o quadro infeccioso. Outros trabalhos descritos na literatura corroboram com esse achado (RIKIMARU et al., 1998; HAGEL et al., 2003).

Estudos experimentais sugerem que a desnutrição altera os mecanismos de defesa imunológica das mucosas e compromete a morfologia e a função da barreira intestinal, contra a invasão de micro-organismos e agentes patogênicos. É possível que em crianças com DEP exista uma falha na síntese de imunoglobulina A (IgA), ou que elas apresentem algum bloqueio no transporte de IgA para a superfície das mucosas (SIRISINHA et al., 1975; YAKUBU, 1982; CHANDRA, 1989).

Reddy et al. (1976), demonstraram que a desnutrição grave pode comprometer a resposta mediada por IgA. Ao investigarem um grupo de crianças com desnutrição do tipo Kwashiorkor-marasmático, a concentração de IgA em fluido duodenal, salivar, secreções nasais e lágrimas estavam significativamente reduzidas quando foram admitidas, e voltaram ao normal quatro semanas após tratamento.

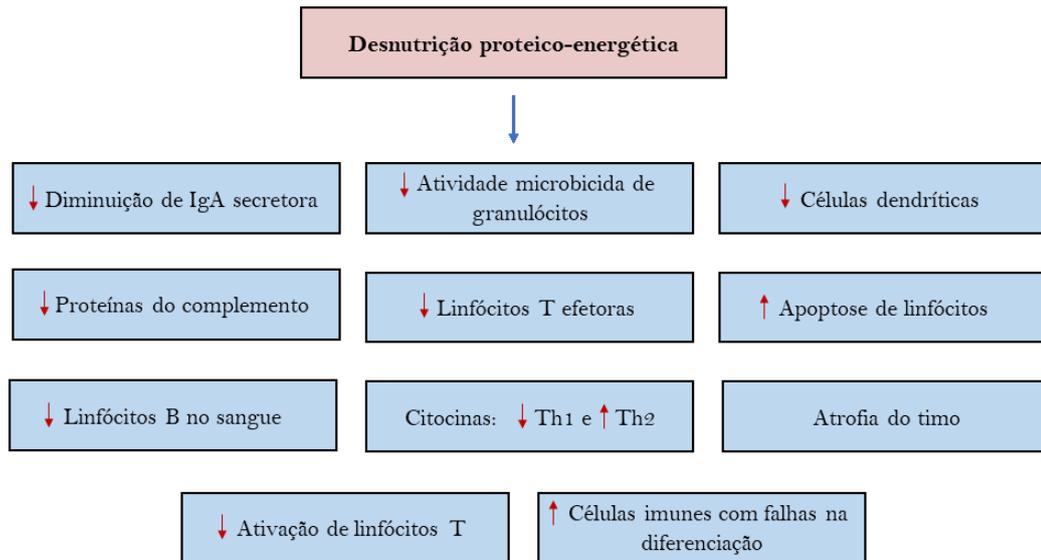
A forma de apresentação da fonte nitrogenada em aminoácidos, peptídeos ou proteínas influencia a atividade imune da mucosa. Menezes et al. (2003) mostraram que as proteínas provenientes da dieta na forma intacta ou de peptídeos (forma imunogênica), que podem ser apresentados pelo MHC e dessa forma reconhecidos pelo sistema imune, são fundamentais para a maturação imunológica. Camundongos que receberam desde o desmame até a idade adulta dieta livre de proteínas intactas, substituídas por quantidades equivalentes de aminoácidos (Aa), apresentaram crescimento corpóreo normal, porém desenvolveram alterações no desenvolvimento do sistema imune. Esses animais apresentam diminuição no número de células na lâmina própria e de linfócitos intraepiteliais, além de alterações na morfologia das vilosidades intestinais. A produção de IgA secretória (sIgA), imunoglobulinas séricas totais, IgA e IgG séricos é comprometida. Essas características foram semelhantes às de camundongos

## Introdução

neonatos. Com isso, esse trabalho mostrou que a estimulação antigênica pelas proteínas da dieta após o desmame é fundamental para a maturação do sistema imune (MENEZES et al., 2003).

Outros trabalhos também demonstraram que o ingestão de dieta isenta de proteínas intactas desde o desmame até a vida adulta pode comprometer a função do sistema imunológico. Camundongos que foram alimentados com dieta contendo aminoácidos e infectados com *Leishmania major* apresentaram maior susceptibilidade à infecção, o que pode estar relacionado ao comprometimento da polarização Th1 e estado imaturo das células apresentadoras de antígenos (AMARAL et al., 2010). Em um outro estudo, Amaral et al. (2006) demonstraram que camundongos alimentados com a dieta Aa, durante o mesmo período citado anteriormente, recuperaram sua capacidade de produção de imunoglobulinas, após três dias da introdução da dieta controle (contendo caseína). Além disso, os resultados mostraram que a recuperação foi dependente da quantidade de proteína intacta presente na dieta, sendo que um requerimento de, no mínimo, 5% de proteína íntegra foi necessário para a restauração dos níveis de sIgA, IgG e IgM e 10% de caseína para restabelecer os níveis de IgA.

Algumas alterações encontradas nos animais que receberam dietas contendo aminoácidos livres são semelhantes às encontradas em animais *germ-free*, como redução das placas de Peyer, alterações morfológicas das vilosidades intestinais, redução de células na lâmina própria, diminuição de linfócitos intraepiteliais, redução de sIgA e imunoglobulinas séricas (BOS et al., 1988; MACPHERSON; HARRIS, 2004). Além disso, alterações imunológicas encontradas em animais *germ-free*, alimentados com dietas sem antígeno são mais graves (HASHIMOTO et al., 1978; HOOIJKAAS et al., 1984), o que sugere que as proteínas da dieta e a microbiota participam do desenvolvimento imunológico (FARIA et al., 2013). A **figura 3** sumariza os principais parâmetros imunes afetados pela desnutrição.



**Figura 3 - Principais parâmetros do sistema imune afetados pela DPE.** A desnutrição está entre os fatores capazes de determinar a variabilidade na resposta imune do hospedeiro, modificando a defesa do organismo, tendo efeitos tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Fonte: Adaptado de Rytter et al., 2014.

### 1.3 A Esquistossomose

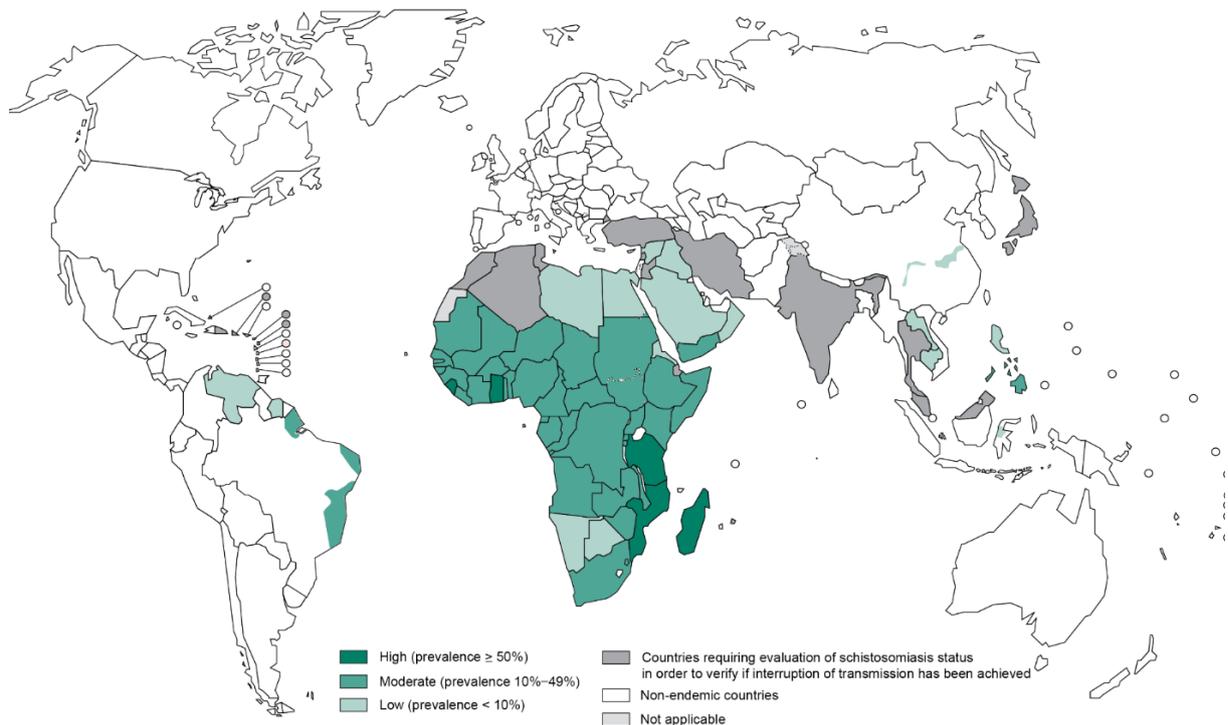
A esquistossomose destaca-se, mundialmente, como uma das parasitoses mais importantes, sendo considerada a segunda doença parasitária mais relevante em saúde pública no mundo, superada apenas pela malária (BRASIL, 2014). Na maioria dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas, a doença caracteriza-se pelo aparecimento de episódios de fraqueza, dor abdominal e diarreia, sendo que estes sintomas são comuns a outros tipos de infecções. Dessa forma, as evidências atuais sugerem que as esquistossomoses, embora raramente letais, têm impacto significativo na qualidade e na expectativa de anos de vida saudáveis, tanto na infância quanto na idade adulta. Repetidas infecções e infecções crônicas estão associadas com a presença de desnutrição, anemia, diarreia, fadiga, prejuízos cognitivos, e em crianças a déficits ponderal e de crescimento linear (KING et al., 2005, 2010). Uma pequena percentagem da população, porém, desenvolve formas clínicas mais graves da doença, as quais são denominadas como hepatointestinais ou hepatoesplênicas. (PRATA; BINA, 1968). No entanto, devido aos programas de controle para a doença, estas formas estão cada vez mais raras no Brasil (COURA; AMARAL, 2004).

Os agentes etiológicos das esquistossomoses são trematódeos de diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. Dentre as espécies desse gênero, três são as mais importantes para a saúde humana: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*,

## Introdução

causadores da esquistossomose mansoni, esquistossomose hematóbica e esquistossomose japônica, respectivamente. (GRYSEELS et al., 2006; LATIF et al., 2013). A patologia referente às espécies *S. mansoni* e *S. japonicum*, relaciona-se à formação de fibrose hepato-intestinal crônica, decorrente, principalmente, da deposição dos ovos das fêmeas do verme em órgãos, como o fígado. Já a patologia associada à infecção pela espécie *S. haematobium*, que habita nos vasos sanguíneos da bexiga, caracteriza-se por uma doença que afeta o trato urinário (GRYSEELS et al., 2006; BURKE et al., 2009).

A OMS estima que as esquistossomoses afetam cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo e representam ameaça para mais de 700 milhões de indivíduos que vivem em áreas de risco, sendo que, somente no ano de 2016, mais de 89 milhões de pessoas necessitaram de tratamento para a doença. A distribuição geográfica da esquistossomose abrange 78 países, distribuídos nos continentes africano, americanos (sul e central) e asiático. Dentre essas regiões, a África é a mais afetada pela doença, compreendendo 90% de todos os casos (WHO, 2018b). A distribuição global da doença está representada na **figura 4**.



**Figura 4 - Distribuição da esquistossomose no mundo.** Fonte: World Health Organization, 2012.

No Brasil, a esquistossomose é causada pela única espécie endêmica, o *S. mansoni*. Dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) estimam que aproximadamente 25 milhões de pessoas que vivem nas zonas rurais e agricultáveis ou nas áreas periféricas de algumas cidades

## Introdução

brasileiras estejam expostas ao risco de contrair a doença, e que 5,2 a 6 milhões se encontram infectadas. As áreas endêmicas e focais abrangem 19 Unidades Federadas, ocorrendo de forma endêmica nos estados do Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do estado). No Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (BRASIL, 2014).

Com o intuito de avaliar o impacto das doenças, inclusive infecto-parasitárias, sobre a saúde das populações atingidas, foi introduzido o cálculo do DALY (*disability-adjusted life-years lost*), indicador quantitativo da carga provocada pela doença sobre o indivíduo e que reflete a quantidade total de vida saudável perdida em consequência de morte prematura ou de qualquer grau de incapacidade física ou mental causada pela doença, durante certo período (HOMEDES, 1995). Segundo esse indicador, a esquistossomose foi responsável por 3,31 milhões/DALY (HOTEZ et al., 2014).

A transmissão da esquistossomose ocorre através da contaminação de coleções hídricas, por fezes de indivíduos doentes, em locais onde se encontra o hospedeiro intermediário do parasito. Fatores econômicos, sociais e ecológicos contribuem para a contínua transmissão da doença, sendo que as precárias condições de saneamento básico, o baixo poder socioeconômico dos moradores das áreas endêmicas, os hábitos de vida, a migração populacional, a presença dos hospedeiros intermediários do parasito e o clima, são condições que contribuem para permanência da transmissão da mesma (LOUREIRO, 1989; KLOOS, et al., 2008; KLOOS, et al., 2010).

### 1.3.1 Ciclo de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*

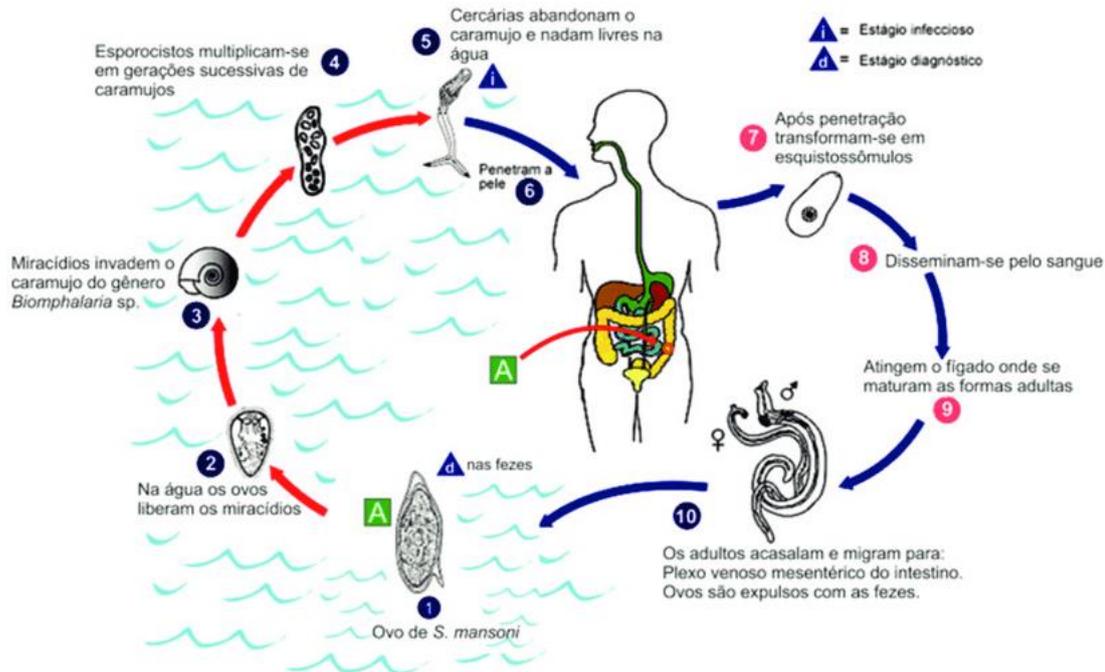
O *S. mansoni* possui um ciclo biológico complexo que se caracteriza por uma fase de reprodução sexuada dentro do hospedeiro definitivo vertebrado (homem ou pequenos mamíferos), onde ocorre maturação dos vermes, e a fase de reprodução assexuada dentro do hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) (DAVIS, 1985).

O ciclo de vida do *S. mansoni* tem início com a eliminação dos ovos do parasito junto com as fezes do hospedeiro definitivo, que em contato com água doce, eclodem liberando larvas ciliadas, denominadas miracídios. Estes, livres em meio aquático, encontram o hospedeiro intermediário e iniciam a penetração nestes moluscos com o auxílio de secreções glandulares e

## *Introdução*

movimentos rotatórios. Após a penetração, a larva perde o revestimento epitelial ciliado, e as demais estruturas de penetração são gradualmente substituídas até que, no segundo dia, uma nova camada superficial contínua aparece, formando, então, o esporocisto primário. No 14º dia após a penetração, o esporocisto primário formado inicialmente se enovela e aumenta de tamanho, apresentando de 150 a 200 células germinativas, as quais darão origem aos esporocistos secundários. Estes após completamente formados migram para a glândula digestiva do molusco, iniciando o desenvolvimento de cercárias (larvas infectantes para o hospedeiro vertebrado) (NEVES, 2005). A formação completa das cercárias, até a sua emergência, ocorre de 27 a 30 dias após a penetração dos miracídios (PAN, 1965). Essas cercárias são eliminadas pelo molusco e, ao encontrar o hospedeiro definitivo, penetram ativamente na pele. Ao tocar na pele do hospedeiro, as cercárias fixam-se fortemente, sendo estimuladas pelo calor e pela presença de L-arginina (HAAS et al., 1976; HAAS et al., 1997), o que permite um contato prolongado entre o parasito e o hospedeiro, contribuindo para a penetração das cercárias através da pele. A partir disso, as cercárias iniciam a invasão da pele através da ação vibratória da cauda e da secreção das glândulas pré-acetabulares, as quais possuem proteases (HAAS et al., 1997). A invasão da pele pelo parasito resulta em perda da cauda e em alterações morfofisiológicas, desencadeadas pelas mudanças de temperatura e osmolaridade, transformando as cercárias em esquistossômulos (STIREWALT, 1974). Através da circulação sanguínea, os esquistossômulos são conduzidos para os pulmões e então, chegam até as veias do sistema porta intra-hepático, local em que sofrerão maturação em vermes adultos (MILLER; WILSON, 1978). Os vermes adultos se acasalam, migram para os ramos terminais das veias mesentéricas, onde as fêmeas iniciam a oviposição 30-40 dias após a infecção. Cada casal pode produzir cerca de 300 ovos por dia. Parte desses ovos, cerca de 50%, atravessa as paredes do intestino, sendo eliminados com as fezes, dando continuidade ao ciclo de vida do parasito (**figura 5**). Os demais ovos permanecem na corrente sanguínea e ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, podendo induzir a formação de granulomas hepáticos e intestinais, hepatoesplenomegalia e fibrose periportal (VON LICHTENBERG, 1987; CHEEVER, 1992).

## Introdução



**Figura 5 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.** As cercárias ao saírem do caramujo nadam em busca de um hospedeiro definitivo, penetram por sua pele perdendo a cauda e iniciam o processo de transformação em esquistossômulos. Estes, através da circulação sanguínea, são conduzidos até os pulmões e então, migram até o sistema porta-hepático, onde completam o desenvolvimento. Vermes adultos, acasalados, migram até as vênulas do mesentério do intestino e as fêmeas iniciam a deposição de ovos, os quais poderão ser carreados através do fluxo sanguíneo para outros órgãos ou poderão atravessar a mucosa do intestino caindo na luz intestinal, sendo eliminados com as fezes. Em água fresca os ovos eclodem e liberam os miracídeos que nadam e penetram no hospedeiro intermediário, a *Biomphalaria*. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos, produção e liberação de cercárias. Fonte: Adaptado de CDC: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>.

### 1.3.2 Imunopatologia da Esquistossome mansoni

A infecção causada pelo *Schistosoma mansoni* pode levar a várias manifestações clínicas no hospedeiro definitivo. A localização do parasito, a intensidade da infecção e a resposta imune do indivíduo são fatores determinantes para a evolução clínica dessa parasitose (TORRES, 1976; BOROS, 1989). No curso da infecção pelo *S. mansoni*, indivíduos infectados podem apresentar duas fases distintas da doença: a fase aguda e a fase crônica, que diferem entre si em relação às manifestações clínicas e imunológicas (BOROS, 1989).

A fase aguda representa o estágio inicial da doença, o qual é caracterizado pela penetração das cercárias, migração de esquistossômulos e vermes adultos pelos tecidos do hospedeiro definitivo, seguido pelo início da ovoposição. A resposta imune contra o *S. mansoni* tem início assim que as cercárias penetram através da pele do hospedeiro definitivo e liberam várias moléculas imunogênicas, através da secreção das glândulas acetabulares, as quais contribuem nesse processo de penetração e na transformação em esquistossômulos

## *Introdução*

(LAMBERTUCCI et al., 1997; HAAS et al., 1997). Durante essa fase de invasão, a resposta imune é inicialmente inata, seguida, poucos dias depois, por uma resposta imune adaptativa do tipo Th1 dominante. Após a maturação dos parasitos, a qual ocorre cinco ou seis semanas de infecção, inicia-se a produção de ovos e a resposta imune do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-6), que é característica do início da infecção, começa a declinar, enquanto a resposta do tipo Th2 (IL-4, IL-13 e IL-5) aumenta (BURKE, et al., 2009).

Com relação às manifestações clínicas na esquistossomose aguda, o indivíduo poderá apresentar sinais e sintomas inespecíficos (mal-estar, febre, cefaleia, perda de peso, anorexia, artralgia, mialgia e edema), respiratórios (tosse, dispneia, dor torácica e alterações das provas de função pulmonar e da radiografia do tórax), digestivos (dor abdominal, diarreia, hepatoesplenomegalia e elevação das enzimas hepáticas), neurológicos (encefalite e mielite), além de eosinofilia (NEVES, MARTINS; TONELLI, 1966).

A presença dos ovos no organismo do hospedeiro propicia a formação de uma reação inflamatória focal, composta por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares, dispostos de forma organizada, denominada granuloma (BOGLIOLO, 1959; LENZI et al., 1998). A fase crônica da esquistossomose é caracterizada pelo aumento significativo na produção de IL-10, sendo que a mesma é responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (ARAÚJO et al., 1996; MALAQUIAS et al., 1997; MONTENEGRO et al., 1999; CHEEVER et al., 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). Apesar da IL-10 inicialmente ter sido caracterizada como uma citocina do Tipo Th2, dados da literatura demonstram que essa citocina apresenta um papel modulador, tanto relacionada a resposta do tipo Th1 quanto do tipo Th2 (ANTHONY et al., 2006, 2007). Dessa forma, o aumento na síntese de IL-10 é importante, visto que a ausência da modulação faz com que os níveis de mediadores inflamatórios permaneçam altos, o que pode contribuir para o aumento da morbidade da doença (HOFFMANN et al., 1999; RUTZKY et al., 2001).

A fibrose e alguns sintomas da patologia são mediados principalmente por citocinas do tipo Th2 (CHEEVER et al., 1994; REMAIN et al., 2006). Uma forte atividade antifibrótica tem sido relacionada com a presença de IFN- $\gamma$  (PEARCE; MACDONALD, 2002; MUKAI et al., WILSON et al., 2007). No entanto, outros estudos comprovam que níveis excessivos de IFN- $\gamma$  podem causar graves consequências patológicas para o hospedeiro, como a hepatotoxicidade (HOFFMANN et al., 2000). Essa citocina parece estar envolvida no controle da produção de colágeno, visto que baixos níveis da mesma em pacientes com a forma mais grave da doença explica o aumento da cicatriz tecidual e da fibrose (CALDAS et al., 2008).

## *Introdução*

Nesse contexto, estudos demonstram que o IFN- $\gamma$  é fundamental no mecanismo protetor contra a fibrose periportal, enquanto que a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) pode agravar a doença (BOOTH et al., 2004). Além disso, citocinas do Tipo Th2, como IL-4 e IL-13, são importantes para o recrutamento e ativação das células responsáveis pela formação do granuloma e também pela diferenciação de células hepáticas estreladas em miofibroblastos, os quais levam a produção dos componentes da matriz extracelular essenciais na remodelação tecidual, mas também para formação de fibrose (DOUCET et al., 1998; TERAN et al., 1999; LIU et al., 2002, BURKE et al., 2009).

A gravidade da esquistossomose não está somente relacionada com a carga parasitária. Parece estar vinculada às consequências imunológicas da ausência de citocinas da resposta Th2, visto que é extremamente importante a síntese de citocinas com esse perfil de resposta para prevenir e modular a produção de mediadores inflamatórios. Desse modo, a IL-10 possui um papel regulatório capaz de prevenir o desenvolvimento de patologias mediadas pelo excesso de resposta Th1 e Th2 (PEARCE; MACDONALD, 2002). Além disso, o equilíbrio das respostas Th1 e Th2 é crucial para formação do granuloma sem dano tecidual excessivo (WILSON et al., 2007). Nesse contexto, Hoffmann et al. (2000) verificaram que camundongos deficientes para a produção de IL-10/IL-4 tiveram uma mortalidade maior na fase aguda, provavelmente pela exacerbação da resposta inflamatória do tipo Th1, enquanto que animais deficientes na produção de IL-10/IL-12, apresentaram um aumento da fibrose e na área do granuloma hepático e uma elevada mortalidade na fase crônica da doença.

Durante a fase crônica, manifestações clínicas distintas podem se desenvolver, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. A forma crônica habitual ou leve é a forma em que se encontra na maioria das pessoas infectadas em áreas endêmicas, ou eventualmente fora delas, eliminando ovos viáveis nas fezes, mas, assintomática ou com episódios de fraqueza, fadiga, dor abdominal e diarreia (CHEEVER; ANDRADE, 1967). A forma grave ou avançada da esquistossomose é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal. Esta é uma lesão representada por expansão fibrosa sistematizada dos espaços porta, acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático, mas com preservação da arquitetura normal do parênquima (ANDRADE, 2008).

#### 1.4 Desnutrição e esquistossomose

Frequentemente, desnutrição e doenças estão associadas (BORELLI, et al., 1998). Indivíduos acometidos pela desnutrição podem apresentar maior susceptibilidade a infecções e a maiores índices de morbimortalidade (SOUZA, et al., 2001).

As infecções estão associadas à redução do apetite, à má absorção, ao aumento do catabolismo e à perda de nutrientes nas fezes, urina e suor. A necessidade de rápida síntese de proteína e proliferação celular para a defesa do hospedeiro cria uma demanda adicional na já prejudicada fonte de nutrientes. Assim, essas alterações ocasionadas pela infecção prejudicam ainda mais o estado nutricional do indivíduo (CHANDRA, 1992). Por outro lado, a desnutrição pode facilitar a invasão pelo agente infeccioso e contribuir para sua proliferação no organismo, bem como aumentar as chances de ocorrência de uma infecção secundária, alterando a evolução e o prognóstico da doença (BORELLI, 2004).

Geralmente, esquistossomose e desnutrição são importantes problemas de saúde pública que coexistem, ocupando as mesmas áreas geográficas em diferentes regiões do mundo onde a parasitose é endêmica (COUTINHO, et al., 1997; ATINMO et al., 2009; WHO, 2009).

Estudos clínico-epidemiológicos realizados em populações de áreas endêmicas de esquistossomose na região Nordeste do Brasil, e por outros autores, em outras regiões endêmicas do mundo, permitiram correlacionar a doença ao estado nutricional do indivíduo, em que se pode verificar que a maior porcentagem de desnutridos geralmente é detectada no grupo de indivíduos comprovadamente infectados por *S. mansoni*. Coutinho et al. (1985) em um estudo realizado em Pernambuco avaliaram a distribuição de amostra populacional em relação à positividade ou não para *Schistosoma mansoni* e à ocorrência de desnutrição. Verificou-se que 43,2% dos indivíduos positivos para a esquistossomose apresentavam desnutrição. Em contrapartida, 26,2% dos indivíduos negativos para essa parasitose eram desnutridos.

Do ponto de vista clínico, antropométrico e anátomo-patológico, associações entre o estado nutricional e certas manifestações da esquistossomose, têm sido relatadas (COUTINHO, 1980, 1997b, 2004; PARRAGA et al., 1996), tanto no homem como em estudos experimentais (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992; CHEEVER et al., 2002; COUTINHO et al., 1997). Os efeitos da esquistossomose sobre o estado nutricional e vice-versa vêm sendo estudados em várias publicações (MAGALHÃES, 1986; CHIEFFI, 1992; Mc GARVEY et al., 1993; STEPHENSON, 1993, 1994; COUTINHO et al., 1997b, 2003, 2004, 2007; PARRAGA et al., 1996).

## Introdução

Nesse contexto, as principais alterações que a infecção por *Schistosoma* pode provocar no estado nutricional do hospedeiro vertebrado relacionam-se à redução do crescimento e do desenvolvimento (crianças pré-escolares e escolares) e balanço energético negativo (adultos) (BARBOSA; PEREIRA, 1981; VAN EE; POLDERMAN, 1984; EL KARIM, 1986). Alguns trabalhos mostraram uma correlação positiva entre anemia e esquistossomose, em crianças com elevada carga parasitária (PRUAL et al., 1992; BEFIDI et al., 1993). Nas infecções crônicas intensas, as esquistossomoses urinárias e intestinais podem se associar a perdas sanguíneas de até 6 mg de ferro/dia (CROMPTON, 1986; PRUAL et al., 1992). Além disso, estudos em pacientes com esse tipo de infecção mostraram elevadas perdas de albumina, zinco e vitamina A pelas fezes (STEPHENSON, 1986).

Além disso, alguns trabalhos avaliaram os efeitos do parasitismo sobre o estado nutricional em modelos experimentais. Camundongos com várias formas de desnutrição e infectados por *S. mansoni*, apresentaram perda ponderal, diminuição do consumo alimentar, atrofia generalizada da parede do intestino delgado, atrofia multifocal das vilosidades jejunais, agravamento do estado de desnutrição e elevada mortalidade (COUTINHO, 1976; MAGALHÃES et al., 1986; COUTINHO, FREITAS; ABATH, 1992; FERREIRA et al., 1993; AMORIM, 2000; COUTO et al., 2002).

Com relação às repercussões do estado nutricional na infecção por *S. mansoni*, a maioria dos trabalhos citados na literatura, refere-se a estados de desnutrição (proteica ou energético-proteica) ou a deficiências de micronutrientes. Coutinho e Abath (1962) demonstraram que a desnutrição proteica parece contribuir para uma maior facilidade com que as cercárias penetram no organismo, provavelmente por condicionar uma menor resistência do hospedeiro devido à sua reduzida capacidade de reagir imunologicamente contra o parasito, o que é compatível com o desenvolvimento de maior número de vermes no organismo parasitado. No entanto, o menor suprimento de nutrientes essenciais ao parasito torna o meio interno do hospedeiro inadequado ao seu desenvolvimento, provocando maior taxa de mortalidade parasitária (BARROS et al., 2014).

Em um estudo realizado por Coutinho et al. (1997b), utilizando camundongos alimentados com dieta controle (normoproteica) ou hipoproteica (cerca de 8% de proteína) e infectados por *S. mansoni*, observou-se que o grupo controle apresentou lesões decorrentes da formação de granulomas e fibrose periportal, ao contrário do que foi visto em animais desnutridos, os quais mostraram ausência de fibrose periportal (após análise histológica e

## Introdução

morfométrica do tecido hepático), menor diâmetro dos granulomas e menor percentual de tecido colágeno.

Assim, dentre os fatores que influenciam no desenvolvimento da fibrose periportal, expressão mais grave da patologia hepática na esquistossomose crônica, a desnutrição parece ter uma contribuição importante. A má nutrição modifica os mecanismos de defesa do organismo, uma vez que compromete os órgãos hematopoiéticos e linfoides responsáveis pela produção, manutenção e função das células que medeiam esses processos (CHANDRA, 1991).

Levando em consideração que a deficiência proteica é considerada um potente imunodepressor (MEIRA, 1995), Oliveira et al. (2004) avaliaram a resposta imune humoral em camundongos infectados por *S. mansoni* e desnutridos, na fase crônica da infecção. Os animais com deficiência proteica apresentaram baixos níveis séricos de IgG1, IgG2b e IgG3 em relação a camundongos eutróficos infectados.

Conforme explanado anteriormente, estudos que envolvam desnutrição e esquistossomose, restringem-se à deficiência proteica e/ou de micronutrientes. Todavia, não existem trabalhos descritos na literatura que avaliem os efeitos de uma dieta hipolipídica na infecção por *S. mansoni*. A importância de trabalhos que explorem essa relação se dá pelo fato de que o *S. mansoni* é incapaz de sintetizar *de novo* a maioria de seus lipídios, em particular os ácidos graxos de cadeia longa e colesterol (SAMUELSON et al., 1980).

Devido a isso, o parasito é completamente dependente do seu hospedeiro para estes e outros suprimentos de lipídios. A aquisição desse suprimento é mediada pelas proteínas ligadoras de ácidos graxos, do inglês, FABPs - *fatty acid binding proteins*, as quais estão envolvidas diretamente na captura, transporte e compartimentalização de ácidos graxos derivados do hospedeiro, principalmente o ácido palmítico e linoleico (BROUWERS et al., 1997). Dentre as FABPs, tem-se a proteína ligadora de ácidos graxos de 14 kDa do *S. mansoni* (Sm14), uma proteína citosólica presente na lamela do tegumento e do epitélio intestinal. Essa proteína é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do parasito e está localizada na superfície externa, isto é, próximo à interface de contato parasito-hospedeiro (BRITO, et al., 2002). A proteína Sm14 é um dos candidatos vacinais contra a esquistossomose, sendo que sua habilidade em proteger contra essa parasitose foi demonstrada em várias publicações (TENDLER et al., 1996; FONSECA et al., 2004, 2006; GARCIA et al., 2008; SANTINI-OLIVEIRA et al., 2016). Atualmente, a vacina Sm14 encontra-se em fase II de ensaios clínicos e está sendo testada em adultos moradores da região endêmica no Senegal, na África. Diante

## Introdução

do exposto, trabalhos que avaliem o impacto de dietas hipolipídicas na infecção pelo *S. mansoni* merecem atenção.

### 1.5 Modelos experimentais de desnutrição

Inicialmente, os estudos relacionados aos tipos e graus das diferentes deficiências nutricionais foram realizados com populações residentes em países em desenvolvimento. Estes trabalhos contribuíram para delimitar as regiões mais gravemente atingidas e, com isso, direcionar programas assistenciais definidos por organizações humanitárias e pelos governantes locais (MILLWARD; JACKSON, 2004; KHAN; BHUTTA, 2010). Porém, animais de laboratório têm sido utilizados de forma crescente para avaliar os efeitos dos graus variáveis de desnutrição na suscetibilidade a infecções e também nos diversos parâmetros da resposta imune, bem como em diversas patologias relacionadas à desnutrição (BORELLI et al., 2007; KOMATSU et al., 2007; FOCK et al., 2008; MALAFAIA et al., 2009; TAYLOR et al., 2012). A grande vantagem do uso de modelos animais é permitir uma avaliação controlada de cada parâmetro nutricional, considerando que isso não é possível no caso de populações humanas (BRITO et al., 2016).

Camundongos e ratos (isogênicos ou *outbred*), alimentados com quantidades reduzidas de proteínas ou micronutrientes, compõem os modelos mais utilizados. Camundongos jovens recém desmamados também são empregados como modelo de desnutrição (HILLYER et al., 2008). O uso de camundongos *knockouts* para elucidar os mecanismos envolvidos na maior suscetibilidade que a desnutrição determina aos agentes infecciosos, tem sido descrito na literatura (WATERS et al., 2004). A **tabela 1** sumariza os principais trabalhos envolvendo modelo murino de desnutrição e as alterações mais relevantes encontradas.

Em nosso grupo de pesquisa, até a realização deste trabalho de Mestrado, não havia modelo experimental estabelecido para esse tipo de abordagem. Dada a relevância do tema, decidimos introduzir essa linha de pesquisa em nosso laboratório. Inicialmente foi necessário padronizar um modelo murino de desnutrição, através do fornecimento de dietas com diferentes teores de proteína. A partir disso, avaliamos o impacto do estado nutricional inadequado na infecção por *Schistosoma mansoni*. Nossa hipótese é que a desnutrição proteico-energética impactará no desenvolvimento do *S. mansoni* e na resposta imune desencadeada em resposta à infecção pelo parasito.

**Tabela 1** - Sumário das principais alterações encontradas em modelos experimentais de desnutrição (continua)

Tipo de dieta	Animal	Tempo de indução da desnutrição	Efeito	Patógeno	Referência
Dieta hipoproteica 5% de proteína	Camundongo Swiss	10 dias	↓ Granuloma Hep. Leucopenia; ↓ CP Alterações na morf. dos machos	<i>S. mansoni</i>	Magalhães, et al., 1986.
Dieta hipoproteica 8,7% de proteína	Rato Wistar	2 semanas	Não houve diferença na MC ↑ Ingestão de ração	-	Colombo et al., 1992.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo Swiss	4 semanas	PP: 30% Ausência FHP ↓ CP fígado ↓ Granuloma Hep.	<i>S. mansoni</i>	Coutinho et al., 1997b.
Dieta hipoproteica (1%, 3% e 6% PTN) Deficientes em Fe e Zn	Camundongo BALB/c	4 semanas	GP: 22,1% (6% PTN), GP: 5,59% (3% de PTB) PP: 26,8% (1% de PTN) ↓ IL-10, ON; ↑ PGE2	<i>L. donovani</i>	Anstead et al., 2001.
Dieta hipoproteica 8% de proteína	Camundongo Swiss	4 semanas	↓ Parâmetros morfológicos dos parasitos (massas testiculares de estrutura de ovos intra-uterinos)	<i>S. mansoni</i>	Neves et al., 2002.
Dieta hipoproteica 8% de proteína Deficiente em ferro e zinco	Camundongo Swiss	Durante a gestação até a idade adulta	↓ PP significativa; ↓ Ovos seguimento distal ID	<i>S. mansoni</i>	Simões et al., 2002.
Dieta hipoproteica 3% de proteína	Camundongo BALB/c	6 semanas	↓ NFκ-B, TNF-α, IL-10, ON por macrófagos	<i>L. donovani</i>	Anstead et al., 2003.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo Swiss	4 semanas	Alterações em parâmetros da estrutura de parasitos	<i>S. mansoni</i>	Oliveira et al., 2003.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo Swiss	4 semanas	↓ Granuloma, Colágeno Hep. ↓ IgG1, IgG2b, IgG3	<i>S. mansoni</i>	Oliveira et al., 2004.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo Swiss	4 semanas	↓ CP; Ausência de FHP ↓ Colágeno e fibrose	<i>S. mansoni</i>	Coutinho et al., 2007.
Dieta hipoproteica 20g/Kg de caseína	Camundongo Swiss	2 semanas	PP: 19% ↓ Hb, Ht, Rt, Leu, Eritrob. (MO) ↓ Pt, Alb	-	Borelli et al., 2007.

**Tabela 1** - Sumário das principais alterações encontradas em modelos experimentais de desnutrição (continua)

Tipo de dieta	Animal	Tempo de indução da desnutrição	Efeito	Patógeno	Referência
Dieta hipoproteica 3% de proteína	Rato Donryu	3 semanas	PP: 17% ↓ TNF- $\alpha$ ↓ Hb, Pt, Alb	-	Komatsu et al., 2007.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo Swiss	13 semanas	<GP, ↑CP ↓ n° Granulomas Hep. e Intest. ↓ Colágeno	<i>S. mansoni</i>	Couto et al., 2007.
Dieta hipoproteica 4% de proteína	Camundongo Swiss	2 semanas	PP: 20% ↓ TNF- $\alpha$ , IL-6 ↓ Hb, Leu, Alb, Pré-Alb, Pt	-	Fook et al., 2007.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo C57BL/6	4 semanas	PP: 26% ↓ Granuloma, CP ↑ IFN- $\gamma$ (Fase inicial) ↑ IL-4 (fase intermediária) ↓ IL-13 (fase tardia)	<i>S. mansoni</i>	Silva, 2008.
Dieta hipoproteica 40g/Kg de caseína	Camundongo Swiss	2 semanas	PP: 22% ↓ Ingestão de ração ↓ Hb, Leu, Rt Hipoceularidade MO Predominância G0/G1 c.cel.	-	Borelli et al., 2009.
Dieta hipoproteica 3% de proteína Deficiente em Fe e Zn	Camundongo BALB/c	6 semanas	PP: 35,6% ↓ IFN- $\gamma$ , CP ↓ Alb, Pt	<i>L. chagasi</i>	Malafaia et al., 2009.
Dieta hipoproteica 3% de proteína Deficiente em Fe e Zn	Camundongo BALB/c	7 semanas	PP significativa ↑ CP ↓ IFN- $\gamma$ ↓ Alb, Pré-Alb, Pt,	<i>L. chagasi</i>	Serafim et al., 2009.
Dieta hipoproteica 5% de proteína	Rato Wistar	26 dias	PP: 20% ↓ Alb	-	Merino-Sanjuán et al., 2011.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Rato Wistar	12 semanas	PP: 65% ↑ PA; Disfunção Vascular	-	Belchior et al., 2012.
Redução de 25% da quantidade ofertada de ração	Camundongo BALB/c	3 semanas	PP: 25% ↑ Timócitos imaturos	-	Núñez et al., 2012.

**Tabela 1** - Sumário das principais alterações encontradas em modelos experimentais de desnutrição (conclusão)

Tipo de dieta	Animal	Tempo de indução da desnutrição	Efeito	Patógeno	Referência
Dieta hipoproteica 20g/Kg de caseína	Camundongo BALB/c	3 semanas	PP: 17% ↓ Alb, Pré-Alb ↓ Hem, Hb, Ht, Leu Hipoplasia da MO	-	Cunha et al., 2013.
Dieta hipoproteica 2% de proteína	Camundongo C57BL/6	3 semanas	PP: 30% ↓ TCD8 <sup>+</sup> específicas para nucleoproteínas virais	Vírus Influenza	Taylor et al., 2013.
Dieta hipoproteica 8% de proteína (RBD)	Camundongo Swiss	4 semanas	PP: 30% ↓ CP ↓ Granuloma, Colágeno tipo 1 ↓ TGF-β	<i>S. mansoni</i>	Barros et al., 2014.
Dieta hipoproteica 3% de proteína	Camundongo BALB/c	8 semanas	PP significativa ↑ CP ↓ Pt, Alb	<i>L. infantum</i>	Ostolin, 2014.
Dieta hipoproteica 20g/Kg de caseína	Camundongo BALB/c	4 semanas	↓ Hb, Leu, Pt, Alb, Pré-Alb ↓ IL-1β e IL-12 VP: -5,6%	-	De Oliveira et al., 2014.
Dieta hipoproteica 2% de proteína	Camundongo C57BL/6	5 semanas	↑ Aumento da ingestão de ração ↓ Pt, Alb Alteração no ciclo celular (CTH)	-	Nakajima et al., 2014.
Dieta hipoproteica 4% de proteína	Camundongo BALB/c	7 dias	PP: 17,5% ↓ CP Atrofia tímica: ↓ Timócitos	<i>L. infantum</i>	Losada-Barragán et al., 2017.
Dieta hipoproteica 2% de proteína	Camundongo C57BL/6	5 semanas	PP: 20,16% ↓ Pt, Alb	-	Beltran, 2018.

**Abreviaturas:** Alb (albumina); C. cel (ciclo celular); CP (carga parasitária); CTH (células-tronco hematopoiéticas); Eritrob (eritroblastos); FHP (fibrose hepática periportal); GP (ganho ponderal); Hb (hemoglobina); Hem (hemácia); Hep (hepático); Ht (hematócrito); ID (intestino delgado); Intest (intestinais); Leu (leucócitos); MC (massa corporal); MO (medula óssea); Morf (morfológica); PA (pressão arterial); PGE2 (prostaglandina E2); PP (perda ponderal); Pré-Alb (pré-albumina); Pt (proteínas totais); RBD (dieta básica regional, do inglês *regional basic diet*); Rt (reticulócitos); VP (variação ponderal).

## 2 JUSTIFICATIVA

Esquistossomose e desnutrição são importantes problemas de saúde pública que acometem uma parcela significativa da população mundial, sendo mais frequentes em países em desenvolvimento (ATINMO et al., 2009; WHO, 2009). Apesar dos progressos no combate à fome, a desnutrição voltou a aumentar no mundo, atingindo 815 milhões de pessoas (FAO; WHO, 2018). Com relação às esquistossomoses, esse cenário também permanece preocupante: estimativas da OMS apontam que cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo possuam a doença (WHO, 2018b).

Geralmente as áreas endêmicas de esquistossomose se sobrepõem às de desnutrição (COUTINHO et al., 1997a). Embora se tenham obtidos avanços no estudo da esquistossomose em seus diferentes aspectos e dos conhecimentos adquiridos quanto a sua imunologia e imunopatologia, as relações existentes entre esquistossomose e desnutrição ainda não estão completamente esclarecidas.

Além disso, tem sido amplamente aceito que a imunidade ou a susceptibilidade a diversas doenças infecto-parasitárias estão diretamente relacionadas ao estado nutricional dos indivíduos (BEISEL et al., 1982). Desse modo, devido às lacunas existentes nos mecanismos que medeiam essa relação, mais estudos são necessários. Concomitante a isso, a desnutrição ocupando as mesmas áreas geográficas em diferentes regiões do mundo onde a esquistossomose é endêmica, representa motivo suficiente para que o estudo dessas inter-relações continue a ser aprofundado (COUTINHO, 2008).

Pretendemos com este trabalho, inicialmente, desenvolver um modelo experimental de desnutrição proteico-energética, com o intuito de avaliar o impacto do estado nutricional inadequado no desenvolvimento do *S. mansoni*, e posteriormente, avançar no que diz respeito ao entendimento da falha de mecanismos imunológicos, identificando o envolvimento de mediadores inflamatórios, moduladores e de subpopulações celulares nesse processo.

## *Objetivos*

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o impacto de diferentes dietas restritivas em proteínas e lipídios na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Padronizar um modelo murino de desnutrição, através do fornecimento de dietas com diferentes teores de proteína.
2. Avaliar o impacto das diferentes dietas restritivas em proteínas e lipídios no desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* em seu hospedeiro definitivo.
3. Avaliar o impacto das diferentes dietas restritivas em proteínas e lipídios na patologia hepática associada à infecção pelo *Schistosoma mansoni* em seu hospedeiro definitivo.
4. Avaliar a resposta imunológica desencadeada em resposta à infecção por *Schistosoma mansoni* no hospedeiro submetido às diferentes dietas restritivas em proteínas e lipídios.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério de Produção do Instituto René Rachou (BIOP – Fiocruz/MG), com 7 a 8 semanas de idade. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação (BIOTEX) do mesmo instituto de pesquisas. Estes foram acondicionados em microisoladores, mantidos em ambiente com condições de temperatura, luz e umidade controladas, e receberam ração e água *ad libitum*. Os procedimentos utilizados neste projeto, os quais necessitaram do uso camundongos foram licenciados pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, sob a licença n° LW-2/18 (anexo 1).

### 4.2 Dietas experimentais

Após o desmame (30 dias), os animais foram alimentados com dieta comercial CR1 (Nuvilab<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) até o início dos experimentos. Em seguida, com o intuito de avaliar o impacto de diferentes dietas restritivas na infecção experimental por *S. mansoni*, 60 animais foram divididos em 5 grupos, os quais foram alimentados com as seguintes dietas experimentais: **Controle:** dieta padrão AIN-93M (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), cuja composição proteica e de lipídios é 14% e 10%, respectivamente; **Hipoproteico 3% e 8%:** dieta AIN-93M modificada (3% e 8% de proteína, respectivamente); **Hipolipídico 2,5% e 5%:** dieta AIN-93M modificada (2,5% e 5% de lipídios, respectivamente). As rações foram fornecidas pela PragSoluções Biociências<sup>®</sup> São Paulo, Brasil. A composição das dietas encontra-se na **tabela 2**.

As rações foram armazenadas a -20°C, sendo que 2 dias antes de distribuí-las aos camundongos, separava-se uma parte das mesmas, suficiente para o consumo semanal, e as condicionava a temperatura de refrigeração (4°C). Em cada ensaio realizado, utilizou-se cerca de 3,5 Kg de ração para cada grupo experimental.

É importante ressaltar que a caseína removida das dietas Hipoproteicas foi substituída por amido de milho, e com isso, as dietas eram isocalóricas, com relação à dieta controle. Para as rações Hipolipídicas o óleo de soja retirado também foi substituído por amido de milho. Porém, o valor energético de ambas as dietas foi discretamente inferior ao da ração controle,

## Materials e Métodos

uma vez que a substituição calórica de lipídios por carboidratos não se dá na mesma proporção (1g de carboidratos, oferece 4 Kcal, enquanto que 1g de lipídios fornece 9 Kcal).

Semanalmente, procedeu-se à pesagem das rações, em todos os grupos, com o intuito de estimar o consumo diário de ração e de proteína pelos animais. A ingestão diária de proteína foi feita a partir do conteúdo proteico presente nas rações utilizadas.

**Tabela 2** - Composição das dietas experimentais (g/Kg de dieta)

Nutrientes	Dietas				
	Padrão AIN-93M	Hipoproteica 3%	Hipoproteica 8%	Hipolipídica 2,5%	Hipolipídica 5%
Caseína	140	35,7	95,2	140	140
Amido de Milho	465,7	570	510,5	495,7	485,7
Sacarose	100	100	100	100	100
Maltodextrina	155	155	155	155	155
Óleo de soja	40	40	40	10	20
Celulose	50	50	50	50	50
Mistura de minerais <sup>1</sup>	35	35	35	35	35
Mistura de vitaminas <sup>2</sup>	10	10	10	10	10
Cistina	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Valor calórico total (Kcal)	3850	3850	3850	3700	3750
Carboidratos (% de calorias)	76	87	82	82,5	80
Proteínas (% de calorias)	14	3	8	15	15
Lipídios (% de calorias)	10	10	10	2,5	5

<sup>1</sup>Mistura de minerais de acordo com as recomendações da dieta AIN-93M.

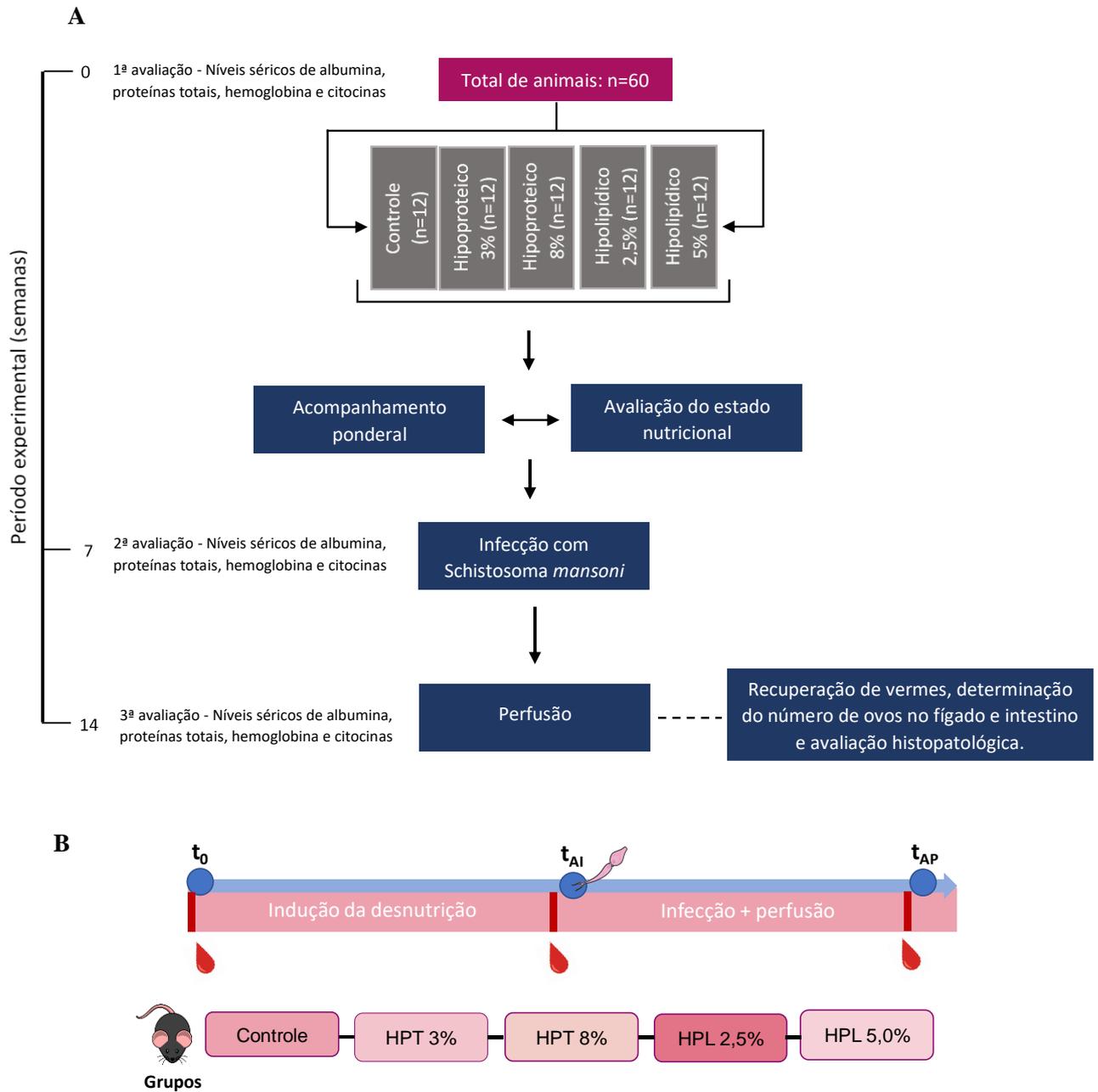
<sup>2</sup>Mistura de vitaminas de acordo com as recomendações da dieta AIN-93M.

Fatores de conversão: carboidratos 4 kcal/g, proteínas 4 kcal/g, lipídios 9 kcal/g

### 4.3 Delineamento experimental

Ao longo deste trabalho foram realizados dois experimentos independentes. A seguir é apresentado, de forma esquematizada, o delineamento experimental (**figura 6A e 6B**) e os itens posteriores descrevem especificamente a metodologia empregada.

## Materiais e Métodos



**Figura 6 - Representação esquemática do delineamento experimental.** Para a realização dos experimentos, foram utilizados 5 grupos: Controle, Hipoproteico 3%, Hipoproteico 8%, Hipolipídico 2,5% e Hipolipídico 5%. A avaliação do estado nutricional foi feita através do acompanhamento da curva ponderal, dos parâmetros bioquímicos, além do consumo de ração e de proteínas. Após os camundongos do grupo HPT 3% terem apresentado perda ponderal de, aproximadamente, 20% com relação ao controle, animais de todos os grupos experimentais foram infectados, e 50 dias após, foram perfundidos para avaliação da carga parasitária e histopatológica (A). Para análise dos parâmetros bioquímicos e imunológicos, a coleta de sangue ocorreu nos seguintes períodos: Tempo zero ( $t_0$ ), período que representa antes do início das dietas experimentais; Antes da infecção por *S. mansoni* ( $t_{AI}$ ), período no qual houve perda de peso significativa (cerca de 20%) nos animais HPT3%; Antes da perfusão ( $t_{AP}$ ), a qual ocorre 50 dias após a infecção (B). HPT 3% e HPT 8% (dieta hipoproteica 3% e 8%, respectivamente); HPL 2,5% e 5,0% (dieta hipolipídica 2,5% e 5,0%, respectivamente).

#### 4.4 Avaliação nutricional dos animais

Com o intuito de avaliar o estado nutricional dos animais, suas massas corpóreas foram acompanhadas três vezes por semana e a concentração sérica de proteínas totais, albumina e hemoglobina foram determinadas em diferentes momentos: no início do experimento (tempo zero), antes da infecção e antes da perfusão. Com relação aos dados relativos à massa corpórea dos animais de cada grupo ao longo do período experimental, foi confeccionada uma curva acompanhada de tratamento estatístico, na qual foi avaliada a evolução ponderal em relação ao início do protocolo experimental, com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ do peso inicial} = \frac{\text{Peso atual}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

No momento em que houve uma diferença de peso de, aproximadamente, 20% entre o grupo hipoproteico 3% e o controle, procedeu-se à infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Para determinação do perfil bioquímico, foram coletados, aproximadamente, 200 µL de sangue de cada animal em tubos de polipropileno de 1,5mL, previamente identificados e centrifugados a 3220 x g por 5min. para obtenção do soro. Em seguida, o soro foi congelado a -20°C, para análises posteriores.

Para avaliação dos níveis séricos de hemoglobina, aproximadamente 50 µL de sangue foram retirados e acondicionados em tubos de polipropileno de 1,5mL, previamente identificados, contendo 5 µL de EDTA (Etilenodiaminotetracético) como anticoagulante.

A seguir, estão descritos especificamente a metodologia empregada na determinação dos parâmetros bioquímicos mencionados anteriormente.

##### 4.4.1 Proteínas totais

A avaliação da concentração sérica de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto, utilizando-se o kit comercial Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>, Cat. 99, Lagoa Santa, MG, Brasil. Neste método, os íons cobre (Cu<sup>+2</sup>) em meio alcalino (reagente de biureto) reagem com as ligações peptídicas das proteínas séricas formando cor púrpura, que tem absorvância máxima em 545 nm, proporcional à concentração das proteínas na amostra. O kit fornece um padrão com concentração 4,0 g/dL, o qual é utilizado para se determinar a concentração de proteínas

totais na amostra teste. A realização da dosagem bioquímica de proteínas totais seguiu o procedimento simplificado na **tabela 3**.

**Tabela 3** - Quantidade de cada componente necessário para avaliação sérica de proteínas totais

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-	10 µL	-
Padrão	-	-	10 µL
Água tipo 1	10 µL	-	-
Reagente de biureto	500 µL	500 µL	500 µL

**Fonte:** Adaptado de Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>

Após a homogeneização, os tubos foram incubados à temperatura de 37°C por 10 min. Em seguida, 200 µL de cada amostra, do padrão e do branco foram transferidos para placas de microensaios de 96 poços (fundo chato). Em seguida, as absorbâncias foram obtidas em leitora de microplacas a 545 nm, descontando-se os valores de absorbância obtidos na amostra branco dos valores de absorbância das amostras teste e padrão.

Para se obter a concentração de proteínas totais nas amostras, o seguinte cálculo foi realizado:

$$Proteínas\ totais\ (g/dL) = \frac{Absorbância\ do\ teste}{Absorbância\ do\ padrão} \times 4$$

#### 4.4.2 Albumina

A dosagem de albumina foi realizada utilizando-se o kit comercial Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>, Cat. 19, Lagoa Santa, MG, Brasil. A albumina tem a propriedade de se ligar a uma grande variedade de ânions orgânicos e moléculas complexas de corantes. O sistema de medição se baseia no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante complexo (verde de bromocresol), quando este se liga à albumina. A cor formada é proporcional à quantidade de albumina na amostra. Para a realização da dosagem de albumina sérica, adotou-se o procedimento simplificado na **tabela 4**.

**Tabela 4** - Quantidade de cada componente necessário para avaliação sérica de albumina

	Branco	Teste	Padrão
Reagente de cor	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Amostra	-	10 µL	-
Padrão	-	-	10 µL

**Fonte:** Adaptado de Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>

Os tubos foram homogeneizados e após 2 minutos, 200 µL de cada amostra, do padrão e do branco foram transferidos para placas de microensaios de 96 poços (fundo chato). Em seguida, as absorbâncias foram obtidas em leitora de microplacas a 630 nm, descontando-se os valores de absorbância obtidos na amostra branco dos valores de absorbância das amostras teste e padrão.

Para se obter a concentração de albumina nas amostras o seguinte cálculo foi realizado:

$$Albumina (g/dL) = \frac{Absorbância\ do\ teste}{Absorbância\ do\ padrão} \times 3,8$$

#### 4.4.3 Hemoglobina

A avaliação da concentração sanguínea de hemoglobina foi realizada através do kit comercial Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>, Cat. 43, Lagoa Santa, MG, Brasil. Neste caso, o ferro, no estado ferroso, do grupo heme da hemoglobina, oxi-hemoglobina e carboxi-hemoglobina é oxidado para o estado férrico pelo ferricianeto, contido no reagente de cor fornecido pelo Kit, formando hemiglobina (Hi). Esta se combina com o cianeto ionizado, também contido no reagente de cor e produz o cianeto de hemiglobina (HiCN), o qual é medido em 540 nm. Para a realização da dosagem sanguínea de hemoglobina o procedimento simplificado na **tabela 5** foi realizado.

**Tabela 5** - Quantidade de cada componente necessário para avaliação sérica de hemoglobina

	Branco	Teste	Padrão
Reagente de cor	-	2500 µL	2500 µL
Amostra	-	10 µL	-
Padrão	-	-	10 µL
Água tipo I	10 µL	-	-

**Fonte:** Adaptado de Labtest Diagnóstica S.A.<sup>®</sup>

Após a homogeneização, os tubos foram deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. Depois deste tempo, 200 µL de cada amostra e do padrão foram transferidos para placas de microensaios de 96 poços (fundo chato). Em seguida, as absorvâncias foram obtidas em leitora de microplacas a 630 nm, descontando-se os valores de absorvância obtidos na amostra branco dos valores de absorvância das amostras teste e padrão.

Para se obter a concentração de hemoglobina nas amostras o seguinte cálculo foi realizado:

$$\text{Hemoglobina (g/dL)} = \frac{\text{Absorvância do teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 10$$

#### 4.5 Infecção dos animais

Conforme citado anteriormente, confeccionou-se uma curva de massa corpórea acompanhada de tratamento estatístico e somente quando houve diferença significativa de, aproximadamente, 20% entre a média das massas corpóreas dos animais alimentados com a dieta hipoproteica 3% e o grupo controle, procedeu-se à infecção. É importante ressaltar que no modelo experimental utilizado, a escolha da diferença ponderal de 20% a 25% como critério para infecção dos animais, baseou-se em trabalhos descritos na literatura (BORELLI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2016).

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) de *Schistosoma mansoni*. A mesma foi fornecida pelo Moluscário Instituto René Rachou (Fiocruz/MG), onde é mantida por passagem em caramujo *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss ou BALB/c. As cercárias foram obtidas através da exposição de caramujos infectados à luz por 1 a 2 horas, a fim de permitir a liberação das mesmas.

## *Materiais e Métodos*

A infecção dos animais foi realizada através da via percutânea, cuja escolha se justifica por mimetizar a via de infecção em seres humanos. Para realização da infecção percutânea, um dia antes da infecção, os camundongos tiveram os pelos da região abdominal removidos em uma área de 2,5 cm de diâmetro. Após a remoção dos pelos, os camundongos foram mantidos em gaiolas sem maravalha, contendo uma grade que os separa do fundo da gaiola onde foram depositadas as fezes e urina dos mesmos. No momento da infecção, os animais foram anestesiados com uma mistura dos anestésicos Cloridato de Xilasina (na dosagem de 5 mg/kg) e Cloridato de Ketamina (100 mg/Kg), via intraperitoneal, e imobilizados com as patas presas à mesa, com auxílio de esparadrapo. Em seguida, foi colocado sobre o abdômen dos animais uma placa de acrílico perfurada no centro onde foi depositado 200 µL de uma solução contendo aproximadamente 100 cercárias de *Schistosoma mansoni* da cepa LE. Após o período de 1 hora, o esparadrapo, bem como a placa de acrílico foram retirados e os camundongos colocados de volta na gaiola sobre a grade de metal, conforme descrito anteriormente. Apenas no dia seguinte os camundongos foram colocados em gaiolas contendo maravalha.

### **4.6 Perfusão dos animais**

Com o objetivo de avaliar o impacto de diferentes dietas restritivas sobre o desenvolvimento do parasito, camundongos dos grupos alimentados com as diferentes dietas restritivas e do grupo controle foram submetidos a perfusão, cinquenta dias após serem infectados. Os animais foram eutanasiados por descolamento cervical, e os vermes recuperados do sistema porta hepático por perfusão das veias mesentéricas, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes recuperados foram contados com auxílio de uma lupa, separando-os em machos e fêmeas.

### **4.7 Contagem do número de ovos e avaliação histopatológica**

Durante a perfusão foram retirados o fígado e o intestino de cada camundongo dos grupos que receberam as diferentes dietas restritivas e do grupo controle, a fim de determinar o número de ovos presentes nestes. Os órgãos foram pesados e acondicionados em tubos cônicos contendo solução de hidróxido de potássio (KOH) 10% por 16 horas, a 4°C. No dia seguinte, os mesmos foram incubados à 37°C durante trinta minutos em banho-maria. Então, os órgãos digeridos foram centrifugados por cinco minutos a 900 x g, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em salina 0,85%. Esta etapa foi repetida por três vezes. Após a última

## *Materiais e Métodos*

centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de salina 0,85% e o número de ovos foi determinado com o auxílio de um microscópio de luz. Foram realizadas três contagens de 10 µL da solução de cada órgão, a fim de se determinar o número de ovos por grama de órgão.

Partes do fígado dos animais também foram coletadas após a perfusão para avaliação histopatológica. Estes foram fixados com formalina 10%, desidratados em concentrações crescentes de etanol, clarificados com xilol, impregnados em parafina e seccionados por micrótomo em cortes, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para observação dos granulomas. A fim de determinar a área dos granulomas foram escolhidos, aproximadamente, 120 granulomas de cada grupo (10 granulomas/animal) no estágio exsudativo-produtivo. Os granulomas foram medidos utilizando o software de análise de imagens AxionVision 4.8 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany), sendo a área total de cada granuloma expressa em micrômetros quadrados (µm<sup>2</sup>).

### **4.8 Avaliação da fecundidade de fêmeas**

A fecundidade das fêmeas de vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada a partir do número de ovos retidos por grama de tecido (fígado ou intestino), dividido pelo número de casais de *Schistosoma mansoni* recuperados na perfusão.

$$Fecundidade = \frac{N^{\circ} \text{ de ovos por grama de tecido}}{N^{\circ} \text{ de casais de } S. mansoni}$$

### **4.9 Avaliação do perfil de resposta imune dos animais**

Para avaliação do perfil de resposta imune dos camundongos, aproximadamente, 200 µL de sangue foram coletados em três momentos do período experimental: tempo inicial (tempo zero), antes da infecção e antes da perfusão. Tais amostras foram centrifugadas (3220 x g/5min.) para a obtenção do soro e então congeladas a -70°C, para análises posteriores.

Foi realizada a quantificação dos níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN-γ, IL-17 utilizando-se o sistema citofluorométrico com microesferas fluorescentes (CBA - *Cytometric Bead Array*, BD Pharmingen, Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, [https://wwwbdbiosciences.com/documents/CBA\\_MouseTh1Th2Th17\\_Kit\\_Manual.pdf](https://wwwbdbiosciences.com/documents/CBA_MouseTh1Th2Th17_Kit_Manual.pdf)).

## Materials e Métodos

Esse sistema emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas de interesse. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas, empregando pequenos volumes de amostra.

O CBA foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante, porém, com algumas modificações. Alíquotas de 25µL de cada amostra, bem como, 25µL do controle negativo do kit, foram incubadas com 20µL da mistura das sete *beads* (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF-α) e 17µL do reagente de detecção marcado com PE, em placas de cultura celular de 96 poços, fundo em “U”, por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Assim como as amostras, também foram incubadas alíquotas do padrão de citocinas do kit, diluídas previamente, por diluição seriada, partindo de uma concentração de 5000 pg/mL até 20 pg/mL.

Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 160 µL tampão de lavagem e centrifugadas a 1055 *x g*, a 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de tampão de lavagem foram adicionados para ressuspensão das esferas e posterior aquisição das amostras no FACSVerse. Foi utilizado o software FACSSuite e o Calibrate Beads da BD com o objetivo de ajustar o equipamento. Para cada amostra processada foram adquiridos 2100 eventos dentro de região pré-estabelecida (300 eventos por parâmetro testado). O cálculo dos níveis de citocinas foi realizado com a utilização do software FCAP Array (BD Pharmingen). A tabela 6 mostra o limite de detecção das citocinas avaliadas.

**Tabela 6** - Limite de detecção de citocinas

Citocina	Limite de detecção (pg/mL)
IL-2	0,1
IL-4	0,03
IL-6	1,4
IFN-γ	0,5
TNF	0,9
IL-17	0,8
IL-10	16,8

**Fonte:** BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit Instruction Manual.

### 4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7.0 (San Diego, Ca, USA). Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de D’Agostino e Pearson. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando análise de variância, seguida dos testes de comparações múltiplas de Tukey. Os

*Materiais e Métodos*

resultados que não apresentaram distribuição normal, foram analisados através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunns, Para tais testes será considerado significativa as diferenças com o valor de  $p < 0,05$ . Além disso, os dados referentes aos parâmetros bioquímicos foram submetidos ao teste de variância por dois fatores (Two-Way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, no qual foram verificadas as diferenças específicas entre as médias dos grupos em um determinado tempo, e ao longo do tempo dentro de um mesmo grupo.

## 5 RESULTADOS

A seguir, estão apresentados os resultados de dois experimentos (identificados como 1 e 2) realizados independentemente.

### 5.1 Avaliação do estado nutricional dos animais estudados

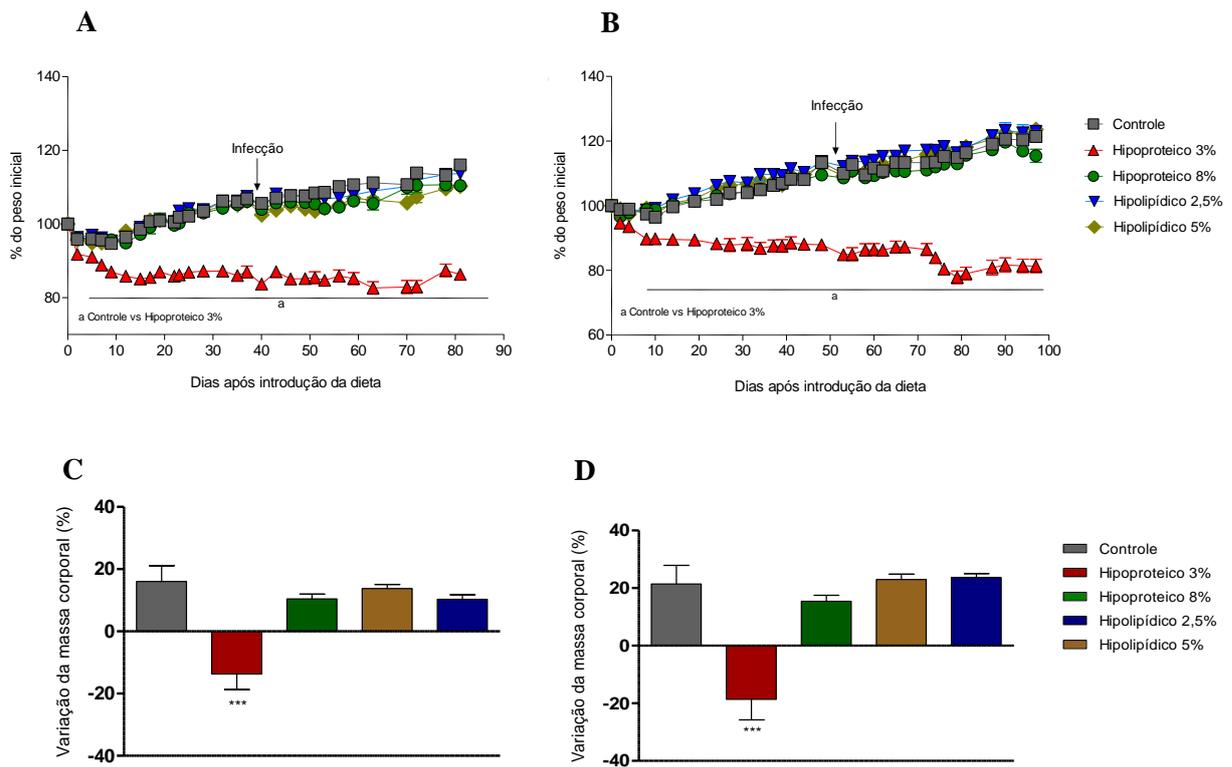
Para avaliação do estado nutricional dos camundongos, procedeu-se ao acompanhamento da curva ponderal, à avaliação de parâmetros bioquímicos e do consumo de ração e de proteínas.

#### 5.1.1 Evolução ponderal ao longo do período experimental

A fim de avaliar o impacto de diferentes dietas na massa corporal dos camundongos, acompanhou-se a evolução ponderal dos animais dos grupos Controle (CTL), Hipoproteico 3% (HPT 3%) e 8% (HPT 8%) e Hipolipídico 2,5% (HPL 2,5%) e 5% (HPL 5%). Conforme pode ser observado na **figura 7A e B** com exceção do grupo HPT 3%, todos os grupos apresentaram ganho de peso ao longo do período experimental, sendo que não houve diferença significativa no ganho de massa corporal dos animais desses grupos com relação ao CTL.

Todavia, a partir do 5º dia após a introdução da dieta, o grupo HPT 3% apresentou perda ponderal significativa, quando comparado ao CTL, sendo que essa diferença se manteve em todo o período experimental. No 39º e 51º dia após a introdução das dietas, para os experimentos 1 e 2 (**figura 7A e B**), respectivamente, os animais de todos os grupos foram infectados, uma vez que neste período observou-se uma diferença significativa de, aproximadamente, 20% na massa corporal entre os animais do grupo HPT 3% e os do grupo CTL. Após 81 e 97 dias de experimento, animais CTL ganharam cerca de 16% e 21% de massa corporal, em contrapartida, camundongos HPT 3% apresentaram uma perda ponderal de, aproximadamente, 14% e 19%, para os experimentos 1 e 2, respectivamente (**figura 7C e D**).

## Resultados



**Figura 7 - Evolução da massa corporal ao longo do período experimental em camundongos alimentados com diferentes dietas.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e HPT 8%, respectivamente), Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e HPL 5%, respectivamente). **(A, B)** Os animais foram pesados três vezes por semana. A análise estatística foi realizada pelo teste Two-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos CTL e HPT 3% encontram-se demonstradas no gráfico. A seta aponta o período experimental em que houve a infecção com 100 cercárias de *S. mansoni*. **(C, D)** Variação do peso corporal dos animais. As barras representam a média  $\pm$  o desvio da variação dos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas nos gráficos. As identificações A, C; B e D correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

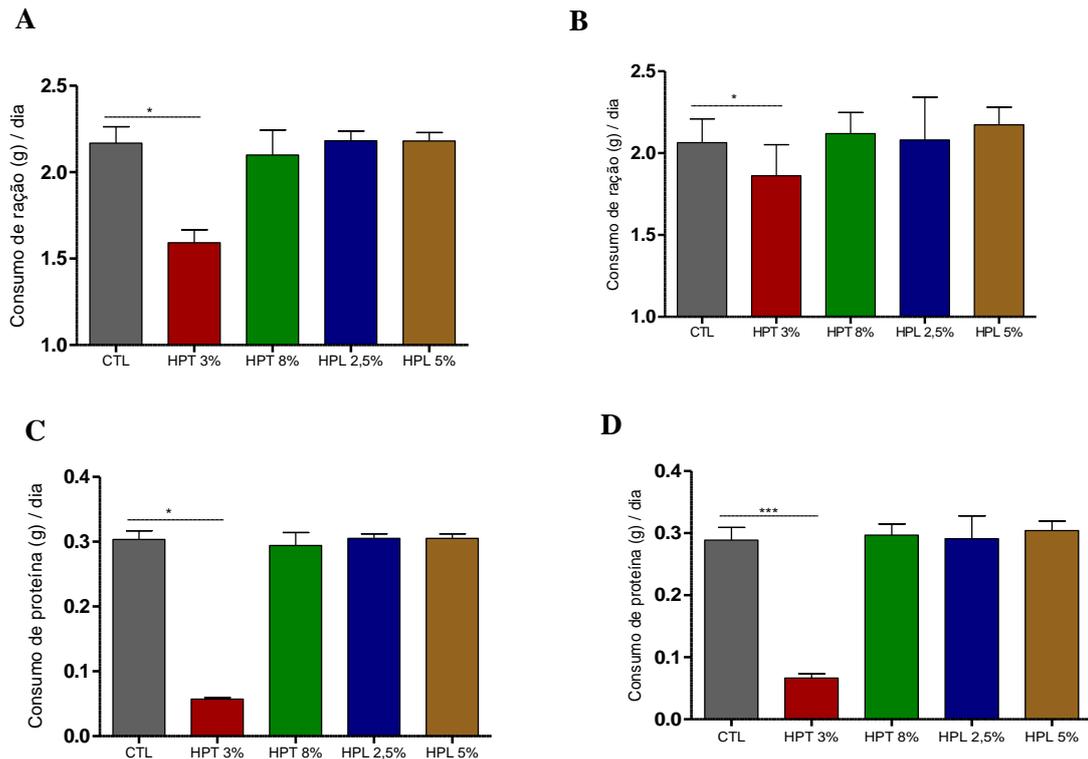
### 5.1.2 Determinação do consumo de ração e proteínas

A determinação do consumo de ração auxiliou para o estabelecimento da quantidade de alimento que foi fornecido aos animais durante toda a etapa experimental, evitando assim, períodos de jejum ou desperdício de ração, propiciando a robustez do modelo experimental de desnutrição. Além disso, o monitoramento do consumo diário de ração permite a determinação do consumo diário de proteína.

Animais do grupo HPT 3% consumiram uma quantidade significativamente menor de ração (**figura 8A e B**) e de proteína (**figura 8C e D**) em relação ao CTL. Para os demais grupos não houve diferença significativa nesses parâmetros, quando comparados ao grupo CTL.

## Resultados

Conforme mencionado, através da porcentagem de proteína presente nas rações utilizadas calculou-se o consumo diário de proteína pelos animais. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, o tipo de desnutrição induzida nos animais que receberam a dieta hipoproteica 3% pode ser classificado como DPE, visto que houve redução no consumo de ração, e consequentemente, de calorias ingeridas, e no consumo de proteínas.



**Figura 8 - Consumo diário de ração e de proteína em camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente), Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). A partir da quantidade diária de ração ingerida, foi determinado o consumo diário de proteína, baseando-se no teor proteico das dietas experimentais. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão do consumo diário de ração (A, B) e de proteínas (C, D) dos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunns. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas nos gráficos. Os dados apresentados correspondem a dois experimentos realizados independentemente. As identificações A, C; B e D correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

### 5.1.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

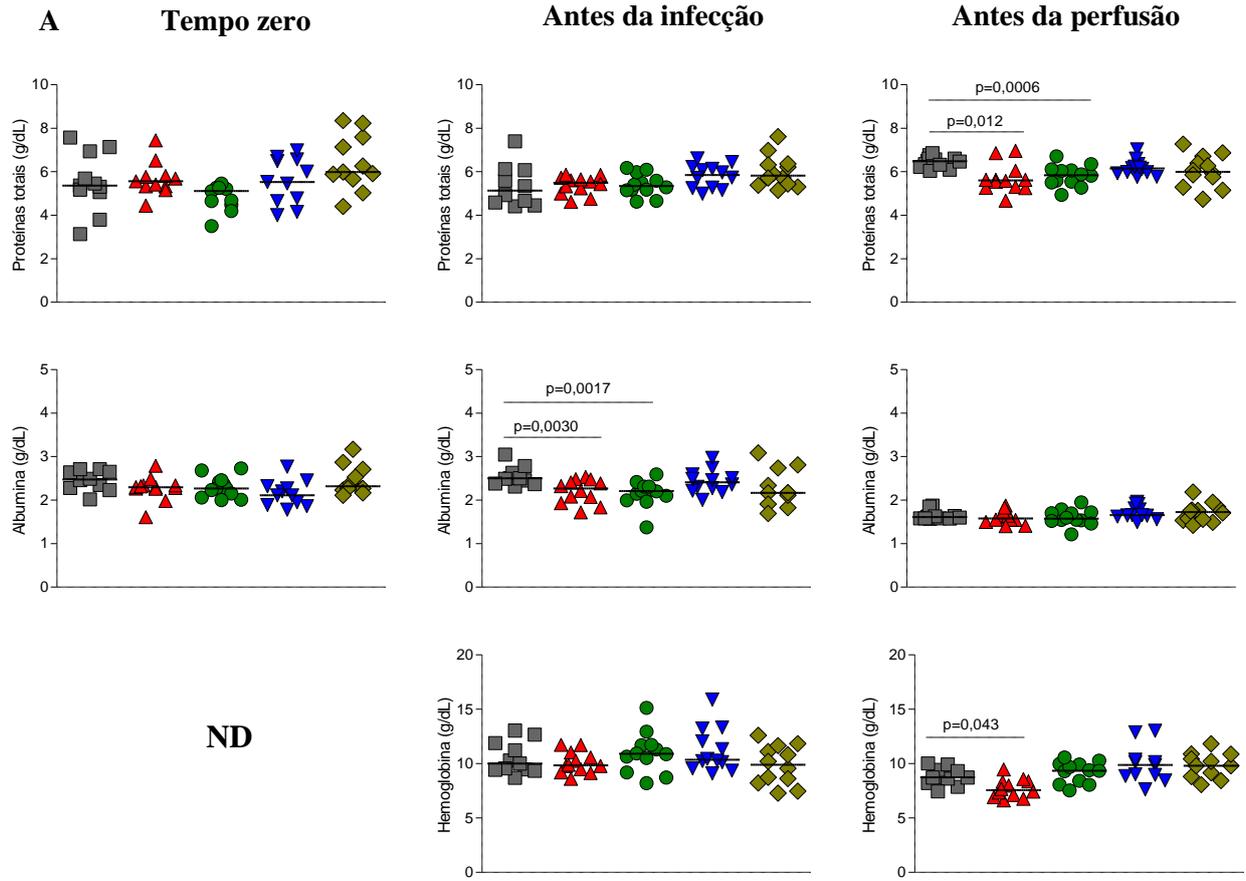
Realizou-se a avaliação dos parâmetros bioquímicos em três momentos do período experimental: tempo zero ( $T_0$ ), antes da infecção por *S. mansoni* ( $A_I$ ) e antes da perfusão do sistema porta-hepático ( $A_P$ ).

Com relação à avaliação sérica de albumina, percebe-se que no tempo  $A_I$  houve uma redução significativa da mesma no grupo HPT 3%, em ambos os experimentos realizados, com relação ao CTL (**figura 9A e B**). No experimento 2, após a infecção por *S. mansoni* ( $A_P$ ), animais do grupo HPT 3% apresentaram redução significativa nos níveis de albumina, quando comparados ao CTL (**figura 9A**). Porém, esse resultado não foi observado no experimento 1 (**figura 9B**). Além disso, é possível perceber que a infecção impactou na produção de albumina em todos os grupos experimentais (**figura 9C e D**).

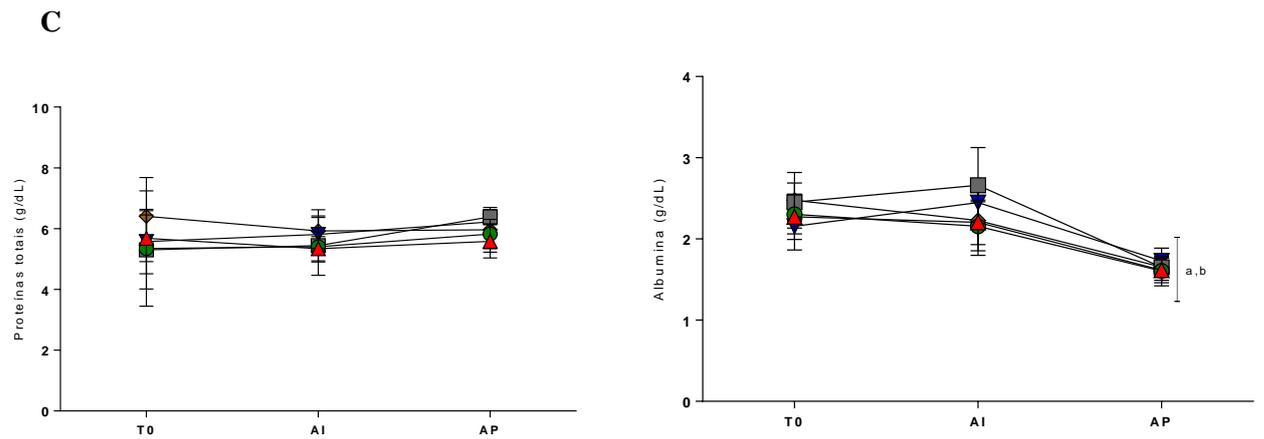
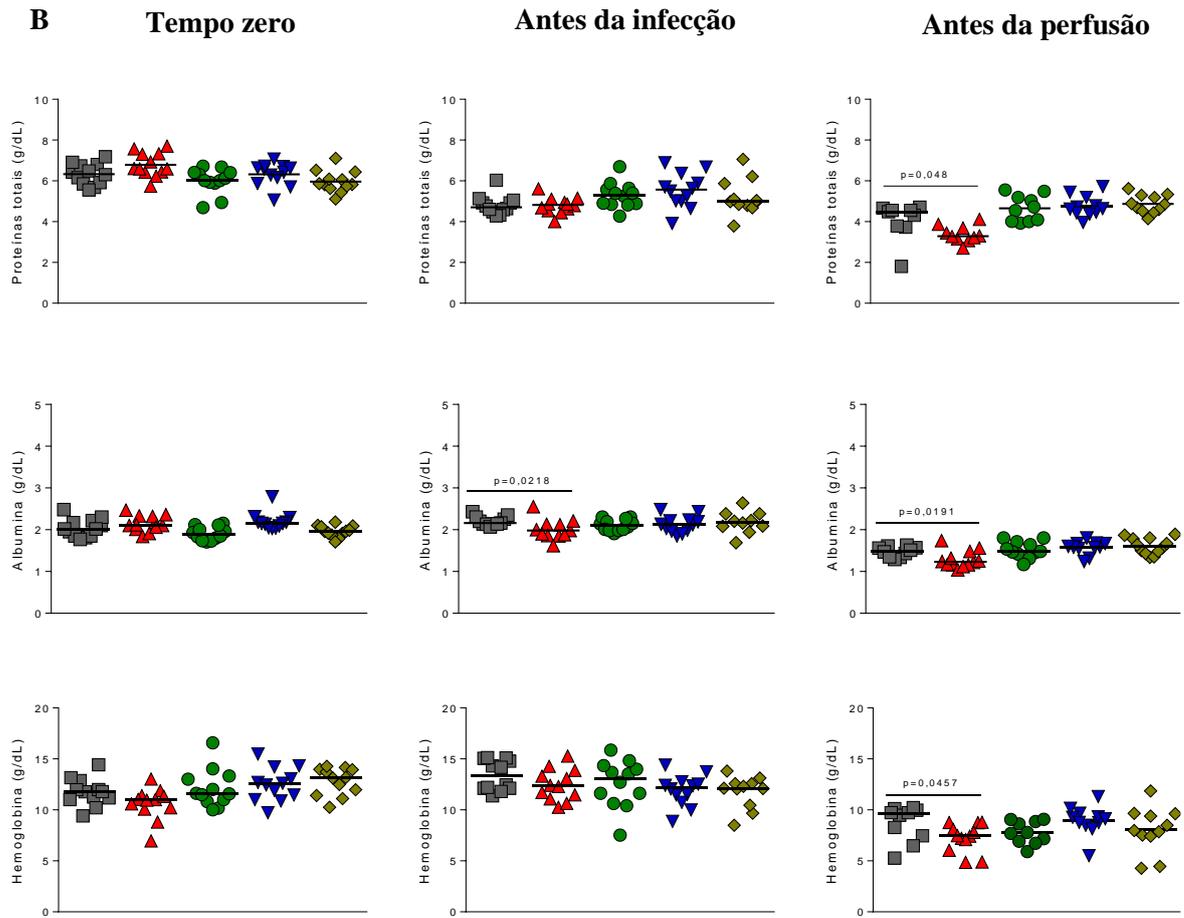
Os níveis séricos de hemoglobina e proteínas totais, mostraram-se significativamente reduzidos em camundongos do grupo HPT 3%, em relação ao CTL, somente no período  $A_P$  (**figura 9A e B**). Ao se avaliar o perfil desses parâmetros, ao longo do tempo, em cada grupo experimental, percebe-se que, no experimento 2, a infecção impactou nos níveis séricos de ambos os parâmetros em todos grupos estudados (**figura 9D**). No entanto, no experimento 1, a infecção não afetou a concentração de proteínas totais em nenhum dos grupos avaliados (**figura 9C**).

Ressalta-se que devido a problemas ocorridos na dosagem de hemoglobina no  $T_0$ , não foi possível quantificá-la no experimento 1. Além disso, é importante destacar que animais que receberam a dieta hipoproteica 8% (HPT 8%) apresentaram, no experimento 1, redução de albumina e proteínas totais nos períodos  $A_I$  e  $A_P$ , respectivamente (**figura 9A**). Porém, esses resultados não foram encontrados no experimento 2 (**figura 9B**).

## Resultados

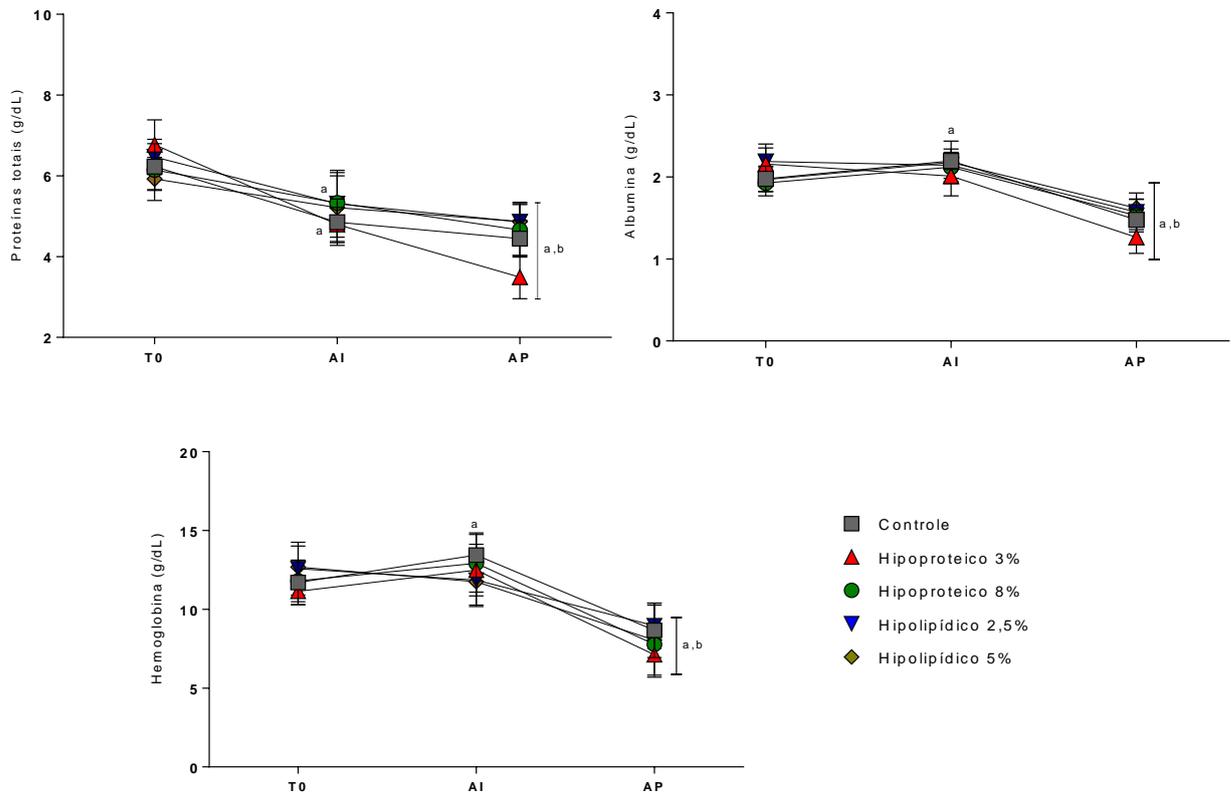


## Resultados



## Resultados

D



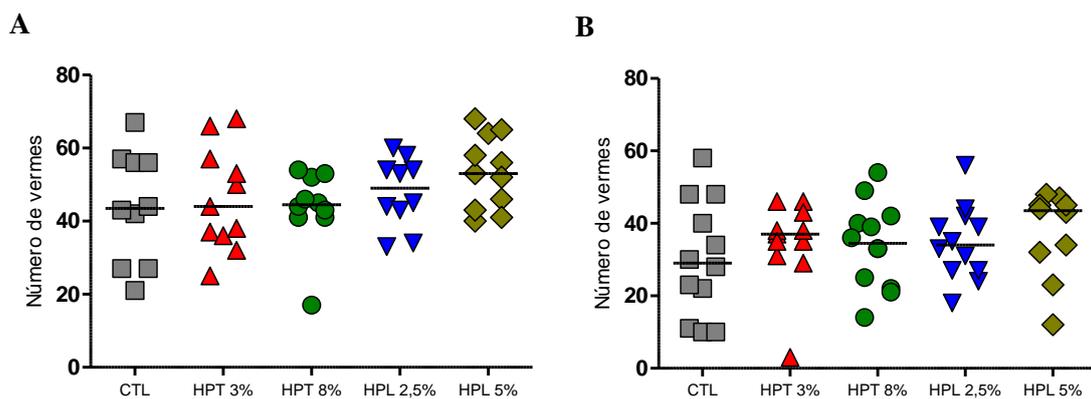
**Figura 9 - Concentrações de proteínas totais, albumina e hemoglobina ao longo do tempo em camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente), Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). Amostras de sangue foram coletadas nos tempos zero (T<sub>0</sub>), antes da infecção (A<sub>I</sub>) e antes da perfusão (A<sub>P</sub>) e o soro foi obtido para análise do perfil bioquímico. (A, B) Os gráficos representam a distribuição dos parâmetros bioquímicos em cada grupo, nos diferentes tempos avaliados. A média de cada grupo está representada no gráfico. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunns. Nos gráficos de linha (C, D) encontram-se demonstrados as médias das concentrações dos parâmetros bioquímicos para cada grupo experimental, no decorrer dos períodos avaliados. A análise estatística foi realizada através do teste Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças estatísticas com relação a T<sub>0</sub> estão indicadas pela letra a; e com relação ao período A<sub>I</sub>, com a letra b. As identificações A e C; B e D correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente. ND: não determinado.

## Resultados

### 5.2 Avaliação parasitológica: determinação da carga parasitária e do número de ovos presentes no fígado e intestino

Com o intuito de avaliar o impacto de diferentes dietas restritivas na infecção pelo *S. mansoni*, camundongos de todos os grupos experimentais foram desafiados com cercárias de *S. mansoni* e perfundidos após 50 dias da infecção desafio, para determinação da carga parasitária. Como pode ser observado na **figura 10 A e B**, não houve diferença significativa entre o número de vermes adultos recuperados de camundongos alimentados com ração deficiente em proteínas (HPT 3% e HPT 8%) ou lipídios (HPL 2,5% e HPL 5%) e o grupo controle.

É importante ressaltar que em alguns grupos experimentais o número de animais é inferior a 12, devido à presença de *outliers* ou a animais que morreram, no período que antecedeu à perfusão do sistema porta-hepático.

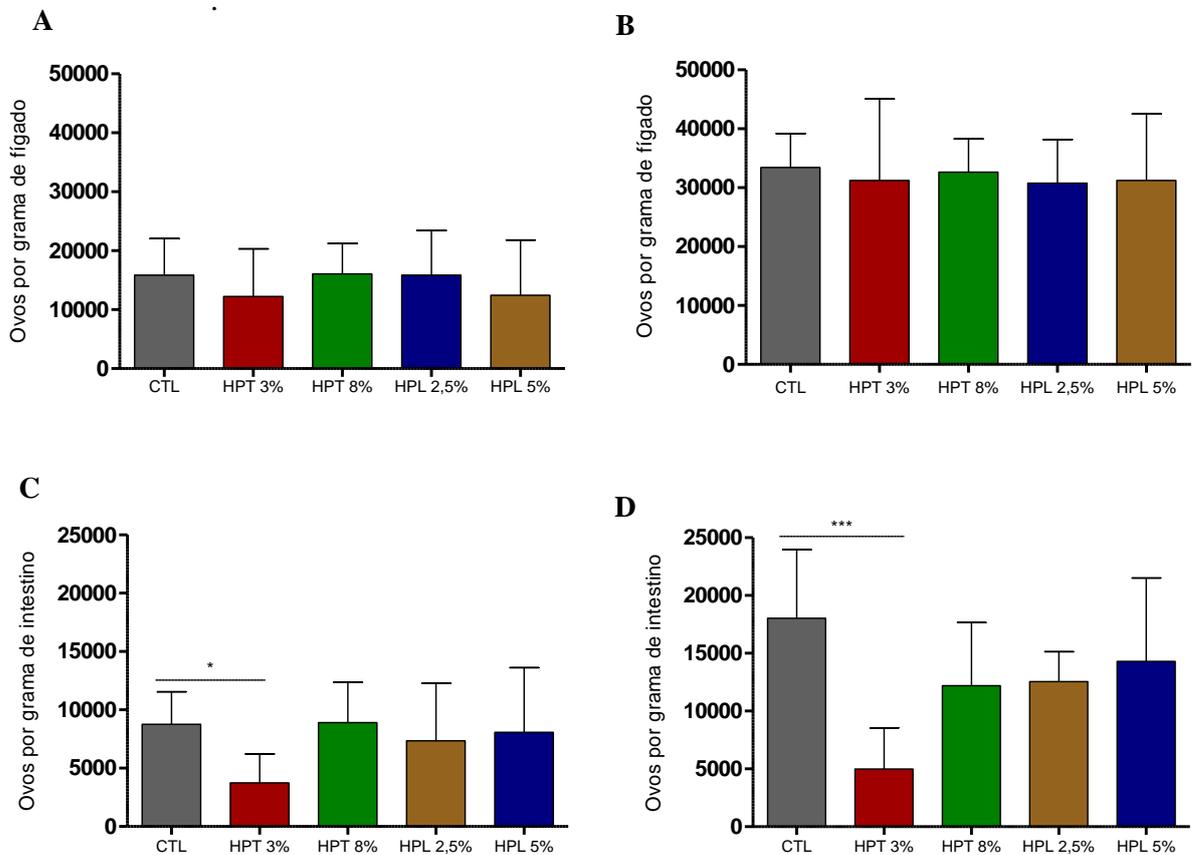


**Figura 10 - Número de vermes recuperados de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente), Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). No 39° (experimento 1) e 51° dia (experimento 2) do início das dietas, os animais foram infectados com 100 cercárias e 50 dias após, foram perfundidos para avaliação do número de vermes recuperados. Os gráficos representam a distribuição do número de vermes recuperados em cada grupo (**A, B**). A média de cada grupo está representada no gráfico. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunns. As identificações A e B correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

Os camundongos também foram avaliados quanto ao número de ovos do parasito retidos no fígado e no intestino. Na **figura 11A e B** é possível observar que não houve diferença significativa no número de ovos de *S. mansoni* recuperados do fígado de camundongos dos grupos HPT 3% e 8% e HPL 2,5% e 5%, quando comparados ao grupo CTL. Porém, animais

## Resultados

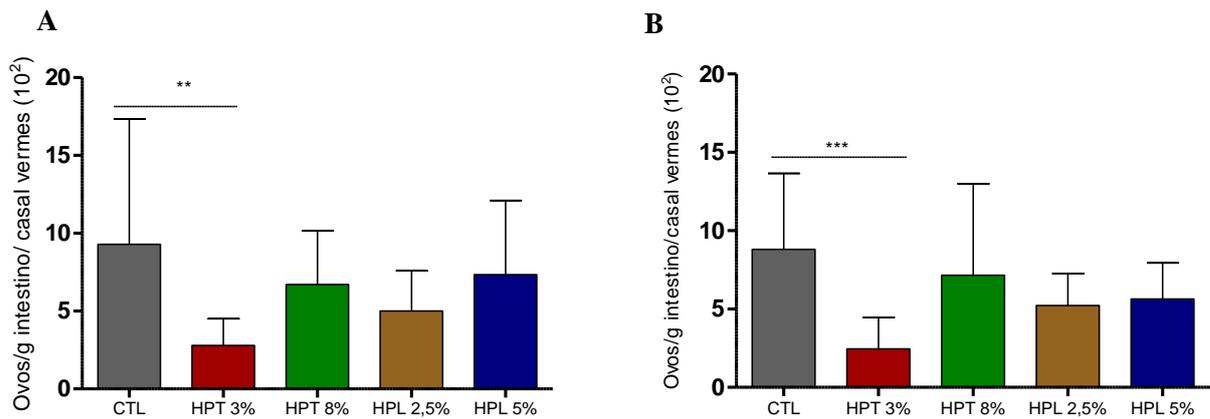
do grupo HPT 3% apresentaram uma redução significativa no número de ovos retidos no intestino, com relação a animais do grupo CTL (**figura 11C e D**).



**Figura 11 - Número de ovos retidos no fígado e intestino de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente) e Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). No 39° (experimento 1) e 51° dia (experimento 2) do início das dietas, os animais foram infectados com 100 cercárias e 50 dias após, foram perfundidos para obtenção do fígado e intestino. Os órgãos foram digeridos com KOH e o número de ovos determinado pela contagem em microscopia de luz. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão do número de ovos por grama de fígado (**A**, **B**) e do número de ovos por grama de intestino (**C**, **D**) dos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas nos gráficos. As identificações A, C; B e D correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

Para avaliar se a redução no número de ovos encontrados no intestino de camundongos do grupo HPT 3% era resultado de uma redução na fecundidade da fêmea, o número de ovos/grama de órgão/casal de vermes foi calculado. Os resultados demonstraram que houve uma redução na postura de ovos por fêmea no intestino desses animais, quando comparados com os CTL (**figura 12A e B**).

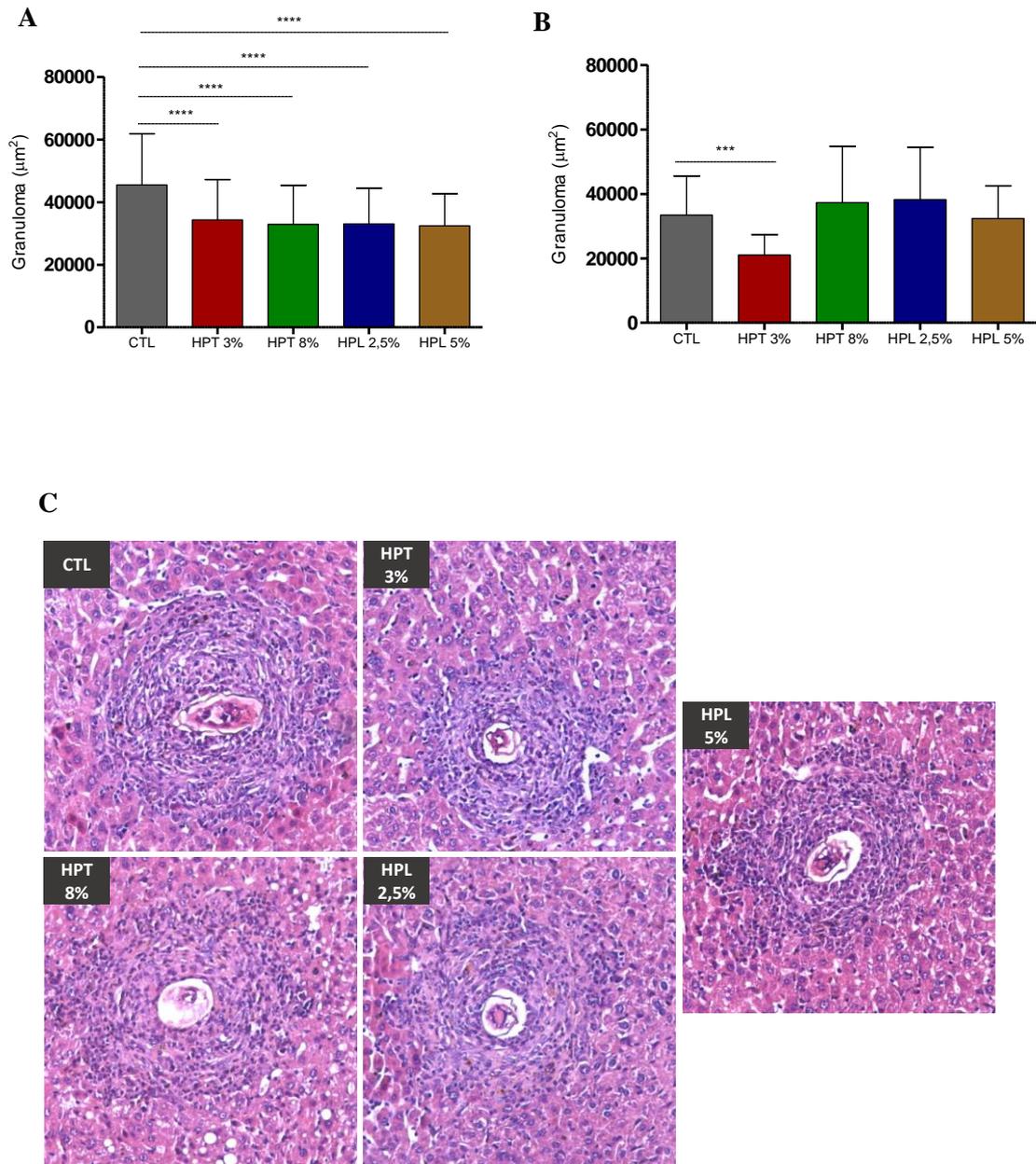
## Resultados



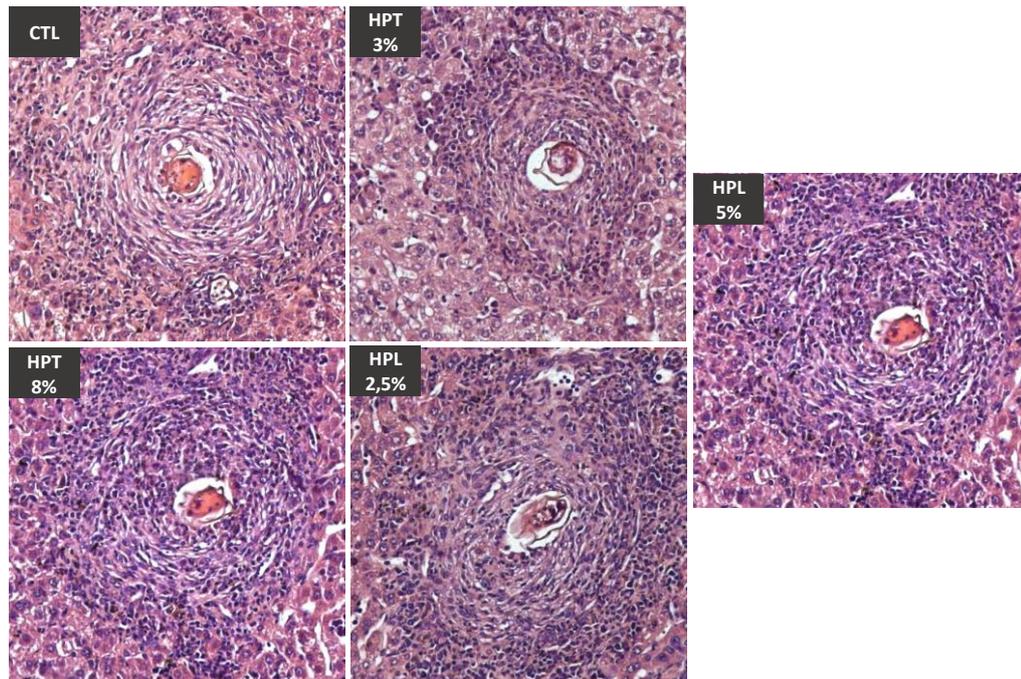
**Figura 12 - Fecundidade das fêmeas de *S. mansoni* de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente) e Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). No 39° (experimento 1) e 51° dia (experimento 2) do início das dietas, os animais foram infectados com 100 cercárias e 50 dias após, foram perfundidos para obtenção do fígado e intestino. Os órgãos foram digeridos com KOH e o número de ovos determinado pela contagem em microscopia de luz. A fecundidade foi avaliada a partir do número de ovos retidos por grama de intestino dividido pelo número de casais de *S. mansoni* recuperados na perfusão. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão da fecundidade de fêmeas de *S. mansoni* dos diferentes grupos experimentais (A, B). A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunns. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas nos gráficos. As identificações A e B correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

Seções do fígado de camundongos de todos os grupos experimentais foram coletadas 50 dias após a infecção, para avaliar os efeitos de diferentes dietas restritivas na formação do granuloma. Conforme se pode observar nas **figuras 13A e B**, camundongos HPT 3% apresentaram redução significativa na área do granuloma hepático, em relação ao CTL, em ambos os experimentos realizados. Todavia, no experimento 1 (**figura 13A**), as dietas hipoproteica 8% e hipolipídicas 2,5% e 5% também impactaram na área do granuloma, sendo que esse resultado não foi observado no segundo experimento realizado (**figura 13 B**). Nas **figuras 13C e D** encontram-se demonstrados granulomas hepáticos representativos dos grupos experimentais estudados.

## Resultados



D



**Figura 13 - Área do granuloma hepático de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente) e Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). No 39° (experimento 1) e 51° dia (experimento 2) do início das dietas, os animais foram infectados com 100 cercárias e 50 dias após, foram perfundidos. Cortes histológicos do fígado foram obtidos (A, B) para avaliação da área dos granulomas ( $\mu\text{m}^2$ ), a qual foi realizada a partir de imagens de granulomas que se encontravam no estágio exsudativo-productivo. C e D correspondem a imagens representativas de cortes histológicos hepáticos para os dois experimentos realizados. As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão da área do granuloma dos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunns. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas nos gráficos. As identificações A e C; B e D correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

### 5.3 Avaliação da produção de citocinas

Para avaliação da resposta imune celular dos animais dos grupos CTL, HPT 3%, HPT 8%, HPL 2,5% e HPL 5%, níveis de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 foram determinados em soro de camundongos nos tempos  $T_0$ ,  $A_I$  e  $A_P$  (figura 14A e B).

Não foram observadas diferenças nos níveis de citocinas séricas entre o  $T_0$  (início das dietas restritivas) e o tempo  $A_I$  (momento no qual a diferença em média de peso o grupo controle e HPT 3% foi de, aproximadamente, 20%). Portanto, serão consideradas no texto as diferenças encontradas entre os animais antes da infecção e antes da perfusão. Após a infecção pelo *S. mansoni*, observou-se um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no grupo controle,

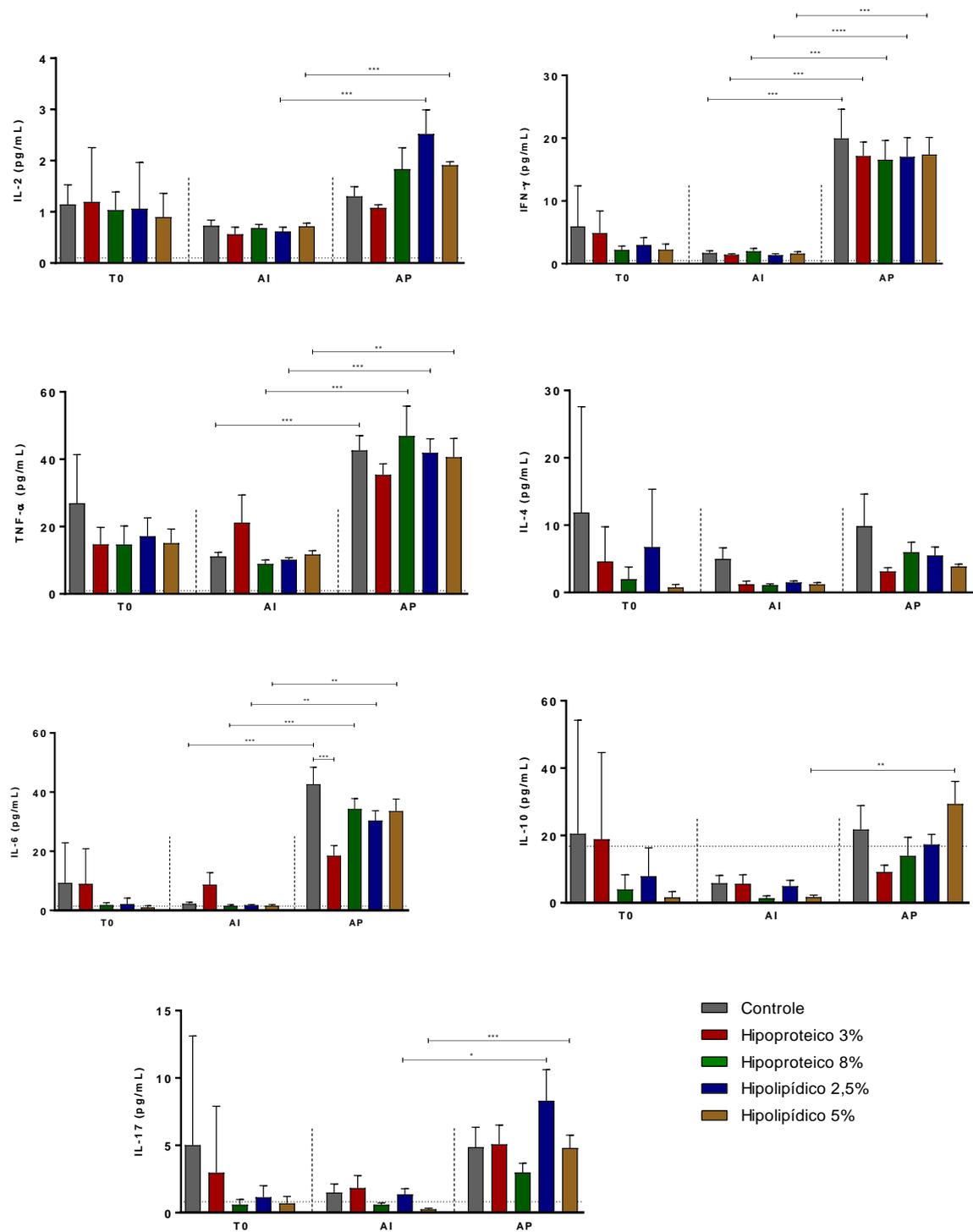
## *Resultados*

mesmo padrão observado no grupo HPT 8%. Em animais alimentados com dieta hipoproteica 3%, antes da perfusão, detectou-se um aumento nos níveis de IFN- $\gamma$ , mas não de TNF- $\alpha$  (**figura 14A e B**). Além disso, observou-se, no experimento 1, que animais alimentados com dieta hipoproteica 3% não apresentaram aumento na produção de IL-6, antes da perfusão, sendo que as concentrações dessa citocina foram significativamente menores, com relação ao grupo controle (**figura 14A**). Contudo, esse resultado não se reproduziu no experimento 2 (**figura 14B**).

No grupo alimentado com a dieta restritiva em lipídios (HPL 2,5% e 5%) observou-se, após a infecção, aumento nos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 (**figura 14A e B**). Além disso, a dieta hipolipídica 2,5% (HPL 2,5%) aumentou a produção de IL-2 e IL-17 e a hipolipídica 5% (HPL 5%) aumentou IL-10 (**figura 14A e B**). No entanto, algumas divergências foram encontradas nos níveis de algumas citocinas nos grupos alimentados com essas dietas. No experimento 1, a dieta HPL 5% levou a um aumento nas concentrações de IL-2 e IL-17 (**figura 14A**); o que não foi observado no segundo experimento. Além disso, no experimento 2, o grupo HPL 2,5% apresentou um aumento nos níveis de IL-4, divergindo do resultado encontrado no primeiro experimento realizado (**figura 14B**).

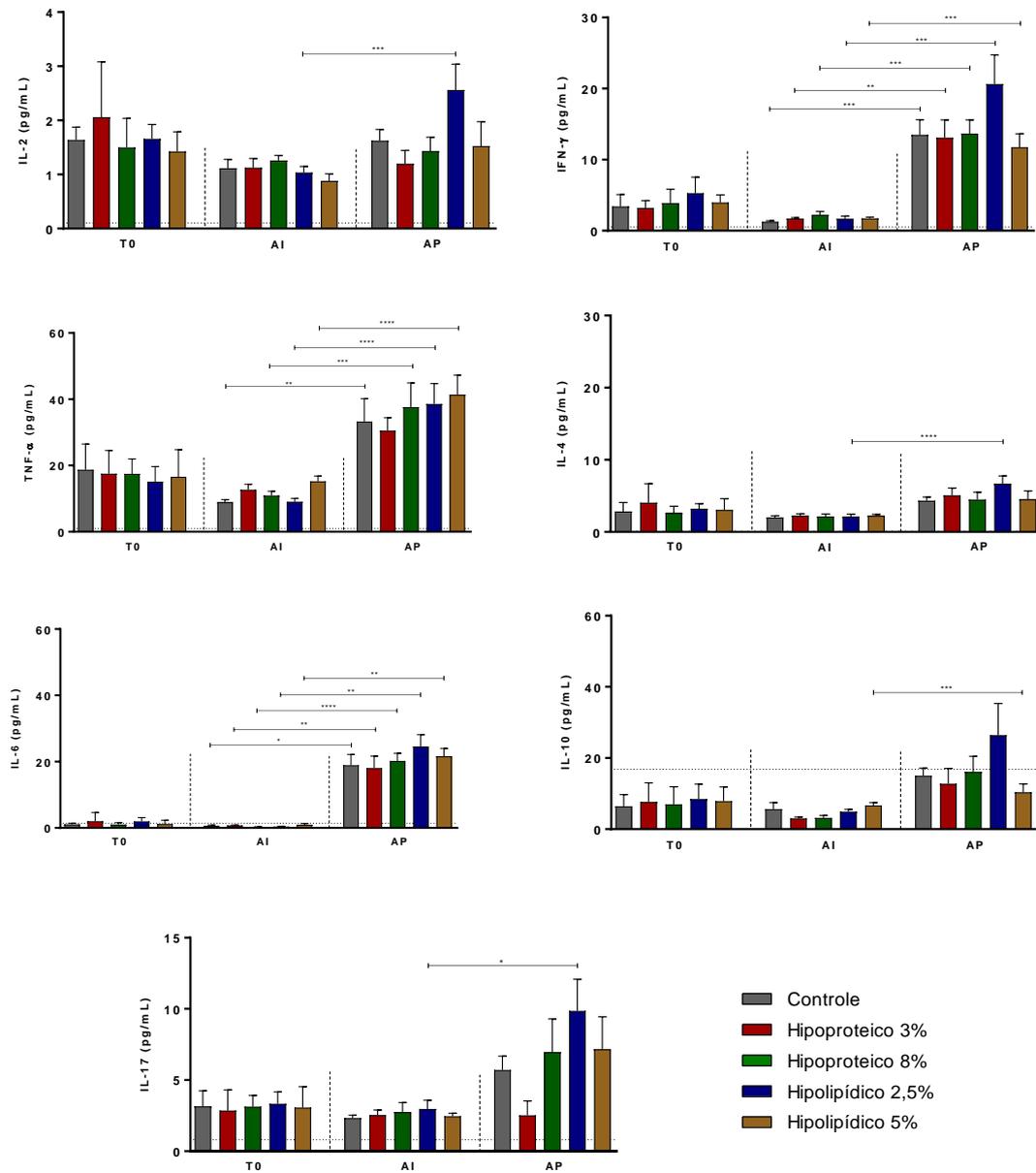
## Resultados

## A1



## Resultados

## A2



**Figura 14 - Avaliação do perfil de resposta celular de camundongos alimentados com diferentes dietas experimentais.** Camundongos receberam diferentes dietas restritivas, durante todo o período experimental: Controle (CTL), Hipoproteica 3% e 8% (HPT 3% e 8%, respectivamente), Hipolipídica 2,5% e 5% (HPL 2,5% e 5%, respectivamente). Amostras de sangue foram coletadas nos tempos zero (T<sub>0</sub>), antes da infecção (A<sub>I</sub>) e antes da perfusão (A<sub>P</sub>) e o soro foi obtido para avaliação da produção das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 através da técnica de CBA (A, B). As barras representam a média  $\pm$  o desvio padrão da produção de citocinas nos diferentes grupos. A análise estatística foi realizada através do teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) estão apontadas nos gráficos. As linhas tracejadas na horizontal correspondem ao limite de detecção das citocinas do kit utilizado. As identificações A e B correspondem, respectivamente, aos experimentos 1 e 2 realizados independentemente.

## **6 DISCUSSÃO**

A desnutrição, em seus diversos graus, permanece como um grave problema de saúde pública que prevalece em países em desenvolvimento, ainda que não esteja restrita somente a essas regiões. Apesar da mudança no cenário epidemiológico com o aumento na prevalência de obesidade e tendência na redução das taxas de desnutrição no mundo, dados da OMS mostram que desnutrição e obesidade coexistem em muitos países e que atualmente vivenciamos duas situações de insegurança alimentar. Globalmente a desnutrição crônica afeta 151 milhões de crianças (22,2%), ao passo que 38 milhões se encontram com excesso de peso (6%). Além disso, 815 milhões de pessoas apresentam desnutrição crônica (11% da população mundial) e 650 milhões de adultos encontram-se obesos (13% da população adulta mundial) (FAO; WHO, 2018; WHO, 2018c). Esses dados são preocupantes e colocam em risco um dos Objetivos do Desenvolvimento do Milênio a serem cumpridos até 2030: acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável.

A desnutrição é causada pelo consumo de dietas quanti ou qualitativamente inadequadas em consequência à falta de acesso aos alimentos e de distúrbios alimentares, bem como por doenças que modificam a biodisponibilidade de nutrientes e/ou que aumentam a necessidade de aporte dos mesmos para a manutenção da homeostase do organismo (CHANDRA, 1991; WATERLOW et al., 1996).

A combinação de vários graus de privação proteica juntamente com diversos graus de deficiência calórica total constitui a base das alterações metabólicas que acometem o organismo na DPE (WATERLOW et al., 1996). Caso o suprimento de nutrientes seja persistentemente inferior às necessidades do indivíduo, o organismo perde a sua capacidade adaptativa, o que pode levar à falência de tecidos e órgãos (STINNETT, 1983). Assim, as consequências da DPE dependem da sua causa, intensidade e duração (DE ANGELIS, 1986).

Nas últimas décadas diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de compreender a relação entre infecção/desnutrição e, embora muitos conhecimentos tenham sido obtidos, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos. A literatura é um pouco controversa, com relação à resposta inflamatória em situações de desnutrição. Isso pode ser devido aos diferentes modelos experimentais, uma vez que os animais possuem diversas características distintas, como: diferença entre as espécies, isogenicidade, sexo, idade, tipos e formas de desnutrição e ainda diferentes estímulos infecciosos.

## Discussão

Assim, estudos que avaliem a interação entre desnutrição e doenças infecto-parasitárias merecem atenção, uma vez que normalmente, ambas as condições coexistem (CARLOMAGNO et al., 1996; MALAFAIA et al., 2009; SERAFIM et al., 2010; COUTINHO, 2010; BARROS et al., 2014; LOSADA-BARRGÁN et al., 2017; FEVANG et al., 2018).

No presente trabalho estabelecemos um modelo murino para esse tipo de abordagem, através do fornecimento de diferentes dietas experimentais, com o intuito de avaliar o impacto da desnutrição na infecção experimental por *Schistosoma mansoni*. Para isso, conforme citado anteriormente, os animais foram divididos em cinco grupos: controle (AIN-93M, com 14% de proteína e 10% de lipídios); hipoproteico 3% e 8%, (AIN-93M modificada, com 3% e 8% de proteína, respectivamente) e hipolipídica 2,5% e 5% (AIN93M modificada, com 2,5% e 5% de lipídios, respectivamente). (REEVES et al., 1993).

Trabalhos que utilizaram dietas hipoproteicas com diferentes teores de proteínas na indução da desnutrição são amplamente descritos na literatura. Malafaia et al. (2009) induziram a DPE em camundongos BALB/c com o fornecimento de uma ração hipoproteica (3% de proteína) e deficiente em ferro e zinco (mistura de sais sem sulfato ferroso e sulfato de zinco). Na 6ª semana experimental foi observada uma redução de 35,6% na massa corpórea dos animais desnutridos quando comparados com o grupo controle. Anstead et al. (2001) avaliaram o efeito de diferentes dietas hipoproteicas (1%, 3% e 6% de proteína) no estabelecimento da desnutrição em camundongos BALB/c. Os respectivos ganho/perda de massa corporal foram de 37,5%, 22,1%, 5,59% e -26,8%, nos animais que receberam as dietas controle e hipoproteicas 6%, 3% e 1%, respectivamente. Além disso, somente as dietas com teores proteicos de 1% e 3% foram suficientes para promover diferença de peso significativa, em comparação ao grupo controle. Esses achados corroboram com os resultados obtidos em nosso estudo, no qual observamos que animais do grupo HPT 3% apresentaram redução significativa da massa corpórea, quando comparados ao CTL.

É importante destacar que a porcentagem de perda ponderal apresentada pelos animais do grupo HPT 3%, ao final do período experimental, foi maior no segundo experimento (19%), em relação ao primeiro experimento realizado (14%). Essa diferença pode ser justificada pelo fato de que a duração do segundo ensaio (97 dias) foi superior ao primeiro (81 dias), ou seja, camundongos do 2º experimento ficaram expostos por mais tempo à dieta hipoproteica 3%, favorecendo portanto, uma maior perda de massa corporal.

## *Discussão*

Vários outros trabalhos descritos na literatura utilizaram a dieta básica regional (DBR), na indução da DEP. Essa dieta foi desenvolvida com base na realização de inquéritos de consumo alimentar em populações humanas residentes em áreas endêmicas para esquistossomose mansônica em Pernambuco e outros estados do Nordeste brasileiro, sendo composta de quatro tipos fundamentais de alimentos (feijão mulatinho, farinha de mandioca, batata doce roxa, carne seca). A DBR corresponde a uma dieta multideficiente em micronutrientes, proteínas (contém cerca de 8% de proteínas dos quais a maior proporção é de origem vegetal) e 1% de lipídios. Camundongos C57BL/6 ao serem alimentados com essa dieta, são capazes de desenvolver desnutrição proteico-energética do tipo marasmático (COUTINHO; FREITAS; ABATH et al., 1992; COUTINHO et al., 1997b, 2007; OLIVEIRA et al., 2004; BARROS et al., 2014).

Ao longo do período experimental, o consumo de ração pelos animais do grupo HPT 3% foi significativamente menor em relação àqueles que receberam ração normoproteica (grupo controle). Conseqüentemente, animais desnutridos ingeriram menos calorias que seus respectivos controles. Dado que o teor proteico da ração hipoproteica 3% (3% proteína) é menor que o da ração normoproteica (14% de proteína), camundongos do grupo HPT 3% consumiram uma quantidade diária de proteínas significativamente menor em relação ao grupo CTL.

Trabalhos descritos na literatura são conflitantes com relação a dietas hipoproteicas e ao consumo de ração. Alguns estudos relataram aumento de consumo (COLOMBO et al., 1992; WHITE; DEAN; MARTIN, 1998; NAKAJIMA et al., 2014), enquanto outros demonstraram que os animais tiveram comportamento anorético (MERCER et al., 1994; BORELLI et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2014.).

A redução no consumo de ração em animais alimentados com dietas deficientes em proteínas pode explicar, em parte, a intensa perda de massa corpórea dos mesmos. Além disso, com a ingestão de uma dieta balanceada, o organismo encontra-se em balanço nitrogenado (equilíbrio nitrogenado) (VITURI et al., 2008). No entanto, a desnutrição pode desequilibrar esse balanço, tornando-o negativo, levando à perda de peso frequentemente observada em indivíduos desnutridos (MERCER et al., 1994; WESTERTER-PLANTENGA et al., 2009). Em situações de restrição proteica, ocorre depleção da musculatura esquelética e liberação de aminoácidos provenientes do catabolismo muscular (MALAFAIA et al., 2009). Esses aminoácidos liberados são direcionados para o fígado para a realização da gliconeogênese e/ou podem ser usados na síntese proteica (CARPENTIER et al., 1982). É importante ressaltar que a redução do consumo de dieta leva a um quadro de deficiência calórica e de micronutrientes,

## Discussão

embora a ração hipoproteica utilizada neste estudo seja isocalórica e apresente concentrações adequadas de todos os micronutrientes, exceto ferro e zinco, quando comparada com a dieta controle. Além disso, quadros de deficiência nutricional podem induzir a degradação de tecido adiposo para manutenção do metabolismo energético (GROVER, 2009). Portanto, todos esses fatores contribuem para a perda de peso.

Até recentemente, não havia concordância na literatura com relação ao conjunto de alterações clínicas que possibilitaria um diagnóstico assertivo de desnutrição (SOETERS et al., 2008; MEIJERS et al., 2010). Em 2012, a *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* (ASPEN) publicou um consenso (WHITE et al., 2012) no qual foi determinado que, para o diagnóstico de desnutrição, pelo menos dois dos seis sintomas clínicos devem ser observados: consumo insuficiente de nutrientes, perda involuntária de peso, perda de massa muscular, perda de gordura subcutânea, edema e caquexia. Nesse contexto, animais do grupo HPT 3% apresentaram perda de massa corpórea significativa e redução no consumo ração (calorias) e de proteínas. Essas alterações são suficientes para classificar a desnutrição induzida no nosso modelo experimental como DPE, de acordo com a ASPEN.

A contrário da ração hipoproteica 3%, a dieta com 8% de proteína (HPT 8%) não foi capaz de reduzir a massa corporal dos animais. No entanto, apesar dessa ração não ter sido adequada no estabelecimento da desnutrição, estudos que utilizaram rações com teor proteico semelhante, conseguiram estabelecer esse quadro. Em estudos experimentais de Coutinho et al. (1997a, 2003, 2007), Barros (2008) e Couto et al. (2007), dentre outros, a DEP foi induzida pela administração da DBR. Como citado anteriormente, essa dieta é multideficiente em calorias, micronutrientes, proteínas e lipídios. Os resultados desses trabalhos mostram que camundongos alimentados com a DBR apresentam cerca de 30% de perda ponderal, com relação ao grupo controle (dieta normoproteica).

Como esperado, animais que foram alimentados com as dietas hipolipídicas 2,5% e 5% (HPL 2,5% e HPL 5%, respectivamente) não apresentaram perda de massa corpórea, em relação a animais do grupo controle. Apesar dessas dietas apresentarem uma menor quantidade de lipídios, elas possuem valor energético muito próximo ao da ração controle, uma vez que o óleo de soja removido foi substituído por amido de milho. Optamos em utilizar dietas hipolipídicas em nosso estudo, com o objetivo de avaliar o efeito da restrição de lipídios na infecção por *S. mansoni*. Os resultados que responderam a essa pergunta serão discutidos juntamente com os dados de avaliação parasitológica.

## Discussão

Em nosso estudo, encontramos uma redução significativa nas concentrações séricas de proteínas totais entre os grupos controle e hipoproteico 3%, após a infecção por *S. mansoni*. A interação entre dieta e infecção culminaram na diminuição desse parâmetro. Vários estudos disponíveis na literatura demonstram que baixas concentrações séricas de proteínas totais são uma característica comumente observada em seres humanos desnutridos (WATERLOW; ALLEYNE, 1974; MISHRA; BASTOLA; JHA, 2009; ADEGBUSI; SULE ET al., 2011; SAH et al., 2017) e em modelos animais de DPE (BORELLI et al., 2007; KOMATSU et al., 2007; FOCK et al., 2007, 2008; MALAFAIA et al., 2009; CUNHA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS, et al., 2016; RHO et al., 2017).

Sabe-se que a avaliação das proteínas plasmáticas pode contribuir com informações importantes a respeito do estado geral de um paciente, com relação ao seu estado nutricional e à gravidade de doenças condicionantes de um estado clínico crítico à sua saúde (HENRY, 1996; CHAVES, 1985). O uso de proteínas séricas como instrumento para avaliação do estado nutricional é considerado um importante e confiável medidor, haja vista que a síntese de proteínas hepáticas depende de aminoácidos disponíveis e o indivíduo com desnutrição terá essa deficiência em seu organismo (FONTOURA et al., 2006).

As proteínas possuem importantes funções, como crescimento e manutenção de tecidos, hormonal (já que muitos hormônios possuem constituição proteica), transporte de substâncias, proteção imunológica, além de participarem como catalisadores de reações orgânicas e de servirem como substratos para obtenção de energia (CHAVES, 1985; BERTHOLF, 2014).

Com relação à redução significativa nos níveis séricos de albumina dos animais do hipoproteico 3%, os resultados do presente trabalho corroboram com estudos descritos na literatura. Durante a década de 1950, foi reconhecido que a presença de edema na desnutrição do tipo Kwashiorkor estava correlacionada com uma baixa concentração de albumina no plasma, presumivelmente relacionada à falta de proteínas na dieta (GITLIN et al., 1958). Desde então, inúmeros trabalhos utilizam a avaliação dos níveis séricos desse parâmetro como um marcador de desnutrição tanto em estudos com humanos (WHITEHEAD et al., 1973; HAY et al., 1975; BRASSEUER et al., 1994; COULTHARD, 2015), quanto em animais (SERAFIM et al., 2010; CUNHA et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2014; NAKAJIMA et al., 2014; SANTOS, et al., 2016).

Ostolin et al. (2014) observaram, dentre outros aspectos, que camundongos BALB/c com DPE (alimentados com dieta contendo 3% de proteína) apresentaram uma concentração sérica de albumina significativamente menor do que a verificada nos animais do grupo controle

## *Discussão*

(alimentados com dieta contendo 14% de proteína). Já Beltran et al., (2018) observaram que camundongos C57BL/6 alimentados com uma dieta hipoproteica (2% de proteína) apresentaram baixa concentração de albumina sérica em relação ao grupo alimentado com dieta controle. Em um outro estudo, Oliveira; Angelis (2001), encontraram uma redução em até 90% na concentração de albumina plasmática em ratos alimentados com dietas contendo baixo teor proteico (3% de proteína) ou com dieta apteica. Segundo os autores essa diminuição estaria diretamente relacionada a falhas nos mecanismos de controle homeostático que regulam a concentração de albumina intravascular, comum nos casos graves de DPE (LOWRY et al., 1951; KIRSCH et al., 1968).

A albumina é a proteína plasmática mais abundante, correspondendo a cerca de 50% das proteínas totais do soro humano e o parâmetro bioquímico mais frequentemente utilizado para avaliação nutricional (RAGUSO; DUPERTIUS; PICHARD et al., 2003; BERTHOLF, 2014; MAICÁ; SCHWEIGERT, 2008). Dentre as funções desempenhadas por esse marcador, destacam-se: a participação na manutenção do volume plasmático circulante (SANTOS et al., 2003), do equilíbrio ácido-básico (DOWEIKO; NOMPLEGGI, 1991) e envolvimento no transporte de uma ampla variedade de substâncias fisiológicas (SANTOS et al., 2003).

É importante ressaltar que os indicadores bioquímicos são auxiliares na avaliação do estado nutricional, fornecendo medidas objetivas das alterações do mesmo, tendo como vantagem, possibilitar seguimento ao longo do tempo e de intervenções nutricionais (MONTEJO GONZALEZ et al., 2006). A diminuição da concentração sérica das proteínas de prevalente síntese hepática pode ser um bom índice de DPE. É importante, porém, considerar que existem numerosos fatores, além dos nutricionais, que podem modificar a concentração das proteínas séricas (variações do estado de hidratação, hepatopatias, infecção ou inflamação), não se devendo utilizar o método isoladamente para estabelecer o diagnóstico nutricional (CUPPARI, 2005; KAMIMURA et al., 2006; BHARADWAJ et al., 2016).

Dessa forma, a concentração de algumas proteínas plasmáticas, dentre elas a albumina, pode ser afetada por condições inflamatórias, uma vez que se caracterizam como proteínas de fase aguda negativa (BHARADWAJ et al., 2016). Nesse contexto, durante o processo de resposta inflamatória, citocinas como IL-6 e TNF- $\alpha$  estimulam no fígado a síntese de algumas proteínas e, paralelamente, inibem a síntese de outras. Por isso, essas proteínas são denominadas, respectivamente, proteínas de fase aguda positivas e negativas da resposta inflamatória. Particularmente no fígado, a IL-6 inibe a síntese de albumina (BISTRAN, 1998; KOPF et al., 1994; MALAFARINA et al., 2012; CARBRERIZO et al., 2015). Em concordância

## Discussão

com as evidências disponíveis na literatura, em nosso estudo, após a infecção por *S. mansoni*, os níveis séricos de albumina reduziram em ambos os experimentos e de proteínas totais no segundo ensaio realizado. É importante destacar que embora a albumina seja uma proteína de fase aguda negativa, em nosso modelo experimental houve uma redução dos níveis séricos desse parâmetro nos animais do grupo HPT 3%, antes da infecção por *S. mansoni*, o que sugere que a desnutrição induz um quadro inflamatório que contribui para a ocorrência de hipoalbuminemia.

Apesar das crescentes evidências científicas de que os níveis de proteínas plasmáticas dependem de outros fatores, além da ingestão, essas proteínas continuam sendo usadas para avaliar o estado nutricional e diagnosticar a desnutrição (FUHRMAN; CHARNEY, 2004; CABRERIZO et al., 2015). Assim, embora os níveis de proteínas estejam alterados na presença de processos inflamatórios, considerando-se em conjunto a significativa perda de 19% de massa corporal, a redução do consumo de calorias e de proteína e dos níveis de albumina e proteínas totais, tem-se bons indicadores da indução da DEP em nosso no modelo experimental. (BONANNI, 2011)

Em nosso modelo de DPE, após a infecção, houve redução dos níveis séricos de hemoglobina em animais que receberam a dieta hipoproteica 3%. A diminuição desse parâmetro é um achado muito comum em condições de desnutrição (NAKAJIMA et al., 2014; SANTOS et al., 2016). Malafaia et al. (2009) e Serafim et al. (2010) encontraram diminuição significativa na concentração sérica de hemoglobina em camundongos BALB/c infectados com *L. chagasi* e alimentados com dieta contendo 3% de proteína e deficiente em ferro e zinco.

Desnutrição e anemia permanecem como importantes problemas de saúde pública em países em desenvolvimento (MUNISI et al., 2016). Deste modo, a DPE é uma síndrome na qual a anemia pode estar presente. A literatura descreve que a ocorrência de anemia na desnutrição pode ser devido à deficiência de ferro e folato (MACDOUGALL et al., 1982; VILLALPANDO et al., 2003; GASCHE et al., 2004; MORETTI et al., 2004), à deficiência proteica, à diminuição nos níveis de eritropoietina (STENVINKEL, 2003; GIBSON, 2004), à hemólise devido a modificações nos mecanismos antioxidantes dos eritrócitos e a doenças infecto-parasitárias (BUITRON et al., 2004; STOLTZFUS et al., 2004).

Segundo Borelli et al. (2007), os tecidos hematopoiéticos, assim como todos aqueles com alto índice de renovação e *turnover*, apresentam alta demanda por nutrientes. A necessidade de proteína para a hematopoiese, particularmente para a eritropoiese, poderia por si só justificar a ocorrência de anemia frequentemente observada em casos de desnutrição

## Discussão

Inicialmente, a deficiência de ferro foi considerada como a principal causa de anemia na desnutrição (FINCH, 1975). No entanto, diversos trabalhos evidenciaram que a DPE provoca alterações hematológicas quantitativas como a anemia não ferropriva e com redução de reticulócitos (DE ANGELIS, 1986; ROBBINS et al., 2001; BORELLI et al., 2009), sendo que o quadro anêmico encontrado é decorrente da redução da produção de células e precursores eritroides, com baixa resposta à eritropoietina (BORELLI et al., 2007). Fundamentando estes achados, observou-se, em animais submetidos à DPE, alterações no ciclo celular de células tronco hematopoiéticas e de progenitores hematopoiéticos, de forma que essas células estão predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular (BORELLI et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2014).

A esquistossomose pode acarretar em diversas morbidades nos indivíduos infectados, como anemia, desnutrição, dificuldade de crescimento em crianças e prejuízo nas funções cognitivas (FRIEDMAN et al., 2005; EZEAMAMA et al., 2005). A anemia é um dos sintomas frequentemente associados à esquistossomose, tanto nos quadros de esquistossomose intestinal como nos quadros graves de hepatoesplenomegalia, sendo mais intensa em portadores de infecções mais graves (KING; DANGERFIELD-CHA, 2008). Desse modo, vários trabalhos demonstraram que infecções graves por *S. mansoni* e desnutrição estavam significativamente associadas com a anemia (KOUKOUNARI et al., 2006, 2008; KABATEREINE et al., 2007; BUTLER et al., 2012). Em concordância com a literatura, em nosso estudo, a infecção por *S. mansoni* impactou significativamente nos níveis séricos de hemoglobina, visto que camundongos de todos os grupos experimentais apresentaram redução na concentração desse parâmetro, após serem infectados. Durante muitos anos vem sendo discutido os possíveis mecanismos responsáveis pela anemia reportada em hospedeiros infectados por parasitos do gênero *Schistosoma*, dentre eles, tem-se: deficiência de ferro por perda de sangue extracorpórea, por exemplo, eliminação de sangue gastrointestinal e nas fezes, pelo sequestro esplênico, hemólise auto-imune e a anemia desenvolvida pela inflamação (FRIEDMAN et al., 2005).

Com o objetivo de avaliar o impacto da desnutrição na infecção por *S. mansoni*, camundongos de todos os grupos experimentais foram infectados e cinquenta dias após, foi realizada a perfusão hepato-mesentérica dos animais, para avaliação da carga parasitária e do número de ovos retidos no fígado e intestino. Não há consenso na literatura a respeito do número de vermes recuperados em animais desnutridos. Em conformidade com nosso trabalho, Simões et al. (2002) não encontraram diferença significativa no número de vermes recuperados em

## Discussão

animais desnutridos. No entanto, Barros et al. (2014) e Coutinho et al. (2007) demonstraram que a desnutrição impactou nesse parâmetro.

São poucas as publicações que avaliaram o efeito da desnutrição no número de ovos de *S. mansoni* retidos no intestino e fígado. Em nosso estudo, a DPE levou à redução do número de ovos presos no intestino, porém no fígado não foi encontrado diferença significativa entre os grupos. Em um trabalho realizado por Barros et al. (2014), camundongos C57BL/6 foram alimentados com a DBR, para o estabelecimento da desnutrição. Trinta dias após o início da administração das dietas, os animais foram infectados e após 60 e 150 dias da infecção (fase aguda e crônica, respectivamente), foram perfundidos para avaliação parasitológica. Em ambas as fases da doença, camundongos desnutridos apresentaram diminuição significativa no número de ovos retidos nesses órgãos. Coutinho et al. (1997b), utilizando camundongos swiss, os quais foram infectados após receberem dieta hipoproteica (DBR) por 30 dias e perfundidos após 24 semanas (fase crônica), demonstraram também que a DPE levou a uma redução no número de ovos de *S. mansoni* retidos no fígado.

Nesse aspecto, é interessante notar que neste trabalho, a dieta hipoproteica 3% interferiu na fecundidade do *S. mansoni*, visto que em animais que receberam essa dieta houve uma redução na postura de ovos pela fêmea, com uma significativa diminuição no acúmulo de ovos no intestino. Neves et al. (2002) e Oliveira et al. (2003) ao realizarem avaliações morfométricas em vermes machos e fêmeas adultos, recuperados de camundongos com DPE, os quais foram alimentados com a DBR (8% de proteína), encontraram diversas alterações somáticas nos parasitos, como redução no comprimento e largura do corpo; na distância entre as ventosas oral e ventral e áreas correspondentes às mesmas; na área ocupada pelas massas testiculares; menor frequência do achado de ovos na cavidade uterina; redução do comprimento e da área ocupada pelo ovário; redução da distância entre o poro genital e o término das glândulas vitelinas. Segundo Coutinho (2008), as alterações que comprometem o sistema reprodutor justificam os distúrbios de maturação e a menor capacidade de produção de ovos por vermes retirados de hospedeiros experimentais desnutridos. Além disso, essas alterações são, provavelmente, decorrentes da menor disponibilidade de nutrientes essenciais necessários para um adequado crescimento e desenvolvimento do parasito no interior dos vasos sanguíneos, ocasionada pela carência nutricional do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2003).

A avaliação histopatológica em nosso estudo demonstrou que camundongos HPT 3% apresentaram redução significativa na área do granuloma hepático. Esse achado corrobora com outros estudos, os quais demonstraram que camundongos infectados por *S. mansoni* e

## Discussão

alimentados com dieta hipoproteica desenvolvem granulomas periovulares menores, inflamação portal menos intensa, menor produção de tecido fibroso e incapacidade de desenvolver a fibrose periportal semelhante à humana (KANAUFT; WARREN, 1969; MAGALHÃES et al., 1986; COUTINHO et al., 1997b, 2003, 2007).

Estudos anteriores sobre o desenvolvimento da fibrose hepática em camundongos demonstraram a importância de mecanismos imunológicos, enfatizando o papel da resposta Th2, incluindo a produção de IL-4, IL-10 e IL-13, como citocinas-chave para a fibrogênese (FALLON et al., 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004). Embora em nossos resultados não tenhamos encontrado alteração na secreção de citocinas em animais do grupo HPT 3%, outros estudos demonstram que camundongos desnutridos e infectados por *S. mansoni* produzem baixos níveis de IL-4 (fase aguda da doença) (RAMOS, 2007) e IL-13 (fase crônica da doença) (SILVA, 2008; COUTINHO, 2010) em sobrenadante de cultura de esplenócitos. No entanto, ao contrário desses estudos, em nosso trabalho, realizamos a dosagem de citocinas séricas, utilizando um kit CBA Th1/Th2/Th17 que não determina os níveis de IL-13. Com o prosseguimento deste trabalho, iremos também avaliar a produção de citocinas em sobrenadante de cultura de esplenócitos sob estimulação, incluindo também a IL-13 entre as citocinas a serem avaliadas.

Barros et al. (2014) avaliaram alguns dos possíveis mecanismos envolvidos na redução do tecido fibroso e do granuloma hepático em camundongos desnutridos e infectados por *S. mansoni*. A desnutrição levou à redução da oviposição, ao aumento do número de ovos inviáveis e a um efeito depressor sobre a capacidade reprodutiva, com desproporção entre os estágios de maturação dos ovos excretados nas fezes. Além disso, uma menor deposição de colágeno do tipo I nos granulomas periovulares e uma redução dos níveis do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) foram observados nesses animais. Segundo os autores, os resultados obtidos sugerem que a redução da postura e o prejuízo da maturação dos ovos de *S. mansoni*, levam à diminuição da liberação de imunógenos, afetando a expressão de citocinas fibrogênicas, como o TGF- $\beta$ 1. Dessa forma, a deficiência proteica dietética, juntamente com o baixo estímulo imunogênico gerado, podem ser responsáveis pela redução na produção de colágeno e do volume dos granulomas hepáticos.

É importante ressaltar que no fígado, o TGF- $\beta$  é um mediador pró-fibrogênico muito potente das respostas celulares que levam ao reparo tecidual, produção de matriz extracelular, regulação do crescimento e apoptose. Durante a fibrogênese, os níveis teciduais e sanguíneos de TGF- $\beta$  estão elevados e a superexpressão de TGF- $\beta$ 1 em camundongos transgênicos induz

## Discussão

a fibrose (GRESSNER et al., 2002). Devido aos estímulos fibrogênicos (HANG et al., 1974; WALICK et al. 2012), células inflamatórias e macrófagos são ativados e secretam citocinas fibrogênicas, como TGF- $\beta$ 1, IL-13, bem como estimulam a ativação de células estreladas hepáticas (GEERTS, 2001, GRESSNER et al., 2002). Vários estudos *in vivo* demonstram que a expressão aumentada de TGF- $\beta$ 1 em soro e tecido hepático está correlacionado com fibrogênese (KANZLER et al., 2001; EL-BASSIOUNI et al., 2012; PIAO et al., 2012). Contudo, a literatura é controversa a respeito da relação entre TGF- $\beta$ 1 e desenvolvimento de fibrose. Alves-Oliveira et al. (2006), ao estudar grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose, descobriram que altos níveis de TGF- $\beta$  parecem estar associados à proteção contra fibrose, porém a força dessa associação foi baixa. De Jesus et al. (2004) não encontraram diferenças nos níveis de TGF- $\beta$  em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimulados com SEA, entre grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose hepática. No entanto, Fernandes et al. (2014) encontram um aumento da produção de TGF- $\beta$  em grupo de indivíduos com fibrose moderada a grave em comparação com indivíduos sem fibrose. De acordo com esses autores, possivelmente, a expressão de TGF- $\beta$  por monócitos humanos está associada à fibrose, enquanto a produção dessa citocina por linfócitos não é essencial. Outras publicações indicam que o TGF- $\beta$  é uma citocina produzida principalmente por células T reguladoras, fornecendo um mecanismo efetivo de controle da progressão da fibrose (KITANI et al., 2003; HESSE et al., 2004).

Nossos resultados mostraram que as dietas hipolipídicas (2,5% e 5%) não impactaram na sobrevivência do parasito e nas demais avaliações parasitológicas realizadas. Optamos em utilizá-las em nossos experimentos, com o intuito de avaliar se a restrição de lipídios na dieta poderia impactar na sobrevivência do parasito, uma vez que embora rico em membranas, o *S. mansoni* é incapaz de sintetizar ácidos graxos de cadeia longa ou colesterol ‘de novo’ (MEYER; 1970) podendo, no entanto, alongar ácidos graxos incorporados. Consequentemente, essas moléculas devem ser obtidas do hospedeiro.

Existem poucos trabalhos que avaliaram o efeito de dietas hipolipídicas na infecção experimental por *S. mansoni*. Além disso, esses trabalhos não avaliaram o efeito de uma dieta somente restrita em lipídios na infecção por *S. mansoni*. Coutinho et al. (1997b, 2003, 2007, 2008) ao estudarem os efeitos da desnutrição na infecção por esse parasito, utilizaram a DBR, a qual é multideficiente em macro e micronutrientes, incluindo lipídios (1%). Animais desnutridos e infectados apresentaram redução do número de vermes recuperados, da carga

## Discussão

parasitária e da área do granuloma hepático. Alterações morfométricas em vermes machos e fêmeas adultos também foram encontradas.

Santos et al. (1992) investigaram o efeito de uma dieta deficiente em ácidos graxos essenciais (rações sem óleo de soja) na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Os animais que receberam a ração com deficiência em ácidos graxos essenciais apresentaram diminuição na parasitemia e maior taxa de sobrevivência.

Uma possível explicação para que a restrição lipídica na dieta, em nosso trabalho, não tenha afetado a infecção por *S. mansoni* é que apesar de não haver síntese de ácidos graxos, a incorporação de lipídios pelos parasitos é intensa. Ensaios *in vitro* demonstraram que várias classes de lipídios são incorporadas com maior ou menor eficiência pelos vermes adultos, além de ocorrer a interconversão de lipídios, de uma classe para outra. Por exemplo, os fosfolipídios incorporados por *S. mansoni* sofrem, inicialmente, a ação de lipases e fosfolipases, e os ácidos graxos livres são, então, incorporados nos triglicerídeos e nos fosfolipídios dos parasitos (RUMJANEK; SIMPSON, 1980).

Além disso, a ausência de síntese ‘de novo’ de ácidos graxos e de colesterol por *S. mansoni* indica que existam mecanismos eficientes de captura de lipídios do hospedeiro. Acredita-se que esses mecanismos tenham início imediatamente após a entrada dos esquistossômulos na corrente sanguínea (RUMJANEK, MCLAREN; SMITHERS, 1983) e parecem lançar mão da associação íntima entre as lipoproteínas do hospedeiro e os vermes adultos. Devido à rápida expressão de uma proteína de superfície nos esquistossômulos, em resposta à incubação com soro humano, inferiu-se que os parasitos, na presença de sinal químico ainda desconhecido, expõem receptores de LDL (*Low Density Lipoproteins*) na superfície do tegumento. A ocorrência de receptores de LDL em *S. mansoni* foi confirmada com outros estudos (RUMJANEK, CAMPOS; CROCCO-AFONSO, 1988; XU; CAULFIELD, 1992).

Em relação à resposta imune, podemos observar que após a infecção por *S. mansoni* houve um aumento da secreção de citocinas com perfil inflamatório (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo HPT 3%, o qual não apresentou aumento na produção de TNF- $\alpha$ , com relação ao CTL. De fato, em murinos, nos estágios iniciais da infecção, ocorre uma resposta imunológica predominante Th1, contra a migração dos esquistossômulos e das formas imaturas adultas. Essa resposta é caracterizada pelo aumento da expressão das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-12 (BURKE et al., 2009; CHUAH et al., 2014).

## Discussão

Além disso, é possível perceber em nossos resultados que após cinquenta dias de infecção, ainda não houve um aumento dos níveis de citocinas do tipo Th2. Do ponto de vista imunológico, oito semanas após a infecção com *Schistosoma mansoni*, a produção de citocinas do perfil Th2 é predominante se comparada à produção de citocinas do perfil Th1 (STAVITSKY, 2004; BURKE et al., 2009; CHUAH et al., 2014). Essa resposta é caracterizada pelo aumento de IL-4, IL-5 e IL-13. Em murinos, essas citocinas têm importante função na formação do granuloma, na presença de eosinófilos e no desenvolvimento da fibrose (DE JESUS et al., 2004).

Em nosso trabalho, animais alimentados com a dieta hipoproteica 3% não apresentaram aumento de TNF- $\alpha$ , após a infecção. São escassas, na literatura, referências sobre o perfil imunológico de camundongos desnutridos infectados, considerando que o estado nutricional do hospedeiro é tido como um dos prováveis fatores coadjuvantes no agravamento dessa infecção parasitária.

As principais metodologias empregadas avaliam o perfil de resposta celular em diferentes momentos após a infecção: início (até 60 dias), período intermediário (até 90 dias), e tardio (após 150 dias), em sobrenadante de cultura de esplenócitos. Silva (2008) avaliaram a resposta imune celular em camundongos desnutridos, infectados por *S. mansoni*. Apesar do padrão de resposta imunológica após a infecção ser semelhante em camundongos controle e desnutrido, tendo uma fase inicial com predominância de resposta Th1, uma fase intermediária com aumento de resposta Th2 e uma fase tardia com uma regulação dessas citocinas, em animais desnutridos os níveis de IFN- $\gamma$  na fase inicial e de IL-4 na fase intermediária foram significativamente maiores, com relação ao grupo controle. Além disso, na fase tardia os níveis de IL-13 nos camundongos desnutridos encontraram-se significativamente menores, quando comparados a animais controle. Segundo os autores, pode-se especular que essa cinética dificulte a atuação das citocinas fibrogênicas, sendo uma das razões pelas quais camundongos desnutridos não desenvolvem fibrose periportal murina.

Pretendemos prosseguir com este trabalho no qual avaliaremos o impacto da desnutrição proteico-energética no desenvolvimento da resposta imune protetora induzida pela imunização com o antígeno Sm14 do *Schistosoma mansoni*. E, a partir destes experimentos, objetivamos contribuir para o melhor entendimento dos fatores que afetam a resistência do hospedeiro à infecção e demonstrar a importância do emprego racional de abordagens necessárias para que a vacina alcance eficácia e impacto desejados, como o fornecimento adequado de nutrientes.

## 7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que conseguimos padronizar um modelo de DPE em camundongos C57BL/6, através do fornecimento da dieta hipoproteica 3%, os quais apresentaram alterações características desse quadro de carência nutricional, como diminuição significativa da massa corporal, dos níveis séricos de albumina e do consumo energético e de proteínas. Em nosso modelo de desnutrição, não se detectou aumento nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ . Além disso, a DPE impactou na infecção experimental por *S. mansoni*, uma vez que houve redução do número de ovos retidos no intestino, da área dos granulomas hepáticos e na fecundidade das fêmeas do parasito. Ademais, a restrição de lipídios na dieta não afetou a infecção por *S. mansoni*, porém levou ao aumento da produção de algumas citocinas avaliadas.

Portanto, com base no exposto, estabelecemos um modelo de desnutrição proteico-energética com a utilização da dieta hipoproteica 3%, a qual será utilizada em um próximo passo para avaliar o impacto da desnutrição no desenvolvimento da resposta imune protetora induzida pela vacinação com o antígeno Sm14 do *Schistosoma mansoni*.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABREU, M. A.; WECKX, L. L.; HIRATA, C. H. Histological and ultrastructural aspects of the tongue in undernourished rats. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 72, n. 4, p. 523-7, 2006.
- ABUBAKAR, N. et al. An assessment of micronutrient deficiency: A comparative study of children with protein-energy malnutrition and apparently healthy controls in Kano, Northern Nigeria. **Trop J Med Res**, v. 20, n.1, p. 61-5, 2017.
- ADEGBUSI, H. S.; SULE, M. S. Anthropometric and biochemical assessment among under five children in Kusada local government area, Katsina State, Nigeria. **Bayero J Pure Appl Sc**, v. 4, n. 2, p. 137-140, 2011.
- AKNER, G.; CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 1, p. 6-24, 2001.
- ALVES, A. P. et al. Efeito da desnutrição proteica pré e pós-natal sobre a morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. **J Pediatr**, v. 84, n. 3, p. 264-271, 2008.
- ALVES-OLIVEIRA, L. F. et al. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1215-21, 2006.
- AMARAL, J. F. et al. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 12, p. 1581-6, 2006.
- AMORIM, F. M. S. Patomorfologia e Estudo Estereológico do Jejuno, na Primoinfecção Crônica de Camundongos Desnutridos, Infectados com *Schistosoma mansoni*, 2000. **Tese de Doutorado**, Recife: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 79-82, 2008.
- ANSTEAD, G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infect Immun**, v. 69, n. 8, p. 4709-18, 2001.
- ANTHONY, R. M. et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. **Nat Med**, v. 12, n. 8, p. 955-60, 2006.
- ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 12, p. 975-87, 2007.
- ARAUJO, M. I. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 6, p. 1399-403, 1996.

## Referências

- ATINMO, T. et al. Breaking the poverty/malnutrition cycle in Africa and the Middle East. **Nutr Rev**, v. 67, Suppl 1, p. S40-6, 2009.
- BAPAT, P. R. et al. Differential Levels of Alpha-2-Macroglobulin, Haptoglobin and Sero-Transferrin as Adjunct Markers for TB Diagnosis and Disease Progression in the Malnourished Tribal Population of Melghat, India. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. 1-17, 2015.
- BARBOSA, F. S.; PEREIRA DA COSTA, D. P. Incapacitating effects of schistosomiasis mansoni on the productivity of sugar-cane cutters in northeastern Brazil. **Am J Epidemiol**, v. 114, n. 1, p. 102-11, 1981.
- BARROS, A. F. et al. Low transformation growth factor-beta1 production and collagen synthesis correlate with the lack of hepatic periportal fibrosis development in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 210-9, 2014.
- BARROS, A. F. **Resposta imune humoral e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni***. 2008. 124p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.
- BEFIDI-MENGUE, R. N. et al. Impact of *Schistosoma haematobium* infection and of praziquantel treatment on anaemia of primary school children in Bertoua, Cameroon. **J Trop Med Hyg**, v. 96, n. 4, p. 225-30, 1993.
- BEISEL, W. R. Single nutrients and immunity. **Am J Clin Nutr**, v. 35, n. 2 Suppl, p. 417-68, 1982.
- BELCHIOR, A. et al. Post-Weaning Protein Malnutrition Increases Blood Pressure and Induces Endothelial Dysfunctions in Rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, e34876, 2012.
- BELTRAN, J. S. O. **A participação da autofagia na regulação da célula-tronco hemopoética em camundongos knockouts para *Atg7* e *transglutaminase***. 2018. 134p. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- BERTHOLF, R. L. Proteins and Albumin. **Lab Med**, v. 45, n.1, p. e25-e41, 2014.
- BHARADWAJ, S. et al. Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment. **Gastroenterol Rep**, v. 4, n. 4, p. 272-280, 2016.
- BHUTTA, Z. A. et al. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 6, p. 1516-22, 2000.
- BISTRIAN, B. R. et al. Cellular immunity in semistarved states in hospitalized adults. **Am J Clin Nutr**, v. 28, n. 10, p. 1148-55, 1975.
- BISTRIAN, B. R. Role of the systemic inflammatory response syndrome in the development of protein-calorie malnutrition in ESRD. **Am J Kidney Dis**, v. 32, n. 6, Suppl 4, p. S113-7, 1998.

## Referências

- BOGLIOLO, L. Schistosomiasis mansoni. Pathology. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 11:359-424, 1959.
- BONANNI, A. et al. Protein-energy wasting and mortality in chronic kidney disease. **Int J Environ Res Public Health**, v. 8, n. 5, p. 1631-54, 2011.
- BOOTH, M. et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. **J Immunol**, v. 172, n. 2, p. 1295-303, 2004.
- BORELLI, P. et al. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Ann Nutr Metab**, v. 42, n. 6, p. 367-73, 1998.
- BORELLI, P. et al. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 6, p. 523-30, 2009.
- BORELLI, P. et al. Haematological alterations in protein malnutrition. **Rev Bras Hematol Hemoter**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 49-53, 2004.
- BORELLI, P. et al. Reduction of erythroid progenitors in protein–energy malnutrition. **Br J Nutr**, v. 97, n. 2, p. 307-14, 2007.
- BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 2, n. 3, p. 250-69, 1989.
- BOS, N. A. et al. The influence of exogenous antigenic stimulation on the specificity repertoire of background immunoglobulin-secreting cells of different isotypes. **Cell Immunol**, v. 112, n. 2, p. 371-80, 1988.
- BOUSSO, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 9, p. 675-84, 2008.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2008-2009**. Despesas, rendimentos e condições de vida. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASSEUR, D. et al. Biological risk factors for fatal protein energy malnutrition in hospitalized children in Zaire. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 18, n. 2, p. 220-4, 1994.
- BRITO, C. F. et al. Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 3, p. 377-81, 2002.
- BRITO, M.V.H. Experimental malnutrition: A systematic review. **Integr Food Nutr Metab**, v. 33, n. 3, p. 305-8, 2016.

## Referências

- BROUWERS, J. F. et al. The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 88, n. 1-2, p. 175-85, 1997.
- BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutr Rev**, v. 58, n. 2, p. 1-4, 2000.
- BRUNETTO, M. A. et al. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Sci Vet**, v. 35, supl. 2, p. s203-s232, 2007.
- BUITRON, D.; HURTIG, A. K.; SAN SEBASTIAN, M. Nutritional status of Naporuna children under five in the Amazon region of Ecuador. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 3, p. 151-9, 2004.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 4, p. 163-76, 2009.
- BUTLER, S. E. et al. Mechanism of anemia in *Schistosoma mansoni*-infected school children in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 5, p. 862-7, 2012.
- CABRERIZO, S. et al. Serum albumin and health in older people: Review and meta analysis. **Maturitas**, v. 81, n. 1, p. 17-27, 2015.
- CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 109-17, 2008.
- CARLOMAGNO, M. G. et al. Role of protein deficiency on the course of *Trypanosoma cruzi* infection and on the degree of protection conferred by a flagellar fraction. **J Nutr Immunol**, v. 4, n. 4, p. 37-45, 1996.
- CARPENTIER, Y. A.; BARTHEL, J.; BRUYNS, J. Plasma protein concentration in nutritional assessment. **Proc Nutr Soc**, v. 41, n. 3, p. 405-17, 1982.
- CHANDRA, R. K. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. **Am J Clin Nutr**, v. 53, n. 5, p. 1087-101, 1991.
- CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 2, p. 460S-463S, 1997.
- CHANDRA, R. K. Nutritional regulation of immunity and risk of illness. **Indian J Pediatr**, v. 56, n. 5, p. 607-11, 1989.
- CHANDRA, R. K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. **J Nutr**, v. 122, n. 3 Suppl, p. 597-600, 1992.
- CHANDRA, R. K. Rosette-forming T lymphocytes and cell-mediated immunity in malnutrition. **Br Med J**, v. 3, n. 5931, p. 608-9, 1974
- CHANDRA, S.; CHANDRA, R. K. Nutrition, immune response, and outcome. **Prog Food Nutr Sci**, v. 10, n. 1-2, p. 1-65, 1986.

*Referências*

- CHAVES, N. **Nutrição básica e aplicada**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1985.
- CHEEVER, A. W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917-40, 2002.
- CHEEVER, A. W. et al. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, n. 3, p. 281-95, 1994.
- CHEEVER, A. W. Pathogenesis of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. 4, p. 337-340, 1992.
- CHEEVER, A. W.; ANDRADE, Z. A. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 61, n. 5, p. 626-39, 1967.
- CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 465-6, 2000.
- CHEVALIER, P. et al. Study of thymus and thymocytes in Bolivian preschool children during recovery from severe acute malnutrition. **J Nutr Immunol**, v. 3, p. 27-39, 1994.
- CHIEFFI, P. P. Interrelationship between schistosomiasis and concomitant diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, supl. 4, p. 291-6, 1992.
- CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends Parasitol**, v. 30, n. 3, p. 141-50, 2014.
- COHEN, S.; DANZAKI, K.; MACIVER, N. J. Nutritional effects on T-cell immunometabolism. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 2, p. 225-35, 2017.
- COLOMBO, J. P. et al. Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. **Ann Nutr Metab**, v. 36, n. 1, p. 23-33, 1992.
- CORTÉS-BARBERENA, E. et al. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clin Exp Immunol**, v. 152, n. 3, p. 585-92, 2008.
- COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, Suppl 1, p. 13-19, 2004.
- COUTINHO, E. M. et al. Factors involved in *Schistosoma mansoni* infection in rural areas of northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 707-15, 1997a.
- COUTINHO, E. M. et al. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 919-25, 2003.
- COUTINHO, E. M. et al. Manson's schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 359-66, 2010.

## Referências

- COUTINHO, E. M. et al. Pathogenesis of schistosomal 'pipestem' fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of 'pipestem' fibrosis in mice. **Int J Exp Pathol**, v. 78, n. 5, p. 337-42, 1997b.
- COUTINHO, E. M. et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Trop**, v. 101, n. 1, p. 15-24, 2007.
- COUTINHO, E. M. et al. Inquérito clínico- nutricional e antropométrico preliminar, em áreas endêmicas de esquistossomose mansônica, no nordeste do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 6, p. 211 - 236, 1972.
- COUTINHO, E. M. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, Suppl 1, p. 85, 2004.
- COUTINHO, E. M. Nutrição e saúde pública: nutrição x infecções. In: CHAVES, N. **Nutrição Básica e Aplicada**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1985.
- COUTINHO, E. M. Patobiologia da desnutrição nas doenças parasitárias. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 75, p. 63 - 76, 1980.
- COUTINHO, E. M. Relações Hospedeiro-Parasito na Esquistossomose Mansônica, em Função na Dieta Básica Regional (Estudo Epidemiológico E Anátomo-Patológico), 1976. **Tese de Doutorado**, Recife: Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.
- COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P.; ABATH, F. G. The influence of the regional basic diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 1992.
- COUTINHO, EM. **Patologia da Esquistossomíase na má-nutrição: uma visão abrangente**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, PMZ.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.
- COUTINHO-ABATH, E. Influence of protein intake on the penetration of cercariae of *Schistosoma mansoni* in the skin of normal and experimentally infected mice. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 4, p. 230-41, 1962.
- COUTO, J. L. A. et al. Esquistossomose murina associada à desnutrição alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Rev. Patol. Trop**, v. 36, n. 1, p. 54 - 66, 2007.
- COUTO, J. L. et al. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 601-7, 2002.
- CROMPTON, D. W. Nutritional aspects of infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 80, n. 5, p. 697-705, 1986.
- CUNHA, M. C. et al. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2013.

## Referências

- DAS, I. et al. Impact of iron deficiency anemia on cell-mediated and humoral immunity in children: A case control study. **J Nat Sc Biol Med**, v. 5, n. 1, p. 158-63, 2014.
- DAVIS, A. H. Epidemiology and Community Control of Disease in Warm Climate Countries. London: Churchill Livingstone, p. 389-412, 1985.
- DE ANGELIS, R. C. Desnutrição calórico-proteica. In: **Fisiologia da nutrição**. 3ed. São Paulo: Nobel, 1986. p.38-56.
- DE JESUS, A. R. et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**, v. 72, n. 6, p. 3391-7, 2004.
- DE OLIVEIRA, D. C. et al. The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-kappaB expression via the TNF-alpha signaling pathway. **Cytokine**, v. 69, n. 2, p. 218-25, 2014.
- DHUR, A.; GALAN, P.; HERCBERG, S. Iron status, immune capacity and resistance to infections. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, v. 94, n. 1, p. 11-9, 1989.
- DOUCET, C. et al. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. **Int Immunol**, v. 10, n. 10, p. 1421-33, 1998.
- DOWEIKO, J. P.; NOMPLEGGI, D. J. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 15, n. 2, p. 207-11, 1991.
- EKANEM, E. E. et al. Serum C-reactive protein and C3 complement protein levels in severely malnourished Nigerian children with and without bacterial infections. **Acta Paediatr**, v. 86, n. 12, p. 1317-20, 1997
- EL-BASSIOUNI, N. E. et al. Role of fibrogenic markers in chronic hepatitis C and associated hepatocellular carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 6, p. 6843-50, 2012.
- EL KARIM, M. A. A. The effect of schistosomiasis on 24-hour energy expenditure. *The Journal of Tropical*. **Med Hyg**, 89: 303-7, 1986.
- EZEAMAMA, A. E. et al. Helminth infection and cognitive impairment among Filipino children. **Am J Trop Med Hyg**, v. 72, n. 5, p. 540-8, 2005.
- FAKHIR, S. et al. Early rosette forming T cell--a marker of cellular immunodeficiency in PEM. *Indian Pediatr*, v. 25, n. 10, p. 1017-8, 1988.
- FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol*, v. 164, n. 5, p. 2585-91, 2000.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of Food Security and Nutrition in the World. [2015]**. Disponível em: <[http:// http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf](http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf)> Acesso em: 10 maio 2018.

## Referências

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; (WHO) - World Health Organization. **The State of Food Security and Nutrition in the World [2018]**. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/I9553EN/i9553en.pdf> > Acesso em: 10 dez.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of Food Insecurity in the World 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition [2012]**. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/016/i3027e/i3027e.pdf> > Acesso em: 2 fev. 2018.
- FARIA, A. M. et al. Food components and the immune system: from tonic agents to allergens. **Front Immunol**, v. 4, p. 102, 2013.
- FARTHING, M. J. Iron and immunity. *Acta Paediatr Scand Suppl*, v. 361, p. 44-52, 1989.
- FERNANDES, J. S. et al. Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Mediators Inflamm**, 2014:703653, 2014.
- FERREIRA, H. S. et al. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 581-7, 1993.
- FEVANG, P. et al. Malaria and Malnutrition: Kwashiorkor Associated with Low Levels of Parasitaemia. **Malar Res Treat**, v. 2018, p. 1-5, 2018.
- FINCH, C. A. **Erythropoiesis in protein-calorie malnutrition**. In: Protein-Calorie Malnutrition. Academic Press, New York, p. 247–256, 1975.
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. **Mapa da fome**. In: Radis - Comunicação e Saúde, n. 186, p. 16-24, 2018.
- FOCK, R. A. et al. Impairment of the hematological response and interleukin-1beta production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 12, p. 1163-71, 2012.
- FOCK, R. A. et al. Protein-energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 54, n. 5, p. 371-7, 2008.
- FOCK, R. A. et al. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 1021-8, 2010.
- FOCK, R. A. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-a in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v. 40, n.2, p; 105-14, 2007.
- FONSECA, C. T. et al. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein through an IFN-gamma and TNF-alpha dependent pathway. **Vaccine**, v. 22, p. 503-510, 2004.

## Referências

- FONSECA, CT. et al. Co-administration of plasmid expressing IL-12 with 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein cDNA alters immune response profiles and fails to enhance protection induced by Sm14DNA vaccine alone. **Microbes Infect** v. 8, n 9-10, p. 2509-16, 2006.
- FONTOURA, C. S. M. et al. Avaliação nutricional de paciente crítico. **Rev Bras Ter Int**, v. 18, n. 3 p. 298-306.
- FRIEDMAN, J. F.; KANZARIA, H. K.; MCGARVEY, S. T. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 8, p. 386-92, 2005.
- FRIEDMAN, J. F.; KANZARIA, H. K.; MCGARVEY, S. T. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 8, p. 386-92, 2005.
- FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **J Am Diet Assoc**, v. 104, n. 8, p. 1258-64, 2004.
- GARCIA, T. C. et al. Peptides containing T cell epitopes, derived from Sm14, but not from paramyosin, induce a Th1 type of immune response, reduction in liver pathology and partial protection against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Acta Trop**, v. 106, n. 3, p. 162-7, 2008.
- GARLY, M. L. et al. Thymus size at 6 months of age and subsequent child mortality. **J Pediatr**, v. 153, n. 5, p. 683-8, 688 e1-3, 2008.
- GASCHE, C. et al. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 53, n. 8, p. 1190-7, 2004.
- GAT-YABLONSKI, G.; PANDO, R.; PHILLIP, M. Nutritional catch-up growth. **World Rev Nutr Diet**, v. 106, p. 83-9, 2013.
- GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 3, p. 311-35, 2001.
- GIBSON, R. S. Strategies for preventing micronutrient deficiencies in developing countries. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 13, Suppl S23, 2004.
- GITLIN, D. et al. Albumin metabolism in children with protein malnutrition. **J Clin Invest**, v. 37, n. 5, p. 682-6, 1958.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, H. et al. Expression of cytokine mRNA in lymphocytes of malnourished children. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 5, p. 593-9, 2008.
- GONZALEZ-TORRES, C. et al. Effect of malnutrition on the expression of cytokines involved in Th1 cell differentiation. **Nutrients**, v. 5, n. 2, p. 579-93, 2013.

## Referências

- GRESSNER, A. M. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. **Front Biosci**, v. 7, p. 793-807, 2002.
- GROVER, Z.; EE, L. C. Protein energy malnutrition. **Pediatr Clin North Am**, v. 56, n. 5, p. 1055-68, 2009.
- GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-18, 2006.
- HAAS, W. et al. *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **J Parasitol**, v. 83, n. 6, p. 1079-85, 1997.
- HAAS, W. The attachment response of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. Influence of natural substrates and temperature. **Z Parasitenkd**, v. 49, n. 1, p. 63-72, 1976.
- HAASE, H.; MOCCHEGIANI, E.; RINK, L. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. **Biogerontology**, v. 7, n. 5-6, p. 421-8, 2006.
- HAGEL I. et al. Defective regulation of the protective IgE response against intestinal helminth *Ascaris lumbricoides* in malnourished children. **J Trop Pediatr**, v. 49, n. 3, p. 136-42, 2003.
- HALLER, L.; ZUBLER, R. H.; LAMBERT, P. H. Plasma levels of complement components and complement haemolytic activity in protein-energy malnutrition. **Clin Exp Immunol**, v. 34, n. 2, p. 248-52, 1978.
- HANG, L. M. *Schistosoma mansoni*: antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. **Exp Parasitol**, v. 35, n. 2, p. 288-98, 1974.
- HASHIMOTO, K. et al. Germfree mice reared on an "antigen-free" diet. **Lab Anim Sci**, v. 28, n. 1, p. 38-45, 1978.
- HAY, R. W.; WHITEHEAD, R. G.; SPICER, C. C. Serum-albumin as a prognostic indicator in oedematous malnutrition. **Lancet**, v. 2, n. 7932, p. 427-9, 1975.
- HENRI, S. al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. **J Immunol**, v. 169, n. 2, p. 929-936, 2002.
- HENRY, J. B. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 19<sup>a</sup> ed. New York: W.B. Saunders Company, 1996.
- HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 5, 3157-66, 2004.
- HILLYER, L. et al. Adoptively transferred dendritic cells restore primary cell-mediated inflammatory competence to acutely malnourished weanling mice. **Am J Pathol**, v. 172, n. 2, p. 378-85, 2008.
- HOFFMANN, K. F. et al. IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. **J Immunol**, v. 164, n. 12, p. 6406-16, 2000.

## Referências

- HOFFMANN, K. F. et al. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 163, n. 2, p. 927-38, 1999.
- HOMEDES, N. **The disability - adjusted life - year (DALY): definition, measurement and potential use**. In: European Bioethics Conference, 1995, Sant Cugat del Valles. Anais Sant Cugat del Valles: HCO Working Papers, 1995.
- HOOIJKAAS, H. et al. Isotypes and specificities of immunoglobulins produced by germ-free mice fed chemically defined ultrafiltered "antigen-free" diet. **Eur J Immunol**, v. 14, n. 12, p. 1127-30, 1984.
- HOTEZ, P. J. et al. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014.
- HUGHES, S. M. et al. Dendritic Cell Anergy Results from Endotoxemia in Severe Malnutrition. **J Immunol**, v. 183, n. 4, p. 2818-2826, 2009.
- HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 11, p. 577-88, 2006.
- IBRAHIM, M. K. et al. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 30, n. 4, p. 919-71, 2017.
- IFPRI - International Food Policy Research Institute. 2016. **Global Nutrition Report 2016: From Promise to Impact: Ending Malnutrition by 2030**. Washington, DC.
- IYER, S. S. et al. Protein Energy Malnutrition Impairs Homeostatic Proliferation of Memory CD8 T cells. **J Immunol**, v. 188, n.1, p. 77-84, 2012.
- JAMBON, B. et al. Thymulin (facteur thymique serique) and zinc contents of the thymus glands of malnourished children. **Am J Clin Nutr**, v. 48, n. 2, p. 335-42, 1988.
- JENSEN, G. L. et al. Malnutrition syndromes: a conundrum vs continuum. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 6, p. 710-6, 2009.
- JIA, Y. et al. Maternal lowprotein diet induces gender-dependent changes in epigenetic regulation of the glucose-6-phosphatase gene in newborn piglet liver. **J Nutr**, v. 142, n. 9, p. 1659-65, 2012.
- KABATEREINE, N. B. et al. Impact of a national helminth control programme on infection and morbidity in Ugandan schoolchildren. **Bull World Health Organ**, v. 85, n. 2, p. 91-9, 2007.
- KAMIMURA, M. A et al. **Avaliação nutricional**. In: Cuppari L. Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto. 2a ed. São Paulo: Manole, p. 89-128, 2006.
- KANZLER, S. et al. Prediction of progressive liver fibrosis in hepatitis C infection by serum and tissue levels of transforming growth factor-beta. **J Viral Hepat**, v. 8, n. 6, p. 430-7, 2001.

## Referências

- KEUSCH, G. T. et al. Immature circulating lymphocytes in severely malnourished Guatemalan children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 6, n. 2, p. 265-70, 1987.
- KEUSCH, G. T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 336S-340S, 2003.
- KHAN, Y.; BHUTTA, Z. A. Nutritional deficiencies in the developing world: current status and opportunities for intervention. **Pediatr Clin North Am**, v. 57, n. 6, p. 1409-41, 2010.
- KING, C. H. et al. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 1561-9, 2005.
- KING, C. H. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. **Acta Trop**, v. 113, n. 2, p. 95-104, 2010.
- KING, C. H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis, **Chronic Illn**, v. 4, n. 1, p. 65-79, 2008.
- KING, J. C.; KEEN, C. L. Zinco. In: SHILS, M. E. et al. (eds.). **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. 1. São Paulo: Manole, 2003. p.239-56.
- KIRSCH, R. et al. Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. **Nature**, v. 217, n. 5128, p. 578-9, 1968.
- KITANI, A. et al. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-producing regulatory T cells induce Smad mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of (TGF)- $\beta$ 1-mediated fibrosis. **J Exp Med**, v. 198, n. 8, p. 1179-88, 2003.
- KLOOS, H. et al. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 194-201, 2008.
- KLOOS, H. et al. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 578-86, 2010.
- KNAUFT, R. F.; WARREN, K. S. The Effect of Calorie and Protein Malnutrition on Both the Parasite and the Host in Acute Murine Schistosomiasis *Mansoni*. **J Clin Infect Dis**, v. 120, n. 5, 1969.
- KOMATSU, W. et al. Restoration by dietary glutamine of reduced tumor necrosis factor production in a low-protein-diet-fed rat model. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 71, n. 2, p. 352-7, 2007.
- KOPF, M. et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. **Nature**, v. 368, n. 6469, p. 339-42, 1994.
- KOUKOUNARI, A. et al. Morbidity indicators of *Schistosoma mansoni*: relationship between infection and anemia in Ugandan schoolchildren before and after praziquantel and albendazole chemotherapy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 2, p. 278-86, 2006.

## Referências

- KOUKOUNARI, A. et al. Relationships between anaemia and parasitic infections in Kenyan schoolchildren: A Bayesian hierarchical modelling approach. **Int J Parasitol**, v. 38, n. 14, p. 1663-71, 2008.
- LAMBERTUCCI, J. R., et al. Acute Schistosomiasis: report on five singular cases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1997, v. 92, n. 5, p. 631-5.
- LANDGRAF, M. A. et al. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. **Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 145-56, 2007.
- LATIF, B. et al. Autochthonous human schistosomiasis, Malaysia. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 8, p. 1340-1, 2013.
- LEAN, M. E. J. Principles of human nutrition. **Medicine**, v. 39, n. 1, p. 1-4, 2010.
- LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1, p. 141-51, 1998.
- LIU, X. et al. Th2 cytokine regulation of type I collagen gel contraction mediated by human lung mesenchymal cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 282, n. 5, p. L1049-56, 2002.
- LOSADA-BARRAGÁN, M. et al. Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. **Sci Rep**, v. 7, n. 45991, p. 1-13, 2017.
- LOUREIRO, S. A questão do social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 124-33, 1989.
- LOWRY, D. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.
- MACDOUGALL, L. G. et al. Mechanisms of anemia in protein-energy malnutrition in Johannesburg. **Am J Clin Nutr**, v. 35, n. 2, p. 229-35, 1982.
- MACIVER, N. J. et al. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 4, p. 949-57, 2008.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 6, p. 478-85, 2004.
- MAGALHÃES, L. M. et al. Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. **Rev Saúde Públ**, v. 20, n. 5, p. 362-8, 1986.
- MAICÁ, A. O.; SCHWEIGERT, I. D. Avaliação nutricional em pacientes graves. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 20, n. 3, p. 286-95, 2008.

## Referências

- MAKONNEN, B.; VENTER, A.; JOUBERT, G. A randomized controlled study of the impact of dietary zinc supplementation in the management of children with protein-energy malnutrition in Lesotho. I: Mortality and morbidity. **J Trop Pediatr**, v. 49, n. 6, p. 340-52, 2003.
- MALAFIA, G. et al. Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* vaccine in BALB/c mice. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 1, p. 41-9, 2009.
- MALAFARINA, V. et al. Sarcopenia in the elderly: diagnosis, physiopathology and treatment. **Maturitas**, v. 71, n. 2, p. 109-14, 2012.
- MALAQUIAS, L. C. et al. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand J Immunol**, v. 46, n. 4, p. 393-8, 1997.
- MALCOLM, G. C. Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia. **Paediatr Int Child Health**, v. 35, n. 2, p. 83-9, 2015.
- Mc GARVEY, S. T. et al. Child growth nutritional status and *Schistosomiasis japonica* in Jiangxi, people's Republic China. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 4, p. 547-53, 1993.
- MCCARTER, M. D. et al. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein-calorie malnutrition. **Cell Immunol**, v. 183, n. 2, p. 131-6, 1998.
- MEIJERS, J. M. et al. Defining malnutrition: mission or mission impossible? **Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 432-40, 2010.
- MEIRA, D. A. Interactions of infection, nutrition, and immunity. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 28, n. 4, p. 315-9, 1995.
- MENEZES, J. S. et al. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. **Int Immunol**, v. 15, n. 3, p. 447-55, 2003.
- MENGHERI, E. et al. Protein starvation impairs the ability of activated lymphocytes to produce interferon-gamma. **J. Interferon Res**, v. 12, n. 1, p. 17-21, 1992.
- MERCER, L. P. et al. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. **J Nutr**, v. 124, n. 7, p. 1029-36, 1994.
- MERINO-SANJUÁN, M. et al. Animal model of undernutrition for the evaluation of drug pharmacokinetics. **Nutr Hosp**, v. 26, n. 6, p.1296-304, 2011.
- MEYER, F.; MEYER, H.; BUEDING, E. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. **Biochim Biophys Acta**, v. 210, n. 2, p. 257-66, 1970.
- MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 281-302, 1978.
- MILLWARD, D. J.; JACKSON, A. A. Protein/energy ratios of current diets in developed and developing countries compared with a safe protein/energy ratio: implications for recommended protein and amino acid intakes. **Public Health Nutr**, v. 7, n. 3, p. 387-405, 2004.

## Referências

- MISHRA, S. K.; BASTOLA, S. P.; JHA, B. Biochemical nutritional indicators in children with protein energy malnutrition attending Kanti Children Hospital, Kathmandu, Nepal. **Kathmandu Univ Med J**, v. 7, n. 26, p. 129-34, 2009.
- MITHAL, A. et al. Impact of nutrition on muscle mass, strength, and performance in older adults. **Osteoporos Int**, v. 24, n. 5, p. 1555-66, 2013.
- MONTE, Cristina M.G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. **J Pediatr**, v. 76, supl 3, p. 285-97, 2000.
- MONTEJO GONZALEZ JC. et al. Recommendations for the nutritional assessment of critically ill patients. **Rev Med Chile**, v. 134, n. 8, p. 1049-56, 2006.
- MONTENEGRO, S. M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, 1999.
- MOREL, C. M. Reaching maturity - 25 years of the TDR. **Parasitol Today**, v. 16, n. 12, p. 522-8, 2000.
- MORETTI, R. et al. Vitamin B12 and folate depletion in cognition: a review. **Neurol India**, v. 52, n. 3, p. 310-8, 2004.
- MUKAI, T. et al. Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon-gamma. **Liver Int**, v. 26, n. 8, p. 1006-14, 2006.
- 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, n. 12, 2016.
- NAJERA, O. et al. Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. **Clin Exp Immunol**, v. 148, n. 3, p. 501-6, 2007.
- NÁJERA, O. et al. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 3, p. 577-80, 2004.
- NÁJERA, O. et al. Early Activation of T, B and NK Lymphocytes in Infected Malnourished and Infected Well-Nourished Children. **J Nutr Immunol**, v. 5, p. 85-97, 2002.
- NÁJERA-MEDINA, O. et al. Infected malnourished children displayed changes in early activation and lymphocyte subpopulations. **Acta Paediatr**, v. 106, n. 9, p. 1499-1506, 2017.
- NAKAJIMA, K. et al. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 82-9, 2014.
- NASSAR, M. F. et al. T-lymphocyte subsets and thymic size in malnourished infants in Egypt: a hospital-based study. **East Mediterr Health J**, v. 13, n. 5, p. 1031-42, 2007.

## Referências

- Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities.** Geneva: WHO, 2009. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44214> > Acesso em: 15 abr. 2017.
- NEUMANN, C. G.; GEWA, C.; BWIBO, N. O. Child nutrition in developing countries. **Pediatr Ann**, v. 33, n. 10, p. 658-74, 2004.
- NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- NEVES, J.; DA LUZ, L.-M.; TONELLI, E. Toxemic form of schistosomiasis mansoni. Diagnostic considerations on 50 identified cases in Belo Horizonte. **Hospital (Rio J)**, v. 70, n. 6, p. 1583-603, 1966.
- NEVES, R. H. et al. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 405-7, 2002.
- NIIYA, T. et al. Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice. **J Nutr**, v. 137, n. 3, p. 671-5, 2007.
- NOURELDIN, M. S. et al. Opportunistic intestinal protozoal infections in immunocompromised children. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 29, n. 3, p. 951-61, 1999.
- NOVA, E. et al. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. **Eur J Clin Nutr**, v. 56, Suppl 3, p. S34-7, 2002.
- NÚÑEZ, I. et al. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein–energy malnutrition. **Br J Nutr**, v. 110, n. 3, p. 500-8, 2013.
- NUTTALL, F. Q.; NGO, A.; GANNON, M. C. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? **Diabetes Metab Res Rev**, v. 24, n. 6, p. 438-58, 2008.
- OLIVEIRA, D. C. O. et al. The influence of protein malnutrition on the production of GM-CSF and M-CSF by macrophages. **Braz J Pham Sci**, v. 52, n. 3, p. 375-82, 2016.
- OLIVEIRA, I. M. V.; ANGELIS, R. C. Angelis, R. C. Requisitos proteicos mínimos de diferentes fontes vegetais para ratos de laboratório em fase de crescimento. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 38, n.1, p. 23-8. 2001.
- OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, v. 93, n. 1, p. 30-5, 2004.
- OLIVEIRA, S. A. et al. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from Undernourished infected mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 623-7, 2003.
- OPPENHEIMER, S. J.; HENDRICKSE, R. G. The clinical effects of iron deficiency and iron supplementation. **Nutr Abstr Rev**, v. 53, p. 585-98, 1983.

## Referências

- OSTOLIN, T. L. V. **Análise proteômica comparativa de *Leishmania (Leishmania) infantum* para identificação de proteínas diferencialmente expressas induzidas pelo modelo de desnutrição proteica murino**. 2014. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.
- OZTURK, G. et al. Decreased natural killer (NK) cell activity in zinc-deficient rats. **Gen Pharmacol**, v. 25, n. 7, p. 1499-503, 1994.
- PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 14, n. 6, p. 931-76, 1965.
- PARENT, G. et al. In vitro lymphocyte-differentiating effects of thymulin (Zn-FTS) on lymphocyte subpopulations of severely malnourished children. **Am J Clin Nutr**, v. 60, n. 2, p. 274-8, 1994
- PARRAGA, I. M. et al. Gender differences in growth of school-aged children with schistosomiasis and geohelminth infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 2, p. 150-6, 1996.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.
- PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev Bras Malariol**, v. 8, p. 589-97, 1956.
- PIAO, R. L. Clinical significance of connective tissue growth factor in hepatitis B virus-induced hepatic fibrosis. **World J Gastroenterol**, v. 18, n. 18, p. 2280-6, 2012.
- POWANDA, M. C.; BEISEL, W. R. Metabolic effects of infection on protein and energy status. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 322S-327S, 2003.
- PRATA, A.; BINA, J. C. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (A study of 20 patients observed during a 5 years period). **Gaz Med Bahia**, v. 68, n. 2, p. 49-60, 1968.
- PRUAL, A. et al. Consequences of *Schistosoma haematobium* infection on the iron status of schoolchildren in Niger. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 3, p. 291-7, 1992.
- RAGUSO, C. A.; DUPERTUIS, Y. M.; PICHARD, C. The role of visceral proteins in the nutritional assessment of intensive care unit patients. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 6, n. 2, p. 211-6, 2003.
- RAMOS, R. P. **Infecção esquistossomótica aguda: produção de citocinas em camundongos desnutridos e deficientes em iNOS**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.
- REDDY, V.; RAGHURAMULU, N.; BHASKARAM, C. Secretory IgA in protein-calorie malnutrition. **Arch Dis Child**, v. 51, n. 11, p. 871-4, 1976.

## Referências

- 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, n. 11, p. 1939-51, 1993.
- REMAIN, R. M. et al. Interleukin 5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1471-9, 2006.
- RHO, S. et al. Protein energy malnutrition alters mucosal IgA responses and reduces mucosal vaccine efficacy in mice. **Immunol Lett**, v. 190, p. 247-256, 2017.
- RIKIMARU, T. et al. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. **Eur J Clin Nutr**, v. 52, n. 5, p. 344-50, 1998.
- RIVADENEIRA, D. E. et al. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. **Surgery**, v. 129, n. 5, p. 617-25, 2001.
- ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. Fundamentos de Robbins: **Patologia estrutural e funcional**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RODRÍGUEZ, L. et al. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 4, p. 502-7, 2005.
- RODRÍGUEZ, L. et al. Effect of leptin on activation and cytokine synthesis in peripheral blood lymphocytes of malnourished infected children. **Clin Exp Immunol**, v.148, n. 3, p. 478-85, 2007.
- RUMJANEK, F. D.; CAMPOS, E. G.; AFONSO, L. C. Evidence for the occurrence of LDL receptors in extracts of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 28, n. 2, p. 145-52, 1988.
- RUMJANEK, F. D.; MCLAREN, D. J.; SMITHERS, S. R. Serum-induced expression of a surface protein in schistosomula of *Schistosoma mansoni*: a possible receptor for lipid uptake. **Mol Biochem Parasitol**, v. 9, n. 4, p. 337-50, 1983.
- RUMJANEK, F. D.; SIMPSON, A. J. The incorporation and utilization of radiolabelled lipids by adult *Schistosoma mansoni* in vitro. **Mol Biochem Parasitol**, v. 1, n. 1, p. 31-44, 1980.
- RUTZKY L. I. et al. Th1- polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in Schistosome infection. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 98, p. 13243-13248, 2001.
- RYTTER, M. J. H. et al. The Immune System in Children with Malnutrition - A Systematic Review. **Plos One**, v. 9, n.8, p. 1-19, 2014.
- SAH, S. P. et al. Effect of PEM on thyroid status, serum total protein and A/G ratio in pre-school going children. **Int J Res Med Sci**, v. 5, n. 10, p. 4486-89, 2017.

## Referências

- SAMUELSON, J. C.; CAULFIELD, J. P.; DAVID, J. R. *Schistosoma mansoni*: post-transformational surface changes in schistosomula grown in vitro and in mice. **Exp Parasitol**, v. 50, n. 3, p. 369-83, 1980.
- SANTINI-OLIVEIRA, M. et al. Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. **Vaccine**, v. 34, n. 4, p. 586-94, 2016.
- SANTOS, A. C. et al. Intravenous Glutamine Administration Modulates TNF-alpha/IL-10 Ratio and Attenuates NFkB Phosphorylation in a Protein Malnutrition Model. **Inflammation**, v. 39, n. 6, p. 1883-91, 2016.
- SANTOS, C. F, et al. Effect of an essential fatty acid deficient diet on experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in germfree and conventional mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 795-802, 1992.
- SANTOS, N. S. J. et al. Is serum albumin a marker of nutritional status in hemodialysis patients without evidence of inflammation? **Artif Organs**, v. 27, n. 8, p. 681-6, 2003.
- SAUCILLO, D. C. et al. Leptin metabolically licenses T cells for activation to link nutrition and immunity. **J Immunol**, v. 192, n. 1, p. 136-44, 2014.
- SAUNDERS, J.; SMITH, T. Malnutrition: causes and consequences. **Clin Med (Lond)**, v. 10, n. 6, p. 624-7, 2010.
- SAUNDERS, J.; SMITH, T. Malnutrition: causes and consequences. **Clin Med**, v. 10, n. 6, p. 624-7, 2010.
- SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **Eur J Clin Nutr**, v. 56 Suppl 3, p. S46-9, 2002.
- SAWAYA, A. L. Desnutrição: consequências a longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estud Av**, v. 58, n. 20, p. 147-58, 2006
- SCRIMSHAW, N. S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 316S-321S, 2003.
- SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 316-21, 2003.
- SERAFIM, T. D. et al. Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 811-7, 2010.
- SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9 ed. São Paulo: Manole, 2003.
- SILVA, F. L. **Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni***. 2008. 115p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

## Referências

- SIMÕES, C. et al. Parasitological Characteristics of *Schistosoma mansoni* Infection in Swiss Mice with Underlying Malnutrition. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, Suppl 1, p. 143-7, 2002.
- SIRISINHA, S. et al. Complement and C3-proactivator levels in children with protein-calorie malnutrition and effect of dietary treatment. **Lancet**, v. 1, n. 7811, p. 1016-20, 1973.
- SIRISINHA, S. et al. Secretory and serum IgA in children with protein-calorie malnutrition. **Pediatrics**, v. 55, n. 2, p. 166-70, 1975.
- SISODIA, U. et al. Protein Energy Malnutrition Severe Acute Malnutrition, LRTI with KOCH'S. **Acta Sci Nutr Health**, v. 2, n. 5, p. 19-20, 2018.
- SOETERS, P. B. et al. A rational approach to nutritional assessment. **Clin Nutr**, v. 27, n. 5, p. 706-16, 2008.
- SOUZA, I. P. et al. Desnutrição proteica: efeito sobre o espraçamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 37, n. 2, p. 143-151, 2001.
- STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2004.
- STENVINKEL, P. Anaemia and inflammation: what are the implications for the nephrologist? **Nephrol Dial Transplant**, v. 18 Suppl 8, p. 17-22, 2003.
- STEPHENSON, L. S. Helminth parasites, a major factor in malnutrition. **World Health Forum**, v. 15, n. 2, p. 169-172, 1994.
- STEPHENSON, L. **Schistosomiasis and human nutrition**. Cornell International Nutrition Monographs Series, 16: 1-21, 1986.
- STEPHENSON, L. The impact of schistosomiasis on human nutrition. **Parasitology**, v. 107, p. S107-23, 1993.
- STINNETT, J. D. **Historical perspectives of malnutrition and disease, in: Nutrition and the Immune Response**. CRC Press, Boca Raton, p. 1-5, 1983.
- STINNETT, J. D. **Nutrition and the immune response**. CRC Press. 1983. 150p.
- STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv Parasitol**, v. 12, p. 115-82, 1974.
- STOLTZFUS, R. J. et al. Low dose daily iron supplementation improves iron status and appetite but not anemia, whereas quarterly anthelmintic treatment improves growth, appetite and anemia in Zanzibari preschool children. **J Nutr**, v. 134, n. 2, p. 348-56, 2004.
- TAYLOR, A. K. et al. Protein energy malnutrition decreases immunity and increases susceptibility to influenza infection in mice. **J Infect Dis**, v. 207, n. 3, p. 501-10, 2013.

## Referências

- TENDLER, M. et al. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Trop**, v. 108, n.2-3, p. 263–266, 2008.
- TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch Latinoam Nutr**, v. 40, n. 4, p. 533-47, 1990.
- TERAN, L. M. et al. Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 20, n. 4, p. 777-86, 1999.
- THAKUR, S.; GUPTA, N.; KAKKAR, P. Serum copper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition. **Eur J Pediatr**, v. 163, n. 12, p. 742-4, 2004.
- TORRES, V. M. Dermatologic manifestations of Schistosomiasis mansoni. **Arch Dermatol**, v. 112, n. 11, p. 1539-42, 1976.
- UNICEF - United Nations Children's Fund, World Health Organization; WHO - World Health Organization. **Levels and trends in child malnutrition: Key findings of the 2018 Edition of the Joint Child Malnutrition Estimates**. Disponível em: < <https://www.who.int/nutgrowthdb/2018-jme-brochure.pdf?ua=1> > Acesso em 5 jul. 2018.
- VAN EE, J. H.; POLDERMAN, A. M. Physiological performance and work capacity of tin mine labourers infested with schistosomiasis in Zaire. **Trop Geogr Med**, v. 36, n. 3, p. 259-66, 1984.
- VILLALPANDO, S. et al. Milk folate but not milk iron concentrations may be inadequate for some infants in a rural farming community in San Mateo, Capulhuac, Mexico. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 4, p. 782-9, 2003.
- VITURI, C. L. et al. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mieloides *in vitro* no modelo de desnutrição proteica em camundongos. **Braz J Pharma Sci**, v. 44, n. 4, p. 493-500, 2008.
- VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. Desnutrição: metabolismo proteico muscular e recuperação nutricional associada ao exercício. **Motriz Rev Educ Fís**, v. 14, n.1, p. 74-84, 2008.
- VON LICHTENBERG, F. Consequences of infections with schistosomes. In ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. *The biology of schistosomes: from genes to latrines*. London: Academic Press, 1987. p. 185 - 232.
- WAITZBERG, D. L. et al. Postoperative total parenteral nutrition. **World J Surg**, v. 23, n. 6, p. 560-4, 1999.
- WALICK, S. *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. **Exp Parasitol**, v. 132, n. 1, p. 7-13, 2012.

## Referências

- WATERLOW, J. C. **Malnutrição proteico-energética**. Washington, D.C.: Organização Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 1996.
- WATERLOW, J. C.; ALLEYNE, G. A. O. **Má nutrição proteica em crianças. Evolução dos conhecimentos nos últimos dez anos**. São Paulo: L.P.M. Editora, 120p, 1974.
- WATERS, W. R. et al. Mycobacterium bovis infection of vitamin D-deficient NOS2<sup>-/-</sup> mice. **Microb Pathog**, v. 36, n. 1, p. 11-7, 2004.
- WELLINGHAUSEN, N.; KIRCHNER, H.; RINK, L. The immunobiology of zinc. **Immunol Today**, v. 18, n. 11, p. 519-21, 1997.
- WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. et al. Dietary protein, weight loss, and weight maintenance. **Annu Rev Nutr**, v. 29, p. 21-41, 2009.
- WHITE, B. D.; DEAN, R. G.; MARTIN, R. J. An Association between Low Levels of Dietary Protein, Elevated NPY Gene Expression in the Basomedial Hypothalamus and Increased Food Intake. **Nutr Neurosci**, v. 1, n. 3, p. 173-82, 1998.
- WHITE, J. V. et al. Consensus statement of the Academy of Nutrition and Dietetics/American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). **J Acad Nutr Diet**, v. 112, n. 5, p. 730-8, 2012.
- WHITEHEAD, R. G.; COWARD, W. A.; LUNN, P. G. Serum-albumin concentration and the onset of kwashiorkor. **Lancet**, v. 1, n. 7794, p. 63-6, 1973.
- WHO - World Health Organization. **Distribution of schistosomiasis worldwide [2012]**. Disponível em: < <https://www.who.int/schistosomiasis/en/>> Acesso em 12 dez. 2019.
- WHO - World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee. WHO Technical Report Series, n. 522, 1973.
- WHO - World Health Organization. **Key facts - Malnutrition. [2018a]**. Disponível em: < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>> Acesso em 10 maio 2018.
- WHO - World Health Organization. **Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities**. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44214>> Acesso em: 15 abr. 2017.
- WHO - World Health Organization. **Obesity and overweight: fact sheets – [2018c]**. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em 2 out. 2018.
- WHO - World Health Organization. **Schistosomiasis: fact sheets [2018b]**. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> >. Acesso em 13 ago. 2018.
- WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 148-54, 2007.

*Referências*

WYNN, T. A. et al. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunol Rev**, v. 201, p. 156-67, 2004.

XAVIER, J. G. et al. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 6, p. 651-60, 2007.

XU, X.; CAULFIELD, J. P. Characterization of human low density lipoprotein binding proteins on the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Eur J Cell Biol**, v. 57, n. 2, p. 229-35, 1992.

YAKUBU, A. M. Secretory IgA in nasal secretions of children with acute gastroenteritis and kwashiorkor. **Ann Trop Paediatr**, v. 2, n. 3, p. 139-42, 1982.

## ANEXO I - Licença do CEUA



## LICENÇA

LW-2/18

Certificamos que o protocolo (P-6/17-6), intitulado "Avaliação da resposta imune contra o antígeno vacinal do *Schistosoma mansoni* (Sm14) em camundongos desnutridos", sob a responsabilidade de CRISTINA TOSCANO FONSECA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 14/05/2022 e inclui o uso total de :

*Mus musculus*

- 560 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 3 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 14 de maio de 2018

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA