



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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESQUISTOSSOMOSE  
MANSÔNICA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA:  
ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO  
NEONATAL**

**DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA**

**RECIFE/PE**

**2013**

**DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA**



**ASSOCIAÇÃO ENTRE ESQUISTOSSOMOSE  
MANSÔNICA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA:  
ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS EM  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO  
NEONATAL**

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre(a) em Medicina Tropical .

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

**Co-orientadora :** Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Vláudia Maria Assis Costa

**RECIFE/PE**

**2013**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Bibliotecária: Adelaide Lima - CRB4-647

- O48a Oliveira, Danielly Cantarelli de.  
Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana: estudo dos aspectos imunológicos em camudongos submetidos à desnutrição neonatal / Danielly Cantarelli de Oliveira. – Recife: O autor, 2013.  
118 f.: il.; gráf.; tabs.; figs.; 30 cm.
- Orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.  
Inclui bibliografia e anexos.
1. Esquistossomose. 2. Desnutrição. 3. Translocação bacteriana. 4. Citocinas. I. Castro, Célia Maria Machado de. (Orientadora). II. Título.
- 618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-039)



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

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

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

Francisco de Souza Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles Pontes Filho

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

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vláudia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Ana Catarina de Souza Lopes

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque



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

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA**

**DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA**

No dia 05 de março de 2013, às 09h00, na Sala de Aula do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, os Membros Doutores a **Profª. Drª. Ana Catarina de Souza Lopes – Presidente da Banca (UFPE)**, a **Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa (UFPE)** e o **Profº. Drº. Carlos Roberto Weber (UFPE)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **DANIELLY CANTARELLI DE OLIVEIRA** sobre a sua Dissertação intitulada “ASSOCIAÇÃO ENTRE ESQUITOSSOMOSE MANSÔNICA E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA: ESTUDO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL ”, a qual foi orientada pela **Profª. Drª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro (UFPE)** e co-orientada pela **Profª Drª. Vláudia Maria Assis Costa (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Ana Catarina de Souza Lopes

Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

Profº. Drº. Carlos Roberto Weber Sobrinho

Aprovada  
Aprovada  
Aprovada

*A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, respeito e responsabilidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os meus caminhos com afeto e dedicação, me ensinando a correr atrás dos objetivos com a certeza de que venceria no final, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram e renunciaram às suas vontades, para que, muitas vezes, fossem realizadas as minhas, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, **Leonardo e Mirene**, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não há palavras que agradeçam por tudo.*

*A vocês, com amor, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua grandiosa presença, me acompanhando em todos os momentos, sempre iluminando os meus caminhos e me dando forças para prosseguir;

Aos meus pais, Leonardo e Mirene, pela oportunidade de chegar até aqui e por todo o apoio, incentivo e colaboração no sentido de me permitir realizar mais um sonho;

Ao meu irmão e a toda a minha família, que estiveram sempre ao meu lado e contribuíram imensuravelmente para a formação do meu caráter;

Ao meu namorado Danilo, por todo o carinho, paciência, compreensão e apoio indescritíveis;

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Célia Castro, pelas oportunidades, ensinamentos e por sua confiança em meu trabalho;

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup> Vláudia Costa, que com seus conhecimentos teóricos e práticos, contribuiu de maneira única para o sucesso da pesquisa;

À Dr<sup>a</sup> Rosângela Coelho, por todo o apoio e por gentilmente disponibilizar equipamentos do seu laboratório;

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

À Dr<sup>a</sup> Maria Helena, pela grande ajuda durante os experimentos;

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

Ao meu amigo Bruno Galvão, com quem tive o prazer de trabalhar durante toda a realização do estudo e no seu decorrer foi construída uma grande amizade forte e sincera. Agradeço pelo imenso apoio, companheirismo incentivo e ajuda. Jamais esquecerei o que fez por mim;

Ao meu amigo André Aires, por sua disponibilidade e ajuda fundamental na execução dos experimentos, e pelas longas conversas e risos que tornaram os períodos ainda mais agradáveis;

Aos meus amigos Nathalia e Martone, pela amizade, torcida e pensamentos positivos;

À Kedma Magalhães, pela imensa ajuda na elaboração do projeto, e a Carlos Weber, pela troca de experiências e colaboração com o estudo;

A Alexande Jr. e Wallace, pelos momentos de descontração, onde o riso era garantido;

Aos colegas do LIKA, em especial aos alunos de Iniciação Científica Carlos Miranda, Clarissa Ataíde, Sandy Beatriz e Amanda, pela grande ajuda no cuidado com os animais e na execução dos experimentos;

Aos funcionários do Biotério do LIKA, pela atenção e cooperação;

A todos os colegas de mestrado e doutorado em Medicina Tropical, especialmente à Érica, Lilian e André. Cada um de vocês colaborou de maneira importante para o meu processo de aprendizagem;

À propesq/UFPE e ao CNPq, pelo apoio financeiro;

A todos que foram importantes, contribuindo direta ou indiretamente não só no desenvolvimento deste trabalho, mas para o meu crescimento pessoal e profissional, MUITO OBRIGADA!!!

*“Digamos sempre obrigado,  
pois não conquistamos nada sozinhos”  
Ação de graças*



*“Prepara-te para o que quiseres ser”*

*Provérbio alemão*

## RESUMO

**OLIVEIRA, D. C.** Associação entre Esquistossomose Mansônica e Translocação Bacteriana: Estudo de Aspectos Imunológicos em Camundongos Submetidos à Desnutrição Neonatal. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco

**Introdução:** É comum a associação de esquistossomose mansônica com desnutrição, uma vez que populações com baixo padrão socioeconômico habitam regiões endêmicas. Estudos sugerem que deficiências nutricionais podem estar relacionadas com a supressão da resposta imunológica em animais infectados por *S. mansoni*. Quando imposta no período crítico da lactação, a desnutrição é um agente estressor indutor de alterações tardias na resposta imunológica, implicada em diversas modificações fisiológicas e metabólicas, relacionadas à depressão do sistema imune. A desnutrição também tem sido considerada na patogênese da translocação bacteriana (TB), por promover aumento da permeabilidade e diminuição das enzimas intestinais. Estudos têm relatado uma maior ocorrência de TB em animais infectados por *S. mansoni*, quando comparados a animais sem infecção, contudo conhecimentos imunológicos acerca da relação são escassos. **Objetivo:** Investigou-se a associação entre os níveis de IFN-  $\gamma$  e IL-10 e a ocorrência de translocação bacteriana, em camundongos submetidos à desnutrição neonatal.

**Métodos:** Camundongos fêmeas *Swiss webster* (n=32) foram divididos, no período de aleitamento, em 2 grupos: Nutrido (N) e Desnutrido (D) – amamentados por mães alimentadas com dieta contendo 17% e 8% de proteína à base de caseína, respectivamente. Aos 35-45 dias de vida, 8 animais de cada grupo foram infectados com, em média, 30 cercárias de *S. mansoni*, constituindo os grupos: Nutrido Infectado (NI), Nutrido Não Infectado (NNI), Desnutrido Infectado (DI) e Desnutrido Não Infectado (DNI). O peso corporal (PC) dos animais foi mensurado diariamente no período de aleitamento e semanalmente a partir do 22º dia. 45 dias após a exposição cercariana, foi realizada a confirmação da infecção pelo método de Kato-katz. Aos 161 dias de vida, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras biológicas. Coletou-se sangue cardíaco para contagem total (CT) e diferencial de leucócitos. Para estudo da translocação bacteriana (TB), foram coletados sangue periférico, sangue portal, baço, fígado, linfonodos mesentéricos e fezes da região média do intestino delgado. Realizou-se cultura de células esplênicas para dosagem de IFN- $\gamma$  e IL-10 no sobrenadante, através de ensaio imunoenzimático – ELISA. **Resultados:** Os animais do grupo D apresentaram um menor ganho de PC em relação ao grupo N a partir do 4º dia, diferença observada durante todo o período experimental. Verificou-se um maior índice de TB nos animais infectados, comparando-os aos não infectados. Entre os infectados, houve tendência a uma maior incidência de TB no grupo D comparado ao N, entretanto, a diferença não foi significativa. Os isolados bacterianos responsáveis pela TB em animais nutridos foram *Bacillus sp.*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus rettgeri* e *Staphylococcus saprophyticus*. Nos animais desnutridos, foram encontrados *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens*,

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus saprophyticus*. Foi observada uma menor produção de IFN- $\gamma$  no grupo DI, comparado ao NI. Os níveis de IL-10 foram mais elevados no grupo NI, em relação ao grupo DI. A CT de leucócitos mostrou-se elevada nos grupos infectados, quando comparados aos controles. Os números de neutrófilos e monócitos foram maiores nos grupos NI e DI, quando comparados aos grupos NNI e DNI, respectivamente. Os valores de linfócitos mostraram-se aumentados no grupo DI, comparado ao DNI. **Conclusões:** A desnutrição modifica a resposta imune e pode favorecer translocação bacteriana em camundongos infectados por *S. mansoni*.

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

## ABSTRACT

**Oliveira, D.C.** Association between Schistosomiasis and Bacterial Translocation: Study of Immunological Aspects in Mice Submitted to Neonatal Malnutrition. 2013. Dissertation (PhD), Federal University of Pernambuco Center of Medical Sciences Saúde. Postgraduate Program in Tropical Medicine. Recife.Pernambuco.

**Introduction:** It is common the association of schistosomiasis with malnutrition, since populations with low socioeconomic pattern inhabit endemic regions. Studies suggest that nutritional deficiencies may be related to suppression of the immune response in animals infected with *S. mansoni*. When imposed during the critical period of lactation, malnutrition is a stressor agent inducing changes late in the immune response, implicated in several metabolic and physiological changes related to depression of the immune system. Malnutrition also has been considered in the pathogenesis of bacterial translocation (BT), by promoting increased permeability and decreased intestinal enzymes. Studies have reported a higher incidence of BT in animals infected with *S. mansoni*, compared to animals without infection, but immunological knowledge about the relationship are scarce. **Objective:** Was investigated the association between the levels of IFN- $\gamma$  and IL-10, and bacterial translocation in mice subjected to neonatal malnutrition. **Methods:** Swiss webster mice females (n = 32) were divided, during lactation, in 2 groups: nourished (N) and Malnourished (M) - suckled by mothers fed a diet containing 17% and 8% of protein based on casein, respectively. At 35-45 days of age, eight animals from each group were infected with, on average, 30 cercariae of *S. mansoni*, constituting groups: Nourished Infected (NI), Nourished Not Infected (NNI), Malnourished Infected (MI) and Malnourished Not Infected (MNI). The body weight (BW) of the animals was measured daily during lactation and weekly from 22 days. 45 days after exposure to cercariae, was performed to confirm the infection by the Kato-katz. To 161 days of age, the animals were euthanized for collection of biological samples. Was collected cardiac blood for total count (TC) and differential of leukocytes. To study the bacterial translocation (BT), were collected peripheral blood, portal blood, spleen, liver, lymph nodes and faeces of the middle region of the small intestine. Was performed culture of spleen cells for measurement of IFN- $\gamma$  and IL-10 in supernatants by enzyme linked immunosorbent assay - ELISA. **Results:** The animals of group M showed a smaller gain of BW compared to group N from the 4th day, difference observed during all experimental period. There was a higher rate of BT in infected animals compared to uninfected them. Among those infected, there was trend towards a higher incidence of TB in group M compared to N, however, the difference was not significant. The bacterial isolates responsible for BT in nourished animals were *Bacillus* sp., *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus rettgeri* and *Staphylococcus saprophyticus*. In malnourished animals were found *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, Coagulase-negative *Staphylococci* and *Staphylococcus saprophyticus*. Were observed a lower production of IFN- $\gamma$  in MI group, compared to NI. The levels of IL-10 were higher in NI group, compared to MI group. The TC of the leukocytes was elevated in infected

groups compared to controls. The numbers of neutrophils and monocytes were higher in groups NI and MI when compared to NNI and MNI groups, respectively. The amounts of lymphocytes were shown to be increased in the group MI compared to MNI. **Conclusions:** Malnutrition modifies the immune response and may promote bacterial translocation in mice infected with *S. mansoni*.

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

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica.	25
Figura 2	Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> . O esquema mostra as etapas do ciclo no meio aquático, nos hospedeiros intermediário e vertebrado.	27
Figura 3	<b>A.</b> Camundongos <i>Swiss webster</i> . <b>B.</b> Gaiolas de camundongos, com cama de maravalha, ração Labina® e bebedouro, alojadas no Biotério do LIKA/UFPE.	48
Figura 4	Distribuição de grupos de camundongos submetidos aos estudos.	49
Figura 5	Moluscos da espécie <i>B. glabrata</i> infectados, em meio aquático e sob exposição à luz artificial.	52
Figura 6	<b>A.</b> Obtenção da suspensão cercariana. <b>B.</b> Cercária liberada pelo molusco e observada com auxílio da microscopia óptica (20X).	52
Figura 7	Camundongos anestesiados e expostos à suspensão cercariana, por via percutânea, e luz artificial.	52
Figura 8	Método de Kato-Katz. <b>A.</b> Helm-test®, <b>B.</b> Recolhimento das fezes que passam pela malha, <b>C.</b> Papel de celofane emergido em solução verde malaquita a 3%, <b>D.</b> Lâminas preparadas.	53
Figura 9	Observação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> pelo método Kato-Katz.	54
Figura 10	Incisão mediana xifo pubiana realizada nos camundongos para coleta de amostras biológicas.	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das dietas Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação dos animais.	46
Tabela 2	Composição da dieta padrão Labina® (Purina do Brasil) utilizada na alimentação dos animais.	47

## ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Tabela 1	Composição das dietas Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação dos animais.	64
Tabela 2	Incidência de translocação bacteriana segundo os grupos de comparação. Dados como frequência absoluta e relativa – <i>Qui-Quadrado</i> .	69

## LISTA DE GRÁFICOS

### ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Gráfico 1	Curvas ponderais de camundongos nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Dados como média± DP - Teste <i>t Student</i> , *p<0,05.	68
Gráfico 2	Curvas ponderais de camundongos do 35º até o 161º dia de vida. NI- Nutrido Infectado, NNI- Nutrido Não Infectado, DI – Desnutrido Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Dados como média± DP - Teste <i>t Student</i>	68
Gráfico 3	Produção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> , segundo os estímulos. LPS – Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> , SEA – Antígeno Solúvel do ovo de <i>S. mansoni</i> , NI – Nutrido Infectado, DI – Desnutrido Infectado. Dados como Média ± Erro Padrão - <i>Mann Whitney</i> .	70
Gráfico 4	Produção de IFN-γ nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> , segundo os estímulos. LPS – Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> , SEA – Antígeno Solúvel do ovo de <i>S. mansoni</i> , NI – Nutrido Infectado, DI – Desnutrido Infectado. Dados como Média ± Erro Padrão - <i>Mann Whitney</i> .	70
Gráfico 5	Contagem de leucócitos totais do sangue cardíaco, segundo os grupos de comparação. NI – Nutrido infectado, DI – Desnutrido Infectado, NNI – Nutrido Não Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Dados como Média ± Erro padrão. <i>Análise de variância ANOVA</i> .	71
Gráfico 6	Contagem diferencial de leucócitos do sangue cardíaco, segundo os grupos de comparação. NI – Nutrido infectado, DI – Desnutrido Infectado, NNI – Nutrido Não Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Dados como Média ± Erro padrão. <i>ANOVA com post-hoc de Tukey</i> .	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Belo Horizonte
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ConA	Concanavalina A
D	Desnutrido
DI	Desnutrido Infectado
DNI	Desnutrido Não Infectado
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
EP	Erro Padrão
g	Gramma
h	Hora
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
Kg	Quilograma
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LM	Linfonodos mesentéricos
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i>
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número de animais por grupo
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
N	Nutrido
NI	Nutrido Infectado
NNI	Nutrido Não Infectado

PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEA	<i>Soluble Egg Antigen</i>
TB	Translocação Bacteriana
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócito T regulatório

## SUMARIO

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>24</b>
2.1 Esquistossomose mansônica	24
2.1.1 Aspectos epidemiológicos	24
2.1.2 Ciclo biológico	26
2.1.3 A doença	28
2.1.4 Resposta imune celular	30
2.1.5 Esquistossomose e desnutrição	36
2.2 Translocação microbiana via TGI	38
<b>3. HIPÓTESES</b>	<b>43</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>44</b>
4.1 Objetivo geral	44
4.2 Objetivos específicos	44
<b>5. METODOLOGIA</b>	<b>45</b>
5.1 Desenho do estudo	45
5.2 Animais e dietas	45
5.3 Formação dos grupos de estudo	48
5.4 Categorização das variáveis	49
5.4.1 Variáveis independentes	49
5.4.2 Variável dependente	50
5.5 Padronização das técnicas	51
5.5.1 Avaliação do peso corporal	51
5.5.2 Obtenção das cercárias e infecção dos camundongos	51
5.5.3 Contagem de ovos	53
5.5.4 Coleta de amostras	54
5.5.5 Estudo da translocação microbiana	55
5.5.6 Estudo imunológico	56
5.5.6.1 Obtenção de antígeno solúvel de ovo – SEA	56
5.5.6.2 Cultura de células esplênicas	57

5.5.6.3 Níveis de citocinas	58
5.5.6.3.1 Níveis de IL-10	58
5.5.6.3.2 Níveis de IFN- $\gamma$	58
5.5.7 Pesquisa de células brancas do sangue	59
5.6 Considerações éticas	59
5.7 Análise estatística	60
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
6.1 Artigo em preparação	61
Resumo	62
Introdução	62
Materiais e Métodos	64
Resultados	68
Discussão	72
Conclusões	78
Agradecimentos	78
Referências	79
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE A - Artigo</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética</b>	<b>118</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

Translocação microbiana tem sido descrita como fenômeno multifatorial. Os fatores estão relacionados às condições físicas do hospedeiro, especialmente estado nutricional e imunológico. Acredita-se que para ocorrer a passagem de micro-organismos e endotoxinas da luz intestinal para a corrente sanguínea haja a necessidade da existência isolada ou conjunto de queda da imunidade do paciente, alteração da microbiota ou quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal (DWINELL *et al.*, 2003; WIEST & RATH, 2003). Embora bem estabelecido que a esquistossomose mansônica provoca, além de alterações no sistema imunológico (SI), danos ao intestino, sistema porta e linfonodos mesentéricos, e que deficiências nutricionais deprimem simultaneamente várias barreiras imunológicas, não há, até o momento, estudos que tragam esclarecimentos a cerca da associação entre translocação microbiana, desnutrição, esquistossomose mansônica e resposta imune.

É comum a associação da esquistossomose com a desnutrição, uma vez que regiões endêmicas são habitadas por populações de baixo padrão socioeconômico (COUTINHO, 2004). Coutinho *et al.* (1992) relatam que a má-absorção protéica ocasionada em camundongos subnutridos é agravada quando os animais são expostos à infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Pesquisas analisando camundongos esquistossomóticos submetidos à dieta hipoproteica, sugerem que deficiências nutricionais podem estar relacionadas com a supressão da resposta imunológica em animais infectados com *S. mansoni* (COUTINHO *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2004; COUTINHO *et al.*, 2007).

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

desde a concepção, não é de se surpreender que a nutrição neonatal tenha um importante impacto sobre parâmetros fisiológicos em fases posteriores da vida.

A desnutrição também tem sido considerada na patogênese da translocação bacteriana (TB). Alguns autores acreditam que desnutrição estaria associada à atrofia da mucosa intestinal, o que ocasionaria um aumento da permeabilidade e uma diminuição das enzimas intestinais, podendo assim contribuir para uma alteração nessa barreira mecânica (RUDLES & LIN, 1998; ULUSOY, 2003), favorecendo o processo de TB. Em adição, Wiest e Rath (2003) apontam que bactéria intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos sem outras condições associadas, o que leva a crer que disfunção imune promove primariamente TB.

Autores já demonstraram que na forma hepatoesplênica da esquistossomose há uma redução drástica da resposta de linfócitos T auxiliares 1 (Th1), passando a existir o predomínio da resposta do tipo Th2 (PEARCE *et al.*, 1991, WILLIAMS *et al.*, 1994), prevalecendo a produção de citocinas relacionadas a esse tipo de resposta, como a IL-10 (PEARCE & MACDONALD, 2002). Esta, ao atuar sobre a resposta Th1 e desviá-la para Th2, se opõe à síntese de IFN- $\gamma$ , importante para a proliferação de células T e a ativação de macrófagos, provocando uma imunodeficiência relativa, o que poderia facilitar a TB.

Poucos trabalhos investigam bacteremia em esquistossomóticos, como consequência da TB. Nishioka *et al.* (1992) relataram um caso de associação de bacteremia por *Serratia marcescens* e esquistossomose mansônica, mas não pensam a possibilidade de translocação. Em estudo de série de casos, Ferraz *et al.* (2005) evidenciaram a prevalência de bactérias aeróbias em linfonodos mesentéricos de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e concluem que a presença destas bactérias, como consequência da TB, pode desempenhar papel no desenvolvimento de complicações infecciosas pós-operatória no grupo de pacientes estudados.

Lima *et al.* (2012), investigando a associação entre esquistossomose mansônica crônica e infecções microbianas como causa de TB em camundongos, sugeriram uma maior ocorrência de TB no grupo de animais esquistossomóticos,

quando comparados ao grupo não infectado. Corroborando, Weber Sobrinho (2012) também evidenciou uma incidência aumentada de TB em animais infectados por *S. mansoni*, verificando ainda uma elevação nos níveis de IL-10 nesses grupos. O conhecimento imunológico acerca do referido tema é escasso, tendo sido abordado apenas por Weber Sobrinho (2012). Sendo assim, mais estudos são necessários para a elucidação do processo, sobretudo em animais com outras condições patológicas associadas, a exemplo da desnutrição.

Diante da existência de lacunas na compreensão de determinadas respostas imunológicas inseridas no processo de TB e esquistossomose, e considerando que o estado nutricional do hospedeiro é tido como um dos prováveis fatores coadjuvantes no agravamento da infecção parasitária (SILVA, 2008), o presente estudo se propõe a contribuir para a elucidação de aspectos imunológicos envolvidos na associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana, avaliando-os em camundongos submetidos ou não à desnutrição neonatal.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 Esquistossomose mansônica

#### 2.1.1 Aspectos epidemiológicos

Entre as parasitoses que afetam o homem, a esquistossomose é uma das mais disseminadas no mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, ocupa o segundo lugar depois da malária, pela sua importância e repercussão sócio-econômica (WHO, 2012).

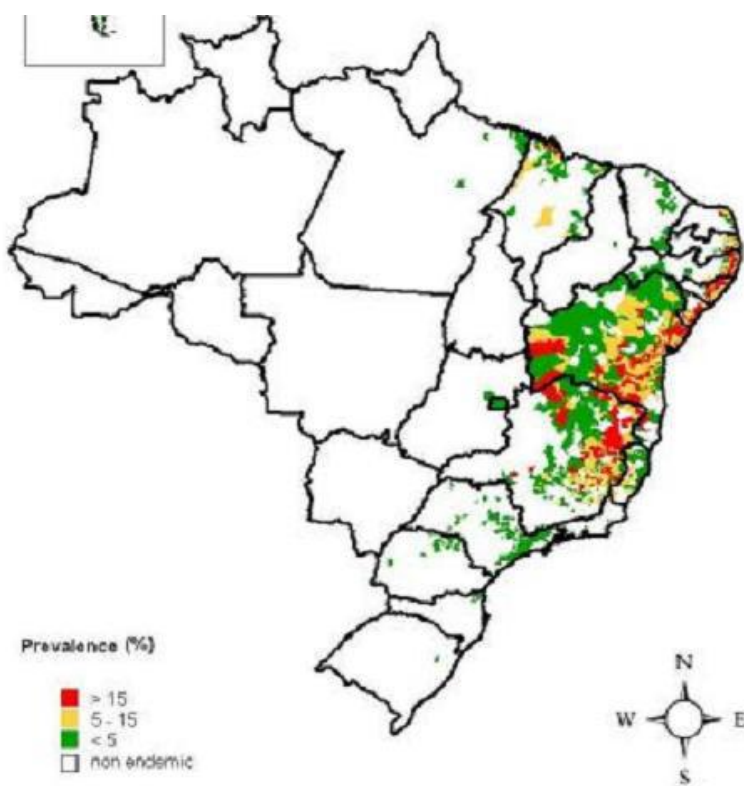
Embora sejam bastante antigas, com registros datados de mais de dois mil anos, ainda hoje as esquistossomoses permanecem como parasitoses de alta prevalência, sendo endêmicas em 76 países. Apesar de sua distribuição geográfica ter mudado ao longo dos anos em função dos programas de controle da doença, o número de pessoas infectadas ou sob risco de adquirir a infecção ainda é muito alto (ENGELS *et al.*, 2002, MS-BRASIL, 2010).

Estima-se que cerca de duzentos milhões de pessoas residentes em áreas com risco de transmissão da esquistossomose estejam infectadas por *Schistosoma mansoni*, que é encontrado em 54 países da África, Ásia e América do Sul. Nas Américas, registra-se área endêmica na Venezuela, nas ilhas do Caribe e no Brasil (WHO, 2012).

No Brasil, em virtude da grande diversidade geográfica, climática, econômica e social que se reflete na imensa variedade de parasitos encontrados no país, a esquistossomose mansônica é uma das endemias parasitárias mais significativas (DOMINGUES & BARRETO, 2001).

Dados do Ministério da Saúde (MS-BRASIL, 2010) estimam que aproximadamente 25 milhões de pessoas que vivem nas zonas rurais e agricultáveis ou nas áreas periféricas de algumas cidades 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 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 (SVS/ MS, 2008) (FIGURA 1).



**Figura 1** - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica. Brasil, 2008. (Fonte: SVS/MS, 2008)

A mortalidade por esquistossomose mansônica, que ocorre principalmente em decorrência das manifestações clínicas da fase crônica da doença, foi demonstrada em estudo realizado por Ferreira e Silva (2007). O estudo analisou os dados obtidos no Brasil entre os anos de 1980 e 2003. Os dados revelaram uma redução de 62,9% na mortalidade no período estudado, porém essa redução não foi uniforme ao longo dos anos, sendo a região Nordeste aquela que concentrou a maior distribuição percentual desses óbitos (62,3%).

Estima-se que Pernambuco possui uma área endêmica para esquistossomose mansônica que corresponde a 17,5% da área total do Estado, onde, apenas no ano de 2006, foram notificados 762 casos da parasitose (BRASIL. S. V. S., 2006). Barbosa *et al.* (2001), utilizando dados da Fundação Nacional de Saúde, constataram que Pernambuco está entre os Estados que exibem prevalência mais elevada (20,5%) de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, apresentando taxas de infecções humanas crescentes, havendo localidades na Zona da Mata, que atingem 80% de indivíduos parasitados com prevalência crônica. Nesse Estado, a doença é historicamente endêmica na região rural, apresentando-se, predominantemente, sob forma crônica, acometendo pessoas de baixa renda e tendo como vetor principal o caramujo *Biomphalaria straminea* (COUTINHO *et al.*, 1997).

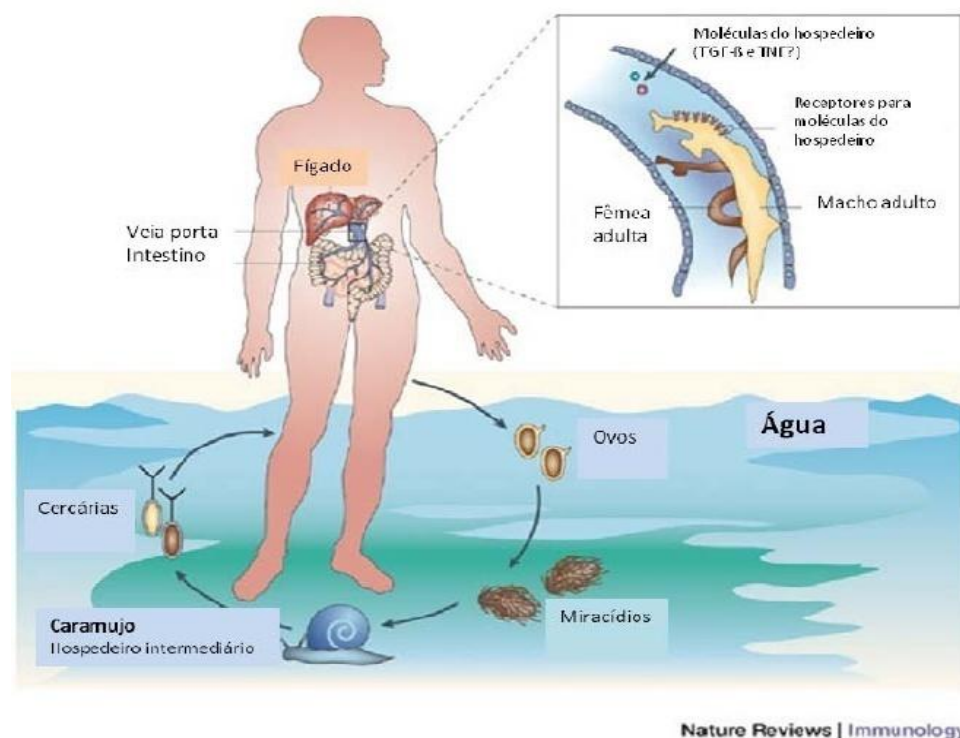
Posteriormente, a esquistossomose gradualmente expandiu-se, devido ao êxodo de trabalhadores rurais para as regiões costeiras do Estado, sendo facilmente encontrada na Região Metropolitana do Recife. Contudo, foram observados sítios de transmissão em regiões de turismo e férias de verão, como Porto de Galinhas, tendo como responsável pela transmissão da doença o caramujo *Biomphalaria glabrata* (BARBOSA *et al.*, 2001).

### 2.1.2 Ciclo biológico

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

Os vermes adultos habitam preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário inferior e as ramificações das veias mesentéricas do hospedeiro vertebrado, especialmente a mesentérica inferior, onde migram para submucosa intestinal, e a fêmea faz a oviposição. Cada fêmea põe, em média, 300-400 ovos/dia, os quais levam cinco dias para amadurecer (REY, 2001; NEVES, 2005).

Parte dos ovos atravessa a parede dos vasos, a lâmina própria do epitélio intestinal, chegando à luz do intestino, em um período de 6 dias, e é eliminada junto com as fezes. No momento em que as fezes entram em contato com coleções de água, os ovos maduros eclodem, liberando o miracídio, que nada ativamente ao encontro do hospedeiro invertebrado. Ao penetrar nas partes moles do caramujo, o miracídio sofre uma reorganização celular, dando origem aos esporocistos, que por poliembrionia, origina os esporocistos-filhos, e estes tem a capacidade de originar outros esporocistos-filhos e cercárias (REY, 2001; KATZ & ALMEIDA, 2003).



**Figura 2** – Ciclo de vida do *S. mansoni*. O esquema mostra as etapas do ciclo no meio aquático, nos hospedeiros intermediário e vertebrado (Fonte: PEARCE & MACDONALD, 2002)

Em condições favoráveis de temperatura, luminosidade e oxigenação da água, cerca de 4-6 semanas após a infecção, os moluscos iniciam a eliminação das cercárias, as quais nadam ativamente e penetram pela pele ou mucosas

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

O ciclo completo ocorre em cerca de 80 dias. No hospedeiro definitivo, a fase sexuada dura, em média, 40 dias e vai desde a penetração das cercarias até a eliminação dos ovos nas fezes. No hospedeiro intermediário, o ciclo é assexuado, e a duração é aproximadamente a mesma da fase sexuada (KATZ & ALMEIDA, 2003)

### **2.1.3 A doença**

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

Na fase aguda, alguns indivíduos se queixam de manifestações pruriginosas na pele, caracterizando a chamada dermatite cercariana, fenômeno decorrente da morte de até metade das cercárias que penetraram na pele. As manifestações clínicas são micropápulas eritematosas e pruriginosas, com intensidade geralmente pequena e duração de cerca de 24-72 horas pós-infecção, podendo estender-se por até 15 dias (LAMBERTUCCI, SILVA & VOIETA, 2005). O desaparecimento dos sinais cutâneos corresponde ao período de incubação, que

pode durar de quatro a oito semanas, quando há o desenvolvimento dos esquistossômulos (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994).

Após quatro a oito semanas, o paciente pode desenvolver febre alta, mal estar, astenia, urticária, tosse, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaléia e diarreia. Em virtude desses sintomas também ocorrerem em várias outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não sugerir o diagnóstico. O exame físico pode detectar abdome distendido e doloroso, com fígado e baço aumentados (REY, 2001). Essas manifestações da fase aguda podem não ser evidenciadas em moradores de áreas endêmicas, que apresentam a forma assintomática da doença (LAMBERTUCCI *et al.*, 2000).

A fase aguda pode durar, em média, trinta a sessenta dias, desaparecendo quando o paciente é submetido a tratamento específico ou podendo evoluir para a fase crônica, caso não haja tratamento (KATZ & ALMEIDA, 2003).

A fase crônica é decorrente principalmente de inflamação eosinofílica e reação granulomatosa, que gradativamente dá lugar a depósitos fibróticos, provocadas pelos ovos que se prendem aos tecidos durante a migração peri-intestinal ou após embolização do fígado, baço, pulmões e sistema cérebro-espinhal (CHEEVER *et al.*, 2000).

A doença resulta da deposição maciça de colágeno nos espaços periportais, induzindo a Fibrose de Symmers. Quando há comprometimento das funções e aumento do volume do fígado e do baço, ocorre a forma hepatoesplênica da doença, na qual são observadas alterações anatômicas, fisiopatológicas e clínicas, resultantes das lesões teciduais provocadas pelos ovos do parasito (MELO & COELHO, 2005). Nessa fase, há pacientes que permanecem na sua forma clínica estacionária ou compensada, conservando um bom estado geral, com sintomatologia de pequena intensidade. Outros, porém, evoluem para as formas mais graves ou descompensadas, apresentando bloqueio da circulação pré-sinusoidal, causados pelo grande número de depósitos fibróticos, o que reduz o fluxo sanguíneo do tecido drenado pela veia porta. O baço aumenta de volume, em grande parte devido à congestão da veia esplênica do sistema porta, bem como devido à hiperplasia das células do sistema macrofágico-linfocitário, com

diferenciação plasmocitária e produção de imunoglobulinas, em virtude da presença de grande quantidade de substâncias antigênicas (REY, 2001).

A doença ainda pode acarretar lesões cardiopulmonares como arteriolite obstrutiva, insuficiência pulmonar direita e hipertensão pulmonar provocada por obstrução vascular induzida pelos ovos, vermes mortos ou imunocomplexos. O depósito de complexos imunes nas áreas mesangiais também pode levar a glomerulonefrite (BARSOUM, 1993). Lesões no aparelho reprodutor de homens e de mulheres também ocorrem em áreas endêmicas, facilitando a transmissão sexual de outras doenças e podendo induzir infertilidade (POGGENSEE & FELDMEIER, 2001). E, lesões do sistema nervoso central e entérico, decorrentes de inflamação ao redor de vermes ou os ovos, localizados ectopicamente, podem envolver danos fibróticos irreversíveis se não forem tratados (FERRARI *et al.*, 2004; ABDU, 2009).

#### **2.1.4 Resposta imune celular**

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

Alguns autores tem demonstrado que diversos mecanismos, dentre eles a resposta de subpopulações T CD4<sup>+</sup> Th1 e Th2, estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da doença ou resistência à infecção/reinfecção pelo *S. mansoni*. (JAMES & SHER, 1990; SMYTHIES *et al.*, 1992; WYNN *et al.*, 1995). O perfil Th1 está relacionado à secreção das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-2), estando envolvida na formação de infiltrado rico em neutrófilos polimorfonucleares, ativação de macrófagos, proteção contra bactérias intracelulares, eliminação de vírus e fungos, além da formação de granulomas. Por outro lado, no perfil Th2 são produzidas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que estão implicadas, essencialmente, nas respostas imunológicas alérgicas, proteção contra

infecções helmínticas, e caracteriza-se por infiltrados ricos em eosinófilos, mastócitos e por aumento da síntese da IgE (STOCKINGER, BOURGEOIS & KASSIOTIS, 2006; ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

O tipo de imunidade encontrada em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* apresenta variações nos perfis Th1/Th2, com a evolução da doença. A resposta imune celular na esquistossomose mansônica pode ser diferenciada em três fases. A primeira abrange o período de três a cinco semanas após a infecção, sendo caracterizada pela exposição do hospedeiro às cercárias e aos esquistossômulos que migram pelo tecido (CHEEVER *et al.*, 2000). Nesta fase, a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1, observando-se a presença de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) produzindo grandes quantidades de fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) e interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (DE JESUS *et al.*, 2002; COURA, 2004). À medida que essas formas imaturas se desenvolvem, copulam e produzem ovos, ocorre uma alteração considerável na resposta imunológica. A resposta que era predominantemente Th1 é substituída pelo predomínio da resposta Th2, induzida principalmente por antígenos do ovo de *S. mansoni*. A então predominante resposta Th2 é a responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 1993; CHEEVER *et al.*, 2000).

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



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

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

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

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

Dados da literatura indicam que a IL-10, ao atuar sobre a resposta Th1 e desviá-la para Th2, se opõe à síntese de IFN- $\gamma$  e IL-2, que são importantes para a proliferação de células T e a ativação de macrófagos. A inibição da síntese dessas citocinas pela IL-10 parece ser indireta, ou seja, ela age sobre as células apresentadoras de antígenos, especialmente monócitos e macrófagos, inibindo a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC classe II) e co-estimulatórias como B7-2, o que resultaria na ausência, ou diminuição, da apresentação dos antígenos e, por conseguinte, falta de ativação celular e ausência na produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (FIORENTINO *et al.* 1989; MOORE *et al.* 1990; FIORENTINO *et al.* 1991).

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

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

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

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

Outro estudo longitudinal, realizado no Quênia, investigou a resposta mediada por células em dois grupos de indivíduos: um de 9 a 13 anos e outro de 14 a 35 anos. A resposta blastogênica e a produção de citocinas foram medidas antes e após o tratamento. Ambos os grupos se reinfetaram depois do tratamento, porém com intensidades diferentes. O grupo mais jovem apresentou intensidade de infecção mais alta, sendo, portanto, denominado suscetível, enquanto o grupo mais velho, com carga parasitária mais baixa, foi considerado

resistente. Observou-se uma correlação inversa entre a resposta de proliferação celular a antígenos de vermes adultos e esquistossômulos, e a subsequente intensidade de reinfecção nos indivíduos mais velhos. Observou-se, ainda, que a citocina IL-5 apresentava-se mais elevada nos indivíduos resistentes, e que ela possuía relação inversa com os níveis de IFN- $\gamma$  (MORVEN *et al.*, 1993).

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

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

### **2.1.5 Esquistossomose e desnutrição**

Apesar do avanço observado na situação da saúde brasileira, representado pelo processo de transição epidemiológica, as doenças infecciosas ainda constituem importante causa de óbito. Dentre os fatores associados ao aumento da susceptibilidade às infecções e à redução da qualidade de vida, encontra-se a desnutrição (BARBOSA-SILVA *et al.*, 2002).

Existe uma relação dinâmica entre doença, imunidade e nutrição. A imunidade do hospedeiro depende da replicação celular e da síntese protéica, 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. Dentre as conseqüências das deficiências nutricionais pode ser citada a diminuição da imunidade humoral e celular, da capacidade bactericida dos fagócitos, da produção de componentes do sistema complemento, do número total de linfócitos, do equilíbrio entre os subtipos de linfócitos T e dos mecanismos inespecíficos de defesa (BRUNETTO *et al.*, 2007).

A desnutrição energético-protéica provoca uma deficiência de calorias e aminoácidos, essenciais na síntese de DNA e RNA, na produção de proteínas de fase aguda e de energia (SAKER, 2004). Essa deficiência leva a um considerável comprometimento do sistema imune, uma vez que as citocinas são constituídas por aminoácidos e a expansão clonal desse sistema depende da síntese protéica (CHANDRA, 1997).

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

A nutrição neonatal é capaz de influenciar o crescimento e desenvolvimento humano, representando um contínuo que se inicia no momento da concepção (MELO, 2007). Sabe-se que um estímulo ambiental ocorrido durante o período crítico de desenvolvimento, tem um efeito subsequente sobre estruturas e funções de sistemas orgânicos. Esse mecanismo foi denominado de “programação” (LUCAS *et al.*, 1999). Efeitos de programação metabólica, induzidos por condições nutricionais alteradas durante o período pós-natal imediato, podem desencadear consequências em longo prazo, na idade adulta do indivíduo (SRINIVASAN & PATEL, 2008).

Em humanos, eventos importantes para a imunocompetência são iniciados ainda no embrião e continuam na primeira semana de vida. Em camundongos, a competência imunológica também é adquirida gradualmente após o nascimento (GOBEL, 1996). Assim, no homem e no camundongo, o início da vida pode ser considerado crítico para o desenvolvimento do sistema imunológico, onde as agressões nutricionais poderão ocasionar comprometimento da resposta imune, com sequelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto (WADE *et al.*, 1983; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005).

Na desnutrição, são comuns os danos causados à imunidade inespecífica, como por exemplo, a perda da integridade das barreiras físicas do epitélio e das mucosas. Isto permite o livre acesso de microrganismos aos órgãos internos e à circulação, podendo, assim, aumentar a suscetibilidade aos agentes infecciosos e a gravidade das infecções (CHANDRA *et al.* 1997; MORGAN, 1997). O complexo desnutrição-infecção pode ser visto sob diferentes aspectos: a desnutrição pode induzir alterações nos mecanismos de defesa do indivíduo; a infecção pode agravar o estado nutricional deficiente, previamente instalado; ou ainda, pode haver desenvolvimento de desnutrição em decorrência da própria doença (BORELLI *et al.*, 1998; BRUNDTLAND, 2000). Desta forma, além da desnutrição facilitar a invasão do agente, favorecendo a sua proliferação no organismo e/ou produção de toxinas, pode também aumentar as chances de uma infecção secundária ao modificar a evolução e prognóstico de uma determinada doença (BRUNDTLAND, 2000; CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005).

Considerando que a má absorção protéica que ocorre em camundongos subnutridos é agravada quando estes animais são expostos à infecção pelo *S. mansoni* (COUTINHO *et al.*, 1992), Coutinho *et al.* (2007), utilizando dois grupos de animais infectados com *S. mansoni*, um alimentado com dieta balanceada (controle) e outro submetido a dieta hipoprotéica, observaram que os animais desnutridos foram incapazes de desenvolver fibrose periportal, enquanto que a lesão ocorreu em 44% dos animais eutróficos. Esses resultados sugerem que o estado nutricional pode estar relacionado com a inibição do desenvolvimento de fibrose periportal nos camundongos desnutridos, provavelmente por suprimir a resposta imunológica nesses animais.

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

## **2.2 Translocação microbiana via TGI**

A alta incidência de infecções sistêmicas em diversas situações de injúria orgânica, aliada à presença de uma microbiota específica para cada tipo de infecção, levou à formação do conceito de translocação microbiana. Atualmente, define-se translocação microbiana como a passagem de micro-organismos viáveis e não viáveis, assim como de seus produtos microbianos como as endotoxinas, através da mucosa e lâmina própria do trato gastrointestinal (TGI) para os linfonodos mesentéricos e outros órgãos (WIEST & RATH, 2003).

Vários estudos em animais têm demonstrado que TB é um fenômeno multifatorial. Acredita-se que para ocorrer a passagem de micro-organismos e endotoxinas da luz intestinal para a corrente sanguínea haja a necessidade da existência isolada ou conjunta de queda da imunidade do paciente, alteração da

microbiota ou quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal (DWINELL *et al.*, 2003; WIEST & RATH, 2003).

A ocorrência de translocação bacteriana para os linfonodos mesentéricos em animais saudáveis foi observada por pesquisadores e tem sido considerada como parte de estimulação normal antigênica do tecido linfóide associado ao intestino, mesmo na ausência de injúria (SCHLEGEL *et al.*, 2000; STEINBERG, 2003). Para BERG (1995), a translocação ocorreria em 3 estágios; no primeiro estágio, a bactéria transporia a mucosa intestinal, alcançando os linfonodos mesentéricos; no segundo estágio, a bactéria migraria dos linfonodos mesentéricos para outros órgãos como fígado, baço, pulmões e rins; e no terceiro e último estágio, a bactéria se disseminaria pela cavidade peritoneal e sangue, provocando quadro septicêmico.

A fisiologia da translocação depende do papel de barreira exercido pela mucosa intestinal, sendo auxiliada pelos componentes do sistema imune celular (enterócitos, macrófagos e linfócitos T) e humoral (IgG, IgM e IgA secretória) (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004). Segundo MACFIE (2004), os fatores que influenciam a prevalência da translocação bacteriana são as alterações na permeabilidade da barreira da mucosa intestinal, a microflora gastrointestinal, o estado imune, e uma miscelânea de fatores que incluem stress, injúria, variação na motilidade intestinal, radiação e determinados tipo de drogas.

A translocação bacteriana pode ser resultado do rompimento do equilíbrio normal da microbiota endógena, o que contribui para um excessivo crescimento de determinadas bactérias. Além disso, o sistema imunológico do hospedeiro debilitado ou a ruptura física da barreira intestinal podem, isoladamente ou em associação, facilitar a translocação de bactérias (NAABER *et al.*, 2000; SCHLEGEL *et al.*, 2000; DWINELL *et al.*, 2003; WIEST & RATH, 2003).

Um outro fator considerado na patogênese da TB tem sido a desnutrição. Alguns autores acreditam que a desnutrição esteja associada à atrofia da mucosa intestinal, o que desencadearia um aumento da permeabilidade e uma diminuição das enzimas intestinais, podendo assim contribuir para uma alteração nessa



barreira mecânica (RUNDLES & LIN, 1998; ULUSOY, 2003) e, consequentemente, predispor à ocorrência de TB.

As bactérias mais comumente encontradas em processos de translocação são bactérias presentes na microbiota intestinal normal, principalmente bacilos Gram negativos aeróbicos e facultativos, bactérias que normalmente colonizam em grande número o intestino (NAABER *et al.*, 2000). Segundo Wiest e Rath (2003), bactérias aeróbicas Gram negativas podem translocar com certa facilidade, até mesmo em indivíduos não injuriados, com enterócitos intactos. Já as bactérias anaeróbicas translocam apenas em situações em que o intestino se encontra estruturalmente danificado. Além disto, estas bactérias formariam um tapete, revestindo a superfície mucosa, impedindo assim a colonização por micróbios potencialmente invasores (JANEWAY *et al.*, 2002).

A barreira celular epitelial intestinal, composta pelas células epiteliais com suas junções intercelulares previne ou limita a entrada de antígenos alimentares e micro-organismos. Existem outros fatores locais que atuam em conjunto com a barreira na defesa contra invasores: IgA, muco, ácido gástrico, enzimas pancreáticas, bile, peptídeos antibacterianos e antifúngicos, motilidade intestinal, criptidinas e defensinas sintetizadas pelas células de Paneth (JANEWAY *et al.*, 2002; DWINELL *et al.*, 2003; WIEST & RATH, 2003).

As secreções mucosas são ricas em imunoglobulina A, que protege a mucosa, previne a aderência e colonização por micro-organismos. As mucinas secretadas pelas células epiteliais criam barreira de gel mucoso que protege contra micróbios invasores, ácidos e toxinas. O transporte ativo de cloretos pela célula promove fluxo líquido intraluminal que lava agentes nocivos. As junções intercelulares entre enterócitos são altamente especializadas, permitem a permeabilidade paracelular, mantêm a adesão intercelular, permitem a comunicação intercelular (junções Gap), porém impedem a passagem de micro-organismos e macromoléculas (WIEST & RATH, 2003).

Dano da barreira mucosa intestinal pode ocorrer devido a diversos fatores, dentre estes podem se destacar choque hemorrágico, choque induzido por endotoxinas, injúria térmica, obstrução intestinal, choque cardiogênico, situações

onde pode ocorrer baixa perfusão dos enterócitos, hipóxia e acidose. A pressão de oxigênio é normalmente baixa no ápice das vilosidades da mucosa intestinal, tornando seus enterócitos particularmente sensíveis à isquemia. Uma diminuição na perfusão poderia levar a um aumento de permeabilidade intestinal, facilitando a translocação bacteriana (BJARNASON *et al.*, 1995; WIEST & RATH, 2003). Isquemia intestinal é um evento comum em injúrias traumáticas ou em qualquer grande cirurgia. Período prolongado de isquemia pode promover prejuízo na função intestinal e uma restauração da perfusão pode levar a uma resposta inflamatória. (GROSSIE JUNIOR *et al.*, 2003).

Diversas células intestinais produzem óxido nítrico. Este participa dos processos fisiológicos do intestino: secreção de muco gastrointestinal; transporte de cloretos e de fluidos; fluxo sanguíneo; atividade motora intestinal; agregação de neutrófilos; eliminação de metabólitos reativos de oxigênio O óxido nítrico é importante na reparação e na permeabilidade da mucosa intestinal. Alteração na sua produção, em situações como endotoxemia, choque hemorrágico, injúria térmica, desnutrição e outros, explicaria dano à barreira intestinal (JANEWAY *et al.*, 2002; MARLETTA & SPIERING, 2003; WIEST & RATH, 2003)

Estudos mostram que bactéria intestinal pode causar doença sistêmica em indivíduos imunodeprimidos, sem outras condições associadas. Isto leva a crer que disfunção imune promove primariamente translocação bacteriana (JANEWAY *et al.*, 2002; WIEST & RATH, 2003). Sistema imunológico debilitado do hospedeiro pode estar associado ao uso de imunossupressores, radioterapia, linfomas, leucemias, endotoxemia, injúria térmica, choque hemorrágico, diabetes, AIDS, má nutrição, doenças parasitárias, entre outros (NAABER *et al.*, 2000; SCHLEGEL *et al.*, 2000).

Mesmo sabendo que a esquistossomose mansônica provoca, além de alterações no sistema imunológico, dano ao intestino, sistema porta e LM, poucos trabalhos na literatura investigam bacteremia em esquistossomóticos, como consequência da TB. Nishioka *et al.* (1992) relataram um caso de associação de bacteremia por *Serratia marsecens* e esquistossomose mansônica, mas não pensam a possibilidade de translocação. Em estudo de série de casos, Ferraz *et*

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

Lima *et al.* (2012), investigando a associação da esquistossomose mansônica e as infecções microbianas como causa de TB em camundongos, sugeriu uma maior ocorrência de TB no grupo de animais esquistossomóticos, quando comparados ao grupo não infectado. Em contra partida, alguns trabalhos demonstram que o aumento dos níveis de imunoglobulinas G e M (IgG e IgM) na forma hepatoesplênica, pode ser, pelo menos parcialmente, responsável pela maior resistência à sepse em portadores de esquistossomose (KELLERMEYER *et al.*, 1973; CAPRON & DESSAINT, 1992).

Diante do observado, o presente trabalho se propõe a estudar a associação entre a translocação bacteriana e a esquistossomose mansônica, avaliando aspectos imunológicos em camundongos esquistossomóticos submetidos ou não à desnutrição neonatal.

### **3. HIPÓTESES**

---

- Em camundongos esquistossomóticos desnutridos ocorre mais translocação bacteriana que em camundongos eutróficos infectados;
- Quanto maiores os níveis de IL-10 produzidos pelas células esplênicas dos camundongos na fase crônica da infecção, mais comum será a translocação bacteriana;
- Quanto menores os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos pelas células esplênicas dos camundongos na fase crônica da infecção, mais comum será a translocação bacteriana.
- Camundongos esquistossomóticos desnutridos produzem maiores níveis de IL-10 e menores de IFN- $\gamma$ , quando comparados a camundongos eutróficos infectados.

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo geral

Investigar associação entre os níveis de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-10) observados no sobrenadante da cultura de células esplênicas e a ocorrência de translocação bacteriana via trato gastrointestinal, em camundongos *Swiss webster* desnutridos no período de lactação infectados por *S. mansoni* quando comparados aos infectados eutróficos.

### 4.2 Objetivos específicos

- ♦ Verificar a ocorrência de translocação microbiana via TGI em camundongos infectados ou não pelo *S. mansoni*, submetidos ou não à desnutrição.
- ♦ Verificar os níveis de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-10) observados no sobrenadante da cultura de células esplênicas em camundongos desnutridos e eutróficos infectados pelo *S. mansoni*.
- ♦ Verificar e comparar associação entre os níveis de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-10) observados no sobrenadante da cultura de células esplênicas e a ocorrência de translocação microbiana via TGI, em camundongos desnutridos e eutróficos, infectados pelo *S. mansoni*.
- ♦ Verificar e comparar a contagem total e diferencial de células brancas por mm<sup>3</sup>/sangue em camundongos infectados ou não pelo *S. mansoni*, submetidos ou não à desnutrição.

## 5. METODOLOGIA

---

### 5.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental, com características de um estudo de intervenção, no qual o camundongo foi utilizado como modelo de hospedeiro vertebrado para esquistossomose mansônica na fase crônica. O grupo experimental foi especialmente criado, sendo composto por camundongos infectados pelo *S. mansoni*, submetidos ou não à desnutrição neonatal, para ser comparado a um grupo não infectado, submetido ou não à desnutrição neonatal. Os animais para o estudo não foram randomizados, pois foram criados nas mesmas condições ambientais e alimentares. Desta forma, qualquer diferença existente entre os grupos deve ser atribuída à intervenção avaliada.

### 5.2 Animais e dietas

Para execução do estudo, foram utilizados 32 camundongos fêmeas, da linhagem *Swiss webster*, cedidos pelo Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)/ UFPE.

Estudos experimentais de esquistossomose em camundongos, sobretudo os de base imunológica, são, em sua maioria, realizados com animais do mesmo sexo, geralmente fêmeas. Verifica-se, de maneira geral, que as fêmeas desenvolvem resposta imune celular e humoral de maior intensidade, com fisiopatologia elevada (tal como tamanho do baço e do fígado), quando comparadas a animais machos (ELOI-SANTOS *et al.* 1992). Além disso, estudos com *S. mansoni* demonstram uma maior susceptibilidade das fêmeas para o desenvolvimento de vermes adultos, resultando em carga parasitária mais elevada que em machos, quando expostos a mesma quantidade de cercárias (ELOI-SANTOS *et al.* 1992).

Os animais foram obtidos acasalando-se machos e fêmeas, com idade entre 90 e 120 dias, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16

dias. O diagnóstico da prenhez foi realizado pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes por mãe, número confere maior potencial lactotrófico. Neste mesmo dia, adotado como primeiro dia de vida do animal, as ninhadas foram divididas em dois grupos:

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

INGREDIENTES	CASEÍNA A 17%	CASEÍNA A 8%
Amido de Milho	41,01%	48,51%
Caseína	18,89%	8,89%
Amido dextrinizado	13,05%	16,65%
Sacarose	10%	12,1%
Oleo de Soja	7%	4%
Celulose Microcristalina	5%	5%
Mix Mineral AIN 93 G	3,5%	3,5%
Mix Vit AIN 93	1%	1%
L Cistina	0,3%	0,1%
BHT	0,0014%	0,0008%
Bitartarato de Colina	0,25%	0,25%

**TABELA 1** - Composição das dietas Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação dos animais (Fonte: AIN93G - PragSoluções biociências®)

Os animais de ambos os grupos foram amamentados durante os primeiros 21 dias após o nascimento (período de aleitamento). A partir do 22º dia de vida

(desmame), os filhotes foram separados de suas mães, passando a consumir Labina®, dieta padrão do biotério (Tabela 2), até o final dos experimentos.

Enriquecimento		Enriquecimento		Níveis de garantia (%)	
<b>Vitamina A</b>	20000UI	<b>Piridoxina</b>	6mg	<b>Umidade (máx)</b>	13
<b>Vitamina D3</b>	6000UI	<b>Biotina</b>	0,1mg	<b>Proteína (min)</b>	23
<b>Vitamina E</b>	30UI	<b>Colina</b>	2000mg	<b>Extrato Etéreo</b>	2,5
<b>Vitamina K</b>	6mg	<b>Manganês</b>	50mg	<b>Matéria Fibrosa (máx)</b>	9,0
<b>Vitamina B12</b>	10mg	<b>Iodo</b>	2mg	<b>Matéria Mineral (máx)</b>	8,0
<b>Vitamina B2</b>	8mg	<b>Ferro</b>	65mg	<b>Cálcio (máx)</b>	1.8
<b>Pantetonato de Cálcio</b>	24 mg	<b>Zinco</b>	35mg	<b>Fósforo (min)</b>	0,0
<b>Niacina</b>	95mg	<b>Cobre</b>	26mg		
<b>Tiamina</b>	4mg	<b>Antioxidante</b>	100mg		
<b>Ácido Fólico</b>	0,5mg				

**TABELA 2** - Composição da dieta padrão Labina® (Purina do Brasil) utilizada na alimentação dos animais (Fonte: Agribandas do Brasil Ltda).

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

Os animais foram mantidos em uma mesma sala e em condições ambientais similares, alojados em gaiolas especiais, camas de maravalha (anteriormente autoclavada), com livre acesso à ração para camundongos e água estéril *ad libitum* (FIGURA 3).



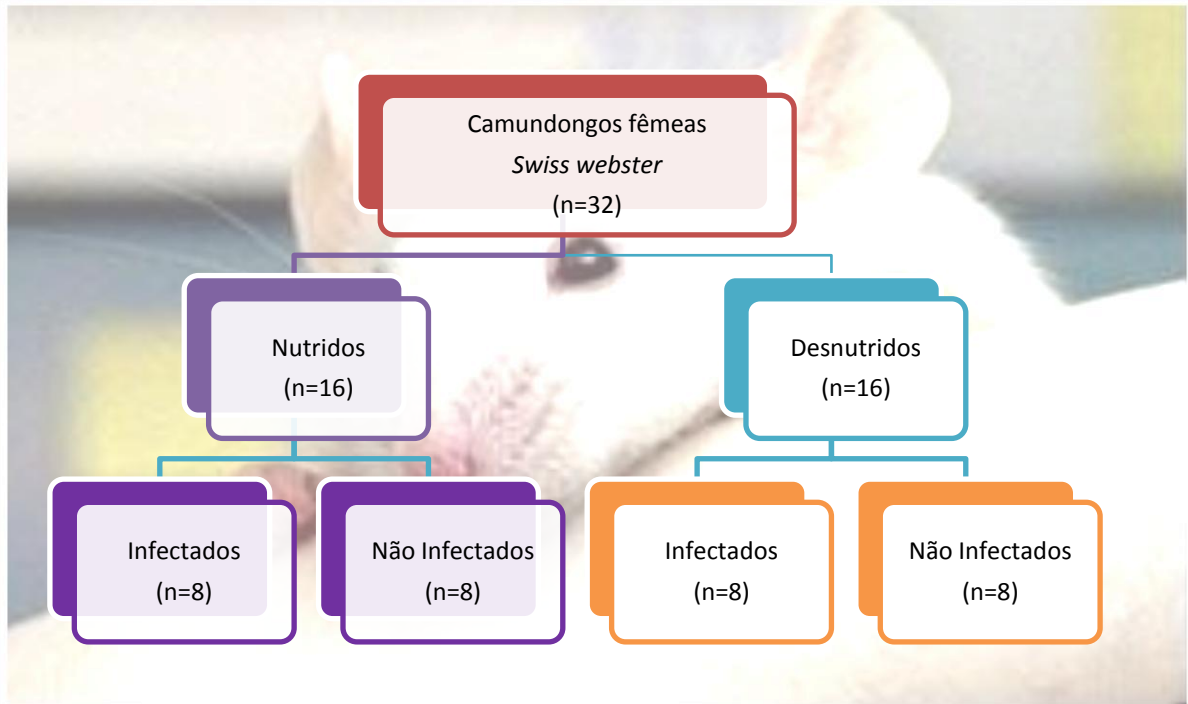


**FIGURA 3 - A.** Camundongos *Swiss webster*. **B.** Gaiolas de camundongos, com cama de maravalha, ração Labina® e bebedouro, alojadas no Biotério do LIKA/UFPE.

### 5.3 Formação dos grupos de estudo

Foram utilizados 32 camundongos, dos quais 16 foram submetidos à desnutrição neonatal. Destes, 8 animais de cada grupo (nutrido e desnutrido) foram infectados com cercárias de *S. mansoni*, constituindo assim os seguintes grupos:

- **NI** – Nutrido infectado
- **NN** – Nutrido não infectado
- **DI** – Desnutrido infectado
- **DN** – Desnutrido não infectado



**Figura 4** – Distribuição de grupos de camundongos submetidos aos estudos.

## 5.4 Categorização das variáveis

### 5.4.1 Variáveis independentes

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

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interleucina da resposta Th1, importante para proliferação de células T e ativação de macrófagos	Nível de citocina observado no sobrenadante da cultura de células esplênicas dos camundongos	Média $\pm$ EP
<b>IL-10</b>	Interleucina da resposta Th2, observada na fase crônica da infecção pela esquistossomose	Nível de interleucina observado no sobrenadante da cultura de células esplênicas dos camundongos	Média $\pm$ EP
<b>Células brancas do sangue</b>	Neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos do sangue	Contagem total e diferencial de células brancas/mm <sup>3</sup> de sangue	Média $\pm$ EP

#### 5.4.2 Variável dependente

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

## 5.5 Padronização das técnicas

### 5.5.1 Avaliação do peso corporal

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

### 5.5.2 Obtenção das cercárias e infecção dos camundongos

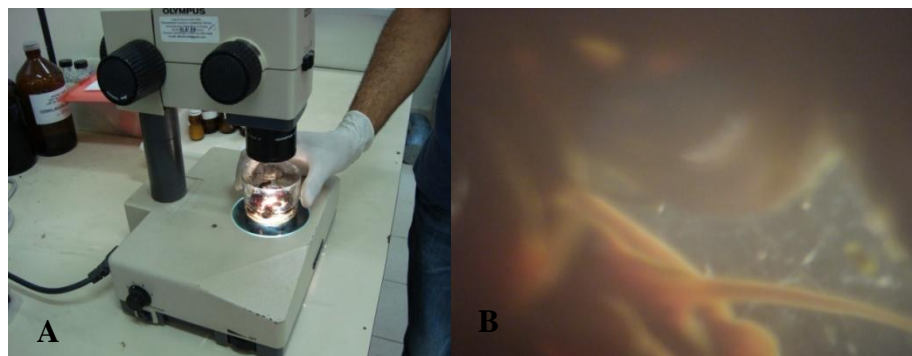
Para infecção dos camundongos, foram utilizadas cercárias, da cepa Belo Horizonte (BH), obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário do Setor de Parasitologia, Departamento de Medicina Tropical, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os caramujos foram anteriormente postos em contato com miracídios, segundo Standen (1952), permanecendo exposto à luz e ao calor por aproximadamente duas horas. Após infecção, os moluscos foram postos em aquários com água desclorada e livres de exposição luminosa. De acordo com Olivier e STirewalt (1952), após 30 dias de infecção os moluscos da espécie *B. glabrata* em meio aquático e sob exposição à luz artificial, têm a capacidade de eliminar cercárias através de seus tecidos moles (FIGURA 5).

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



**FIGURA 5** - Moluscos da espécie *B. glabrata* infectados, em meio aquático e sob exposição à luz artificial.



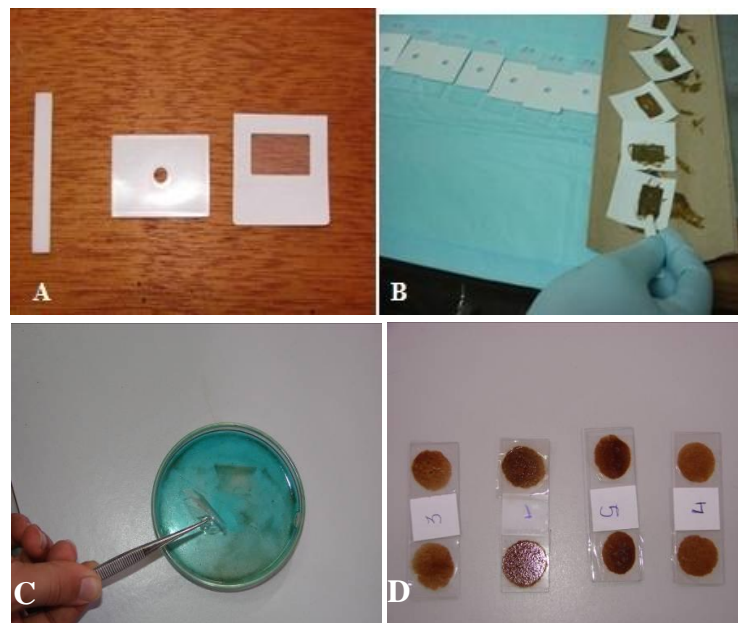
**FIGURA 6** – **A.** Obtenção da suspensão cercariana. **B.** Cercária liberada pelo molusco e observada com auxílio da microscopia óptica (20X) (LIMA, 2011).



**FIGURA 7** - Camundongos anestesiados e expostos à suspensão cercariana, por via percutânea, e luz artificial.

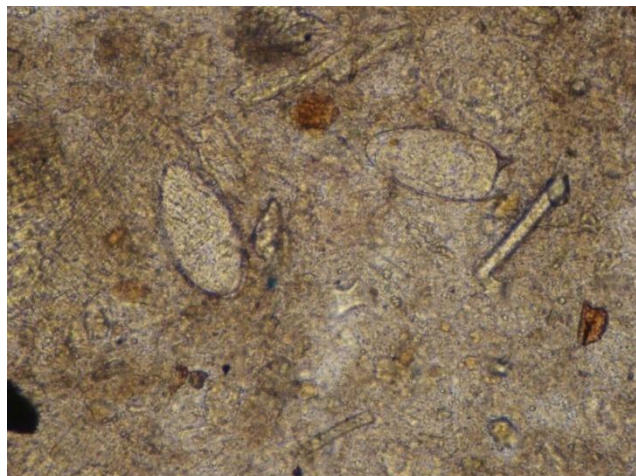
### 5.5.3 Contagem de ovos

Após 45-50 dias de infecção, os camundongos infectados foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram confeccionadas duas lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de Kato-Katz (KATZ, CHAVES & PELLEGRINO, 1972) para quantificação do número de ovos por grama de fezes e determinação da infecção (FIGURAS 8 e 9).



**FIGURA 8** – Método de Kato-Katz. **A.** Helm-test®, **B.** Recolhimento das fezes que passam pela malha, **C.** Papel de celofane emergido em solução verde malaquita a 3%, **D.** Lâminas preparadas (LIMA, 2011).





**FIGURA 9** – Observação de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método Kato-Katz (LIMA, 2011).

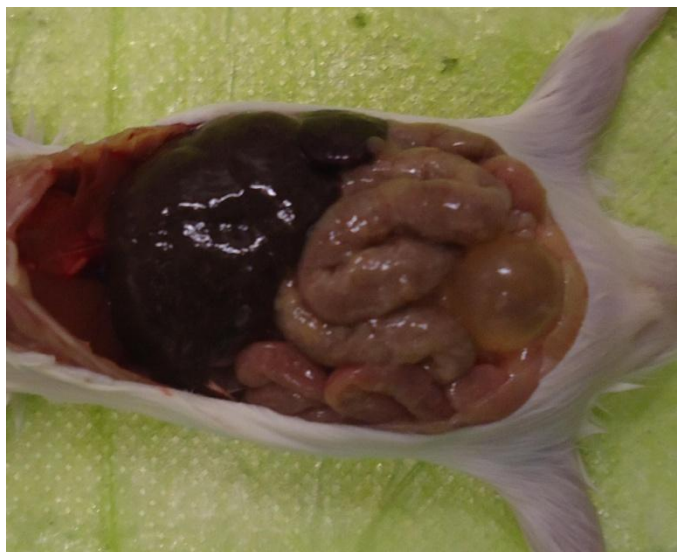
#### **5.5.4 Coleta de amostras**

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

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

Posteriormente, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi realizada incisão mediana xifo pubiana com auxílio de tesoura cirúrgica (FIGURA 10). Em seguida, coletou-se o baço, fragmentos do fígado, sangue porta, linfonodos mesentéricos na região média do intestino delgado e as fezes nesta região para cultura microbiológica. O baço foi imediatamente levado à capela de

fluxo laminar, onde retirou-se fragmentos para a cultura microbiológica e o restante foi destinado ao estudo da resposta imune celular.



**FIGURA 10** - Incisão mediana xifo pubiana realizada nos camundongos para coleta de amostras biológicas.

#### **5.5.5 Estudo da translocação microbiana**

Todo material coletado foi submetido ao cultivo para verificação de crescimento de micro-organismos. As amostras de sangue portal (0,1ml) e periférica (0,1ml), baço, fígado e linfonodos mesentéricos foram inoculadas e homogenizadas em frascos contendo 0,9ml de BHI (Brain Heart Infusion - Himedia®) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 a 72 horas.

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

As amostras foram semeadas em meios de cultura Ágar sangue e Ágar EMB - Levine para o crescimento bactérias aeróbias gram-positivas e gram-negativas. Após crescimento (24 a 48 horas em estufa a 37°C), testes bioquímicos convencionais foram utilizados para confirmação da identificação de bactérias Gram negativas (NEWPROV®). Para gram-positivas, foram utilizados o teste de



catalase, CAMP, *Staphy-test* (teste rápido para caracterização de *Staphylococcus aureus*) (PROBAC DO BRASIL®), bileculina e discos de antibióticos para confirmação da identificação, novobiocina, optoquina e bacitracina.

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

## **5.5.6 Estudo imunológico**

### **5.5.6.1 Obtenção de antígeno solúvel de ovo – SEA**

Para obtenção desse antígeno, segundo Gazzinelli *et al.* (1983), foi utilizado um grupo extra de camundongos albinos Swiss outbred que não participaram das demais etapas do estudo. Esses animais foram infectados (via percutânea) com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni* e perfundidos 60 dias após a infecção. Em seguida, os fígados foram removidos, segmentados e embebidos em solução salina a 1,7% por 24 h a 4°C. Após esse período, foram submetidos a banho-maria por 2 h a 37°C. Posteriormente, os fígados foram triturados (em liquidificador comum) por 5 min e a suspensão filtrada uma vez em malha de 180 µm e uma segunda vez em malha de 130 µm. O material filtrado foi distribuído em cálices de sedimentação por 2 h, para decantação. O sedimento foi depositado em tubos Falcon de 50 mL e submetido a cinco centrifugações (200 x g) de 5 min a 4°C. O sobrenadante foi, então, desprezado, o precipitado ressuspensionado em 10 mL de salina 1,7% e congelado até a próxima etapa.

Posteriormente, descongelou-se a solução de salina 1,7% contendo o sedimento no gelo. Após o descongelamento total, a solução foi centrifugada uma vez durante 3 min com 1500 rpm em temperatura 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e macerou-se manualmente o precipitado contendo os ovos obtidos dos fígados de camundongos em N<sub>2</sub> líquido, utilizando cadinho e pistilo. O material macerado foi submetido a uma ultracentrifugação de 100.000 x g

(aproximadamente 30.000 rpm) por 2h a 4 ° C, e o sobrenadante foi recuperado (SEA).

Os antígenos obtidos foram dosados através do método de Bradford (1976) e seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% na presença de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS PAGE), de acordo com Laemmli (1970) e corados pelo Comassie Blue.

Esse antígeno, SEA, foi utilizado na etapa de estimulação de células esplênicas, descrita abaixo:

#### **5.5.6.2 Cultura de células esplênicas**

Em condições estéreis, os animais de cada grupo foram eutanasiados, sendo os baços removidos para obtenção de células destinadas ao estudo da resposta imune celular durante a fase crônica da esquistossomose. As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços em meio RPMI 1640 (Invitrogen®) acrescido de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina a 1%) e aminoácido (1% de L-glutamina), e centrifugadas por 5 min a 300 x g a 4°C. As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, durante 18s. As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal -WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro - Brasil) e a viabilidade observada pelo emprego de Trypan Blue a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços, em duplicata, na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/0,5mL e submetidas a diferentes estímulos [SEA – 20 µg/mL, Concanavalina A (ConA) – 500 µg/mL ou Lipopolissacarídeo (LPS) – 5 µg/mL] ou simplesmente meio de cultura (sem estímulo), e então, cultivadas por 48h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. As culturas sem estímulo (apenas com meio de cultura) foram utilizadas como controle interno negativo. Ao mesmo tempo, foram utilizadas como controle positivo as culturas estimuladas com o mitógeno (ConA) onde será avaliada a capacidade imunoproliferativa dos esplenócitos.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos, e os sobrenadantes coletados, armazenados em tubos devidamente identificados e mantidos a -20°C até o momento das dosagens.

#### **5.5.6.3 Níveis de citocinas**

Os níveis de citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  presentes no sobrenadante das células esplênicas dos camundongos foram dosadas através de ensaio imunoenzimático, utilizando-se os kits comerciais Quantikine® ELISA mouse IL-10 e Quantikine® ELISA mouse IFN- $\gamma$  (R&D systems®), conforme instruções do fabricante.

##### **5.5.6.3.1 Níveis de IL-10**

Todos os reagentes foram preparados e levados à temperatura ambiente. Foram adicionados 50  $\mu$ L de Assay Diluent RD1-14 a cada poço da placa sensibilizada com anticorpo anti-IL-10. Posteriormente foram adicionados 50  $\mu$ L de solução controle, padrão ou amostras de sobrenadante a cada poço. A placa foi coberta com adesivo apropriado e incubada por 2h à temperatura ambiente. Após 2h de incubação, os poços foram aspirados e lavados com Wash Buffer (400  $\mu$ L) 5 vezes. Após as lavagens, a placa foi seca contra papel toalha. Adicionou-se então 100  $\mu$ L de mouse IL-10 Conjugate a cada poço, cobriu-se a placa com adesivo e incubou-se por 2h. Após o período, repetiu-se o procedimento das 5 lavagens com Wash Buffer e secagem da placa contra papel toalha. Foram adicionados 100  $\mu$ L de Substrate Solution a cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. Após 30 minutos, foram acrescentados 100  $\mu$ L de Stop Solution. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo plate leitora de microplacas – TP Reader®) em comprimento de onda de 450 nm.

##### **5.5.6.3.2 Níveis de IFN- $\gamma$**

Todos os reagentes foram preparados e levados à temperatura ambiente. Foram adicionados 50  $\mu$ L de Assay Diluent RD1-21 a cada poço da placa

sensibilizada com anticorpo anti- IFN- $\gamma$ . Posteriormente foram adicionados 50  $\mu$ L de solução controle, padrão ou amostras de sobrenadante a cada poço. A placa foi coberta com adesivo apropriado e incubada por 2h à temperatura ambiente. Após 2h de incubação, os poços foram aspirados e lavados com Wash Buffer (400  $\mu$ L) 5 vezes. Após as lavagens, a placa foi seca contra papel toalha. Adicionou-se então 100  $\mu$ L de mouse IFN- $\gamma$  Conjugate a cada poço, cobriu-se a placa com adesivo e incubou-se por 2h. Após o período, repetiu-se o procedimento das 5 lavagens com Wash Buffer e secagem da placa contra papel toalha. Foram adicionados 100  $\mu$ L de Substrate Solution a cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. Após 30 minutos, foram acrescentados 100  $\mu$ L de Stop Solution. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Thermo plate leitora de microplacas – TP Reader®) em comprimento de onda de 450 nm.

#### **5.5.7 Pesquisa de células brancas do sangue**

Para pesquisa de células brancas foi utilizado o sangue cardíaco. O sangue extraído foi depositado em tubo previamente acrescido de uma gota (20  $\mu$ l) do anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA. Os dados dos leucócitos totais foram automatizados e o número de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos foi determinado a partir da avaliação de lâminas de esfregaço sangüíneo. O número absoluto de cada célula foi determinado em relação à global de leucócitos a partir da sua porcentagem encontrada em cem leucócitos contados no corpo de cada lâmina.

#### **5.6 Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife-PE (processo nº 23076.017352/2012-68)

Todos os procedimentos descritos para utilização dos animais foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA) e pelas normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

## **5.7 Análise estatística**

Para análise comparativa das variáveis quantitativas foram aplicados os testes t de Student, Mann-Whitney ou Análise de variância ANOVA. Os resultados da evolução ponderal foram expressos por Média  $\pm$  Desvio Padrão. Os dados das contagens de leucócitos e produção de citocinas foram representados por Média  $\pm$  Erro Padrão. Para a análise das variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-quadrado. A significância estatística foi considerada ao nível de  $p < 0,05$ . O software utilizado para as análises foi o SigmaStat® 2.0.

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1 Artigo em preparação



#### Parasitology Research

Associação entre esquistossomose mansônica crônica e translocação bacteriana: Níveis de citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  e perfil leucocitário em camundongos adultos submetidos à desnutrição neonatal

**Danielly Cantarelli de Oliveira** - Pós-Graduação em Medicina Tropical. Universidade Federal de Pernambuco. Rua Menezes Drumond, 293, Apt 302, Madalena, CEP: 50610-320, Recife, PE, Brasil. Responsável pelo projeto de pesquisa, execução da investigação, análise dos dados, escrita e formatação do artigo.

**Bruno Henrique Andrade Galvão** - Pós-Graduação em Medicina Tropical. Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50810-020, Recife, PE, Brasil.

**Carlos Andre Laranjeira Miranda Filho** - Setor de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA/UFPE. Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

**André de Lima Aires** - Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50810-020, Recife, PE, Brasil.

**Vláudia Maria Assis Costa** - Pós-graduação em Medicina Tropical, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

**Célia Maria Machado Barbosa de Castro** - Pós-graduação em Medicina Tropical e Nutrição. Setor de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA/UFPE. Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

#### Autor de correspondência:

**Danielly Cantarelli de Oliveira** – Rua Menezes Drumond, 293, Apt 302, Madalena, CEP: 50610-320, Recife, PE, Brasil. [danielly\\_cantarelli@hotmail.com](mailto:danielly_cantarelli@hotmail.com)

Este trabalho foi financiado pela UFPE and D. C. Oliveira recebeu recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## **Resumo**

Estudos sugerem que deficiências nutricionais podem estar relacionadas com a supressão da resposta imunológica em animais infectados por *S. mansoni*, sendo, portanto, capazes de favorecer translocação bacteriana (TB). O presente trabalho avaliou aspectos imunológicos da associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana, em camundongos desnutridos no período neonatal. Camundongos fêmeas formaram os grupos Nutrido Infectado (NI), Nutrido Não Infectado (NNI), Desnutrido Infectado (DI) e Desnutrido Não Infectado (DNI). Analisou-se o peso corporal (PC), as contagens total (CT) e diferencial de leucócitos, a ocorrência de TB e os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10. Os animais desnutridos obtiveram um menor ganho de PC que os nutridos. Verificou-se um maior índice de TB nos animais infectados. Entre os infectados, houve tendência a uma maior incidência de TB nos desnutridos, contudo, a diferença não foi significativa. Observou-se uma menor produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 no grupo DI, comparado ao NI. A CT de leucócitos mostrou-se elevada nos grupos DI e NI. Os números de neutrófilos e monócitos foram maiores nos animais infectados. Os valores de linfócitos mostraram-se aumentados no grupo DI, comparado ao DNI. Pode-se concluir que a desnutrição modifica a resposta imune e parece favorecer translocação bacteriana em camundongos infectados por *S. mansoni*.

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

## **Introdução**

Denomina-se translocação microbiana a passagem de micro-organismos viáveis e/ou endotoxinas através da mucosa e lâmina própria do trato digestivo para os linfonodos mesentéricos e outros órgãos (Wiest and Rath 2003). Acredita-se que a translocação seja um fenômeno multifatorial, cujos fatores predisponentes estão relacionados às condições físicas do hospedeiro, especialmente estado nutricional e imunológico. Para que ocorra, é necessário

haver queda da imunidade do paciente, alteração da microbiota ou quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal, isoladamente ou em conjunto (Dwinell et al. 2003; Wiest and Rath 2003).

Pacientes com esquistossomose mansônica apresentam, além de alterações no sistema imunológico (SI), danos ao intestino, sistema porta e linfonodos mesentéricos, situações favorecedoras de translocação. Em estudo de série de casos, Ferraz et al. (2005) evidenciaram a prevalência de bactérias aeróbias em linfonodos mesentéricos de pacientes com esquistossomose hepatoesplênica e concluem que a presença destas bactérias poderia estar associada à translocação, conseqüentemente, desempenharia papel no surgimento de complicações infecciosas pós-operatória. Lima et al. (2012), investigando a associação entre esquistossomose mansônica crônica e infecções microbianas em camundongos, sugeriram uma maior ocorrência de translocação bacteriana (TB) na presença da doença. Corroborando, Weber Sobrinho (2012) também evidenciou uma incidência aumentada de TB em animais infectados por *Schistosoma mansoni*.

Juntamente à infecção esquistossomótica, outros parâmetros podem afetar as respostas imunológicas e favorecer TB. Entre eles, a desnutrição energético/protéica, implicada em alterações fisiológicas e metabólicas (Santhiago et al. 2006), principalmente se imposta no período de lactação, quando pode ser um agente estressor indutor de alterações tardias na função imune (Queiros-Santos 2000). Deficiências nutricionais provavelmente relacionam-se com a supressão da resposta imunológica em animais infectados com *S. mansoni* (Coutinho et al. 2007). Em adição, autores acreditam que desnutrição esteja associada à atrofia da mucosa intestinal, ocasionando aumento da permeabilidade e diminuição das enzimas intestinais, contribuindo para uma alteração nessa barreira mecânica (Rudles and Lin 1998, Ulusoy et al. 2003), podendo beneficiar o processo de translocação.

Desta forma, o presente estudo objetivou analisar aspectos imunológicos da associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana, em camundongos desnutridos precocemente.



## Materiais e Métodos

### Animais e dietas

Foram utilizados 32 camundongos, fêmeas, da linhagem *Swiss webster*, provenientes da colônia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12/12 horas). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) e segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA).

Até 24 horas após o nascimento, os animais foram divididos em dois grupos, de acordo com a alimentação materna: Nutrido (N) (n=16) (caseína 17%) e Desnutrido (D) (n= 16) (caseína 8%) (Tabela1). As mães receberam água e ração *ad libitum*. Após o desmame (22º dia de vida), os animais de ambos os grupos passaram a ser alimentados com dieta labina (purina®), para reposição nutricional, até o final dos experimentos.

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

INGREDIENTES	CASEÍNA A 17%	CASEÍNA A 8%
Amido de Milho	41,01%	48,51%
Caseína	18,89%	8,89%
Amido dextrinizado	13,05%	16,65%
Sacarose	10%	12,1%
Oleo de Soja	7%	4%
Celulose Microcristalina	5%	5%
Mix Mineral AIN 93 G	3,5%	3,5%
Mix Vit AIN 93	1%	1%
L Cistina	0,3%	0,1%
BHT	0,0014%	0,0008%
Bitartarato de Colina	0,25%	0,25%

**Tabela 1** - Composição das dietas Caseína a 8% e a 17%, utilizada na alimentação dos animais (AIN93-G PragSoluções biociências®)

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

A infecção foi realizada no trigésimo quinto dia de vida do animal, por via percutânea. Os camundongos foram postos em contato com aproximadamente 30 cercárias, da cepa Belo Horizonte (BH), obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata* mantidos pelo Setor de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical (UFPE). A confirmação da infecção foi realizada após 45 dias, pelo método Kato-Katz.

Foram infectados 8 animais de cada grupo (N e D), constituindo-se os subgrupos: Nutrido Infectado (NI), Nutrido Não Infectado (NNI), Desnutrido Infectado (DI) e Desnutrido Não Infectado (NNI).

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

### **Avaliação da translocação bacteriana**

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

Em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e realizou-se, após tricotomia e antissepsia, incisão mediana xifo pubiana com auxílio de tesoura cirúrgica. Coletou-se o baço, fragmentos do fígado, sangue porta, linfonodos mesentéricos e fezes da região média do intestino delgado.

O baço foi imediatamente levado à capela de fluxo laminar, onde retirou-se fragmentos para a cultura microbiológica e o restante foi destinado ao estudo da resposta imune celular. Os Fragmentos do baço, fígado e linfonodos mesentéricos foram macerados, homogeneizados separadamente em placas de Petri estéreis, inoculados, assim como o sangue periférico e portal, em frascos contendo BHI

(Brain Heart Infusion - Himedia®) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 a 72h.

As amostras de fezes foram misturadas na mesma quantidade de solução salina 0,9% estéril, homogeneizadas e cultivadas em placas de Petri contendo meios de cultivo.

Todo material coletado foi submetido a meios de cultura para o crescimento de bactérias aeróbias gram-positivas e gram-negativas (Ágar sangue e Ágar EMB Levine - Himedia®). Após crescimento (24 a 48 horas em estufa a 37°C), foram utilizados testes bioquímicos convencionais para identificação da bactéria.

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

### **Avaliação da produção de citocinas**

Foram obtidas suspensões de células esplênicas por maceração do baço em meio RPMI 1640 (Invitrogen®) acrescido de antibióticos (Penicilina e Streptomomicina a 1%) e aminoácido (1% de L-glutamina), e centrifugadas por 5 min, a 1500 RPM, sob 4°C. As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, durante 18s. As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Imunoquímica®) e a viabilidade observada pelo emprego de Trypan Blue a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura com 48 poços, em duplicata, na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/0,5mL e submetidas a diferentes estímulos [SEA – 20 µg/mL, Concanavalina A (ConA) – 500 µg/mL ou Lipopolissacarídeo (LPS) – 5 µg/mL] ou simplesmente meio de cultura (sem estímulo), e então, cultivadas por 48h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. As culturas sem estímulo foram utilizadas como controle interno negativo e, como controle positivo, foram utilizadas as culturas estimuladas com o mitógeno (ConA).

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a 1500 RPM por 10 minutos, e os sobrenadantes coletados e armazenados em tubos devidamente identificados.

Os níveis de citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  presentes no sobrenadante das culturas dos esplenócitos foram dosadas através de ensaio imunoenzimático, utilizando-se os kits comerciais Quantikine® ELISA mouse IL-10 e Quantikine® ELISA mouse IFN- $\gamma$  (R&D systems®), conforme instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA (Thermo plate leitora de microplacas – TP Reader®), utilizando-se comprimento de onda de 450 nm.

### **Pesquisa de células brancas do sangue**

Para pesquisa de células brancas, foi obtido sangue através de punção cardíaca. A coleta foi realizada com os animais anestesiados, no momento anterior às eutanásias. O sangue extraído foi depositado em tubo previamente acrescido de uma gota (20  $\mu$ l) do anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA. Os dados dos leucócitos totais foram automatizados e o número de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos foi determinado a partir da avaliação de lâminas de esfregaço sangüíneo. O número absoluto de cada célula foi determinado em relação à global de leucócitos a partir da sua porcentagem encontrada em cem leucócitos contados no corpo de cada lâmina.

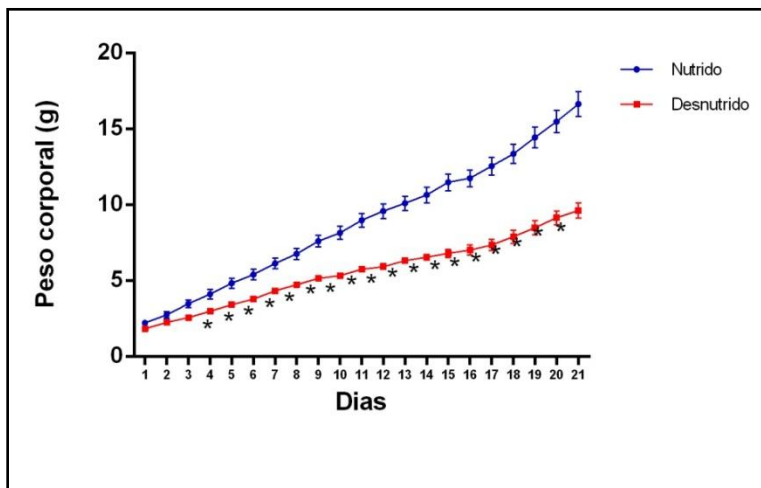
### **Análise estatística**

Para análise comparativa das variáveis quantitativas foram aplicados os testes t de Student, Mann-Whitney ou Análise de variância ANOVA. Os resultados da evolução ponderal foram expressos por Média  $\pm$  Desvio Padrão. Os dados da produção de citocinas e contagem de leucócitos foram representados por Média  $\pm$  Erro Padrão. Para a análise das variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-quadrado. A significância estatística foi considerada ao nível de  $p < 0,05$ . O software utilizado para as análises foi o SigmaStat® 2.0.

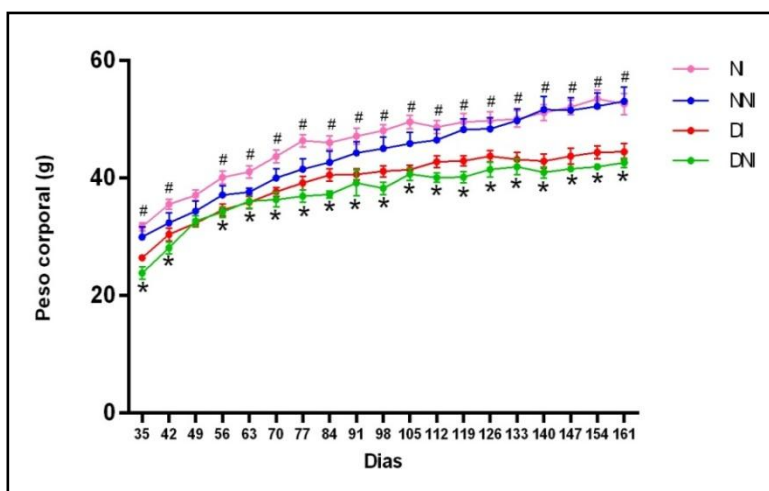
### **Resultados**

A avaliação da evolução ponderal revelou que os animais desnutridos apresentaram um menor ganho de peso corporal em relação aos eutróficos a

partir do 4º dia ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1), diferença observada durante todo o seu período de vida (Gráfico 2). Não houve diferenças significativas ao comparar camundongos infectados e sem infecção (DI versus DNI ou NI versus NNI).



**Gráfico 1** – Curvas ponderais de camundongos nutridos e desnutridos do 1º ao 21º dia de vida. Dados como média  $\pm$  DP - Teste *t Student*, \* $p < 0,05$ .



**Gráfico 2** - Curvas ponderais de camundongos do 35º até o 161º dia de vida. NI- Nutrido Infectado, NNI- Nutrido Não Infectado, DI – Desnutrido Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Dados como média  $\pm$  DP - Teste *t Student*.

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

# Diferença entre NNI e DNI ( $p < 0,05$ )

As frequências absolutas e relativas da incidência de translocação bacteriana por grupos encontram-se na tabela 2. Foi verificado um maior índice de translocação nos grupos infectados, quando comparados aos não infectados

( $p < 0,05$ ). Entre os infectados, houve tendência a uma maior incidência de translocação no grupo desnutrido, quando comparado ao nutrido, contudo a diferença não foi significativa.

Grupos	Incidência de translocação bacteriana
Nutrido Infectado	4/8 (50%) <sup>a</sup>
Desnutrido Infectado	7/8 (87,5%) <sup>b</sup>
Nutrido Não Infectado	0/8 (0%)
Desnutrido Não Infectado	1/8 (12,5%)

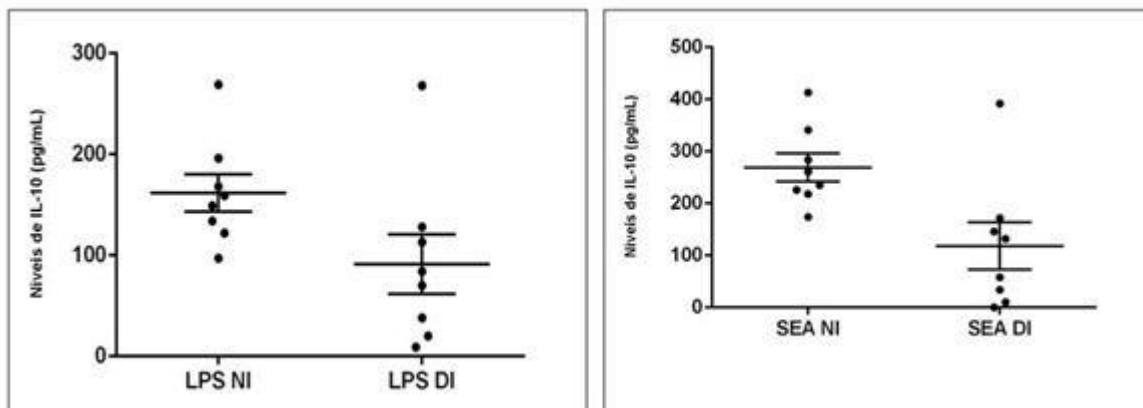
**TABELA 2** – Incidência de translocação bacteriana segundo os grupos de comparação. Dados como frequência absoluta e relativa – *Qui-Quadrado*.

<sup>a</sup> Diferença entre Nutrido Infectado e Nutrido Não Infectado ( $p = 0,021$ )

<sup>b</sup> Diferença entre Desnutrido Infectado e Desnutrido Não Infectado ( $p = 0,003$ )

Os isolados bacterianos responsáveis pela translocação em animais nutridos foram *Bacillus* sp., *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus rettgeri* e *Staphylococcus saprophyticus*. Nos animais desnutridos, foram encontrados *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus saprophyticus*.

Os níveis de IL-10 no sobrenadante da cultura de células esplênicas mostraram-se mais elevados nos animais do grupo NI, quando comparados aos do grupo DI ( $p < 0,05$ ). (Gráfico 3).

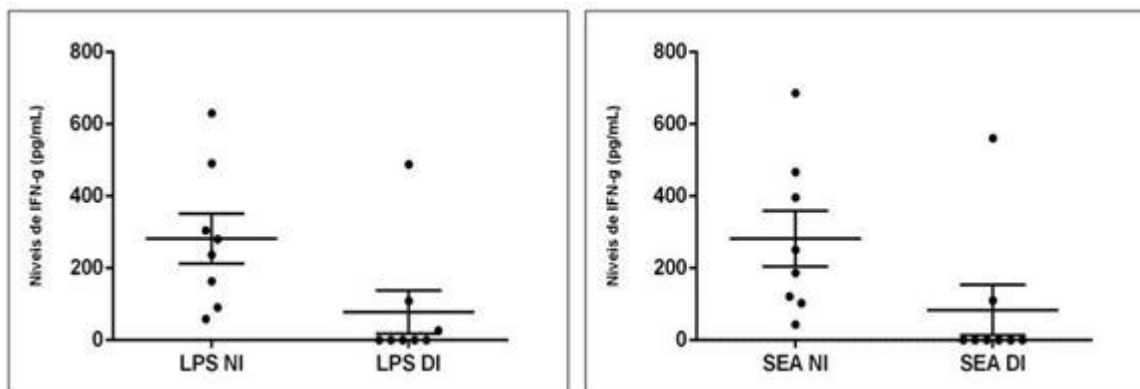


**Gráfico 3** - Produção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos infectados com *S. mansoni*, segundo os estímulos. LPS – Lipopolissacarídeo de *E. coli*, SEA – Antígeno Solúvel do ovo de *S. mansoni*, NI – Nutrido Infectado, DI – Desnutrido Infectado. Dados como Média ± Erro Padrão - Mann Whitney.

\* LPS: NI x DI ( $p=0,021$ )

\*\* SEA: NI x DI ( $p=0,007$ )

Quanto à produção de IFN- $\gamma$ , observou-se níveis mais baixos no grupo DI, quando comparado ao grupo NI ( $p<0,05$ ) (Gráfico 4).

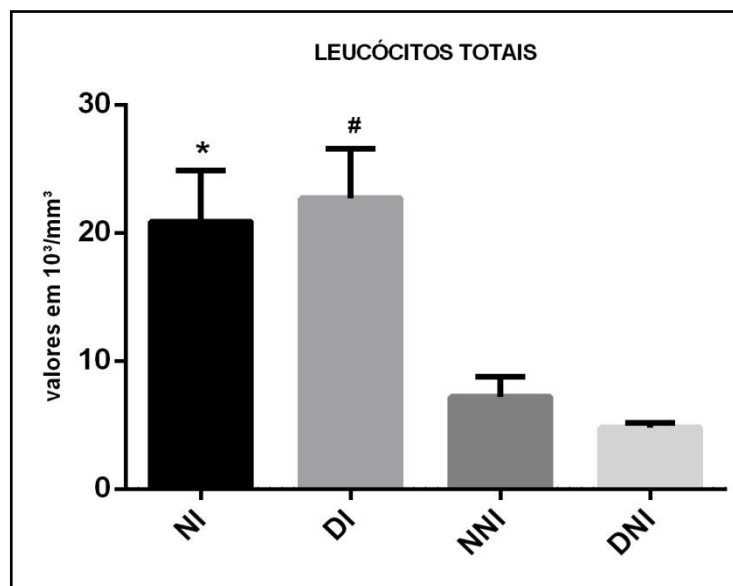


**Gráfico 4** - Produção de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos infectados com *S. mansoni*, segundo os estímulos. LPS – Lipopolissacarídeo de *E. coli*, SEA – Antígeno Solúvel do ovo de *S. mansoni*, NI – Nutrido Infectado, DI – Desnutrido Infectado. Dados como Média ± Erro Padrão - Mann Whitney.

\* LPS: NI x DI ( $p=0,009$ )

\*\* SEA: NI x DI ( $p=0,011$ )

O número total de Leucócitos foi comparado entre os grupos, segundo o estado nutricional e a infecção. Houve uma elevação nos valores dos grupos infectados, quando comparados aos controles, tanto para o grupo N, quanto para o D ( $p < 0,001$ ). Não foram encontradas diferenças entre os animais infectados (NI *versus* DI), nem entre os não infectados (NNI *versus* DNI) (Gráfico 5).



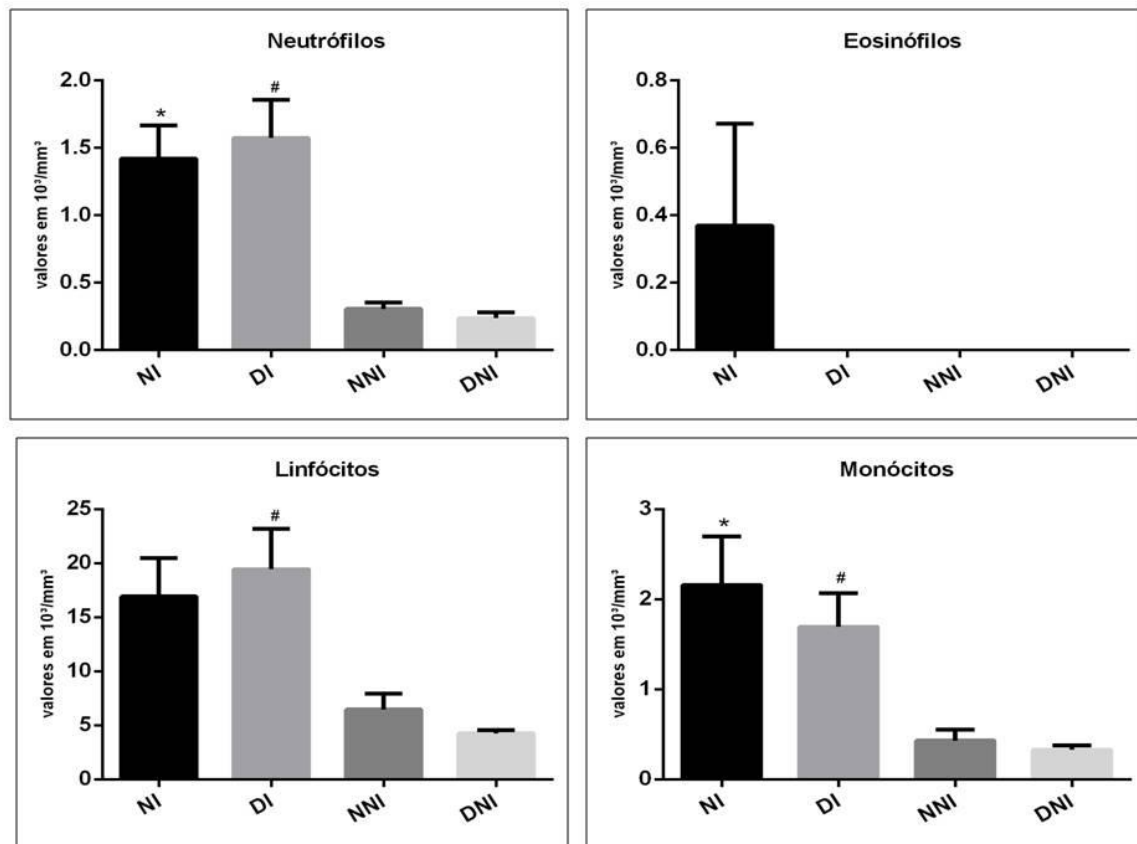
**Gráfico 5** - Contagem de leucócitos totais do sangue cardíaco, segundo os grupos de comparação. NI – Nutrido infectado, DI – Desnutrido Infectado, NNI – Nutrido Não Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Dados como Média  $\pm$  Erro padrão. *Análise de variância ANOVA.*

\* Diferença entre NI e NNI ( $p < 0,001$ )

# Diferença entre DI e DNI ( $p < 0,001$ )

Analisando a contagem diferencial de leucócitos, observa-se uma elevação nos valores de neutrófilos e monócitos nos grupos NI e DI, quando comparados aos grupos NNI e DNI, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Entre os grupos infectados, não houve diferenças significativas. A contagem de eosinófilos mostrou-se similar entre os grupos. O número de linfócitos apresentou-se mais elevado no grupo DI, quando comparado ao DNI ( $p < 0,001$ ), enquanto entre os outros grupos comparativos apresentou-se sem diferenças (Gráfico 6).





**Gráfico 6** - Contagem diferencial de leucócitos do sangue cardíaco, segundo os grupos de comparação. NI – Nutrido infectado, DI – Desnutrido Infectado, NNI – Nutrido Não Infectado, DNI – Desnutrido Não Infectado. Dados como Média  $\pm$  Erro padrão. ANOVA com post-hoc de Tukey.

\* Diferença entre NI e NNI ( $p < 0,001$ )

# Diferença entre DI e DNI ( $p < 0,001$ )

## Discussão

No estudo, foi utilizado modelo de desnutrição imposta no período de lactação, seguida de reposição nutricional. A lactação é um período crítico para o desenvolvimento dos mamíferos, sendo importante para o estabelecimento do fenômeno da programação (Moura and Passos 2005, Moura et al. 2008). Logo,

fatores nutricionais como a desnutrição protéica, quando imposta à mãe durante essa fase, podem influenciar o crescimento da prole (Corrêa 2009).

Sabe-se que ratas lactantes alimentadas com restrição protéica apresentam hipofagia, provocada por uma combinação de hiperleptinemia e hipoprolactinemia (Lisboa et al. 2006). Consequentemente passam a transferir um leite deficiente em proteína e em volume para a sua prole (Passos et al. 2000). Corroborando dados anteriores (Porto et al. 2006, Souza et al. 2008, Corrêa 2009, Costa et al. 2012), que demonstraram o efeito permanente do déficit ponderal promovido pela agressão nutricional, quando imposta durante a gestação e aleitamento, a dieta hipoprotéica utilizada afetou diretamente o ganho de peso dos animais a partir do 4º dia de vida, levando ao retardo da evolução ponderal do período de aleitamento até a idade adulta.

A oferta da dieta normoprotéica (Labina®) a partir do desmame, parece não ter sido eficiente em recuperar a deficiência de peso corporal originada ainda na amamentação, fenômeno já observado anteriormente em estudos com o mesmo modelo de desnutrição (Delmondes 2009, Severo 2009, Costa et al. 2012).

A condição nutricional de ambos os grupos parece não ter sofrido influência da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, uma vez que os animais infectados apresentaram, na evolução ponderal, comportamento similar aos seus respectivos controles não infectados. Esses achados estão de acordo com as observações realizadas por estudos anteriores (Coutinho et al. 2003, Coutinho et al. 2007, Silva 2008). Em contrapartida, Lima et al. (2012) verificaram que camundongos esquistossomóticos apresentaram redução da evolução do peso quando comparados aos controles. Vale salientar que no estudo de Lima et al. (2012), os animais foram infectados com uma maior carga cercariana (50 cercárias), o que pode ter contribuído para a diferença encontrada.

O estado nutricional é um dos principais moduladores da resposta imune, sendo, por um lado, importante determinante do risco e do prognóstico de doenças infecciosas e, por outro, diretamente influenciado pela infecção (Scrimshaw and San Giovanni 1997). Coutinho et al. (1992) relatam que a má-

absorção protéica ocasionada em camundongos subnutridos é agravada quando os animais são expostos à infecção pelo *S. mansoni*.

Pacientes esquistossomóticos podem apresentar circulação mesentérica prejudicada por ação traumática, irritativa e espoliativa dos parasitos adultos que se alimentam de sangue e obstruem os vasos (Katz and Almeida 2003). Adicionalmente, há uma imunodepressão na fase crônica da doença, aparentemente devido a um aumento na secreção de citocinas do perfil Th2, com decréscimo na secreção de IFN- $\gamma$  (Ribeiro de Jesus et al. 2000). Tais acontecimentos podem favorecer a ocorrência de translocação bacteriana (TB), e permitir a instalação da sepse (LIMA et al. 2012).

Paralelamente, sabe-se que a desnutrição leva ao comprometimento da atividade enzimática mucosa, diminuição da absorção de nutrientes e glutamina, queda de fluxo sanguíneo mesentérico e comprometimento da função imune e da barreira intestinal (Chandra 1983), condições conhecidas por facilitar translocação. Diante disso, foi avaliado o índice de ocorrência de TB nos camundongos desnutridos e eutróficos, infectados ou não pelo *S. mansoni*.

A análise dos resultados sugere uma maior ocorrência de translocação nos camundongos infectados, quando comparados aos controles sem infecção. Esses resultados corroboram os estudos de Lima et al. (2012) e Weber Sobrinho (2012), que também encontraram uma elevação na incidência de TB em camundongos na fase crônica da infecção pelo *S. mansoni*.

É descrito que bactérias aeróbias Gram negativas translocam com certa facilidade, até mesmo em indivíduos não injuriados com enterócitos intactos. Apesar de haver estudos mostrando que a TB pode ocorrer de modo independente de alterações no trato gastrointestinal, sendo chamada de translocação fisiológica (Wiest and Rath 2003), ela não foi observada no presente estudo, uma vez que não ocorreu nos animais livres de intervenção. Nos animais desnutridos não infectados, foi observado apenas um caso de TB, provavelmente devido às alterações imunológicas e/ou de mucosa intestinal decorrentes da desnutrição, conforme citado por Pereira (2005).

Dentre os animais infectados, houve tendência a uma maior incidência de TB no grupo desnutrido, contudo a diferença observada não foi significativa. Esperava-se uma maior ocorrência de TB no grupo desnutrido, já que a sobreposição da infecção à desnutrição agrava o quadro de imunossupressão nos animais, além de aumentar fatores predisponentes para a ocorrência de TB, citados anteriormente. Acredita-se, desta forma, que a ausência de significância estatística tenha ocorrido devido ao número amostral considerado neste estudo.

Algumas das bactérias isoladas foram descritas por Ferraz et al. (2005), Lima et al. (2012) e Weber Sobrinho (2012), sendo recentemente citadas como pertencentes ao grupo de bactérias intestinais capazes de translocar (Fouts et al. 2012). Todas as bactérias encontradas foram descritas anteriormente por fazer parte da microbiota entérica de camundongos (Minagawa 2007, Lima et al. 2012, Weber Sobrinho 2012).

Suspeita-se que ocorrência de TB nos animais seja, em parte, devida a modificações no padrão imunológico decorrentes da infecção. O tipo de imunidade encontrada em camundongos infectados com *S. mansoni* apresenta variações nos perfis Th1/Th2, com a evolução da doença. Nas fases iniciais da infecção, a resposta predominante é do tipo Th1 e, a medida que as formas imaturas vão se desenvolvendo, copulando e produzindo ovos, a resposta que era predominantemente Th1 é substituída pelo predomínio da resposta Th2, induzida principalmente por antígenos do ovo de *S. mansoni* (Flores-Villanueva et al. 1993, Cheever et al. 2000).

Durante a fase crônica, o perfil observado é caracterizado por uma baixa produção de IFN- $\gamma$  e produção aumentada de citocinas com padrão Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Ribeiro de Jesus et al. 2000). A IL-10, ao atuar sobre a resposta Th1 e desviá-la para Th2, se opõe à síntese de IFN- $\gamma$ , importante para a proliferação de células T e a ativação de macrófagos, provocando uma imunodeficiência que poderia facilitar a TB.

Weber Sobrinho (2012), avaliando níveis de citocinas em modelo murino de infecção pelo *S. mansoni* associado à translocação bacteriana/sepsis pós-esplenectomia terapêutica, verificou níveis mais elevados de IL-10 em

camundongos esquistossomóticos, bem como observou uma maior ocorrência de translocação nesse grupo. Fock et al. (2008) constataram que animais desnutridos são capazes de produzir níveis maiores de IL-10 quando comparados com os nutridos, após infecção com LPS. Por outro lado, Costa et al. (2012) não encontraram diferenças na produção de IL-10 entre grupos de animais nutridos e submetidos à desnutrição neonatal.

De encontro às nossas expectativas, os níveis de IL-10 produzidos nesse estudo foram menores em animais desnutridos infectados, comparados aos infectados nutridos. Supõe-se que o imunocomprometimento provocado pela desnutrição no período crítico de desenvolvimento dos animais, tenha alcançado tamanha proporção que houve um déficit, inclusive, na produção de IL-10, frente à infecção crônica pelo *S. mansoni*.

De forma semelhante, a produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos também foi comprometida pela desnutrição neonatal. Os dados obtidos neste trabalho demonstram que células esplênicas de camundongos desnutridos oferecem menor produção de IFN- $\gamma$ . Esses Resultados corroboram, em parte, aqueles obtidos por Ishikawa et al. (2009), os quais constataram diminuição na produção IFN- $\gamma$  em grupos de animais desnutridos quando comparados ao grupo de animais nutridos em cultura de células esplênicas estimuladas com LPS. Outro estudo, desenvolvido por Silva (2008), não encontrou níveis detectáveis de produção de IFN- $\gamma$  em camundongos desnutridos e eutróficos frente à infecção crônica pelo *S. mansoni*, não descartando a possibilidade de ter havido uma produção inferior à sensibilidade do teste aplicado.

As alterações orgânicas causadas pela desnutrição e pela infecção esquistossomótica, bem como pela TB, podem levar a modificações no padrão de exames laboratoriais, como as contagens total e diferencial de leucócitos. A interpretação de exames laboratoriais requer que se avalie se o resultado é normal ou não. Uma vez que raramente se dispõem de informações para fazer esta afirmação, é necessário, ao invés disso, considerar se o resultado é o que seria esperado em um indivíduo sadio, biologicamente tão parecido quanto o indivíduo em questão (Bain 1997).

O estudo do quadro leucocitário dos camundongos demonstrou uma elevação nos leucócitos totais dos animais infectados por *S. mansoni*, em ambos os grupos, corroborando os resultados obtidos por Ramos (2004), que também encontraram uma leucocitose em camundongos Swiss submetidos à infecção crônica. Atta et al. (1981) mencionam que os leucócitos totais de camundongos infectados com *S. mansoni* aumentam conforme a evolução da infecção. A contagem total de leucócitos parece não ter sofrido influência da desnutrição, uma vez que os valores foram semelhantes nos animais nutridos e desnutridos. Esses resultados estão de acordo com os de Melo et al. (2008), cujos dados da contagem de leucócitos no sangue periférico indicam que a desnutrição neonatal não altera o número de leucócitos totais em ratos adultos.

Avaliou-se também a contagem diferencial de leucócitos. Foi observada uma elevação nos valores de neutrófilos e monócitos nos dois grupos infectados. Nossos dados são discordantes dos resultados obtidos por Ramos (2004), que verificou uma neutropenia em camundongos infectados, assim como daqueles encontrados por Atta et al. (1981), que verificaram comportamento similar de monócitos em animais infectados e sem infecção. Acredita-se que a presença de bactérias em sangue e/ou órgãos, em decorrência da translocação, possa ter modificado o padrão leucocitário, estimulando neutrofilia e monocitose. De acordo com Bain (1997), a resposta usual a uma infecção bacteriana é a neutrofilia, aumento de neutrófilos, com redução das contagens de eosinófilos. A desnutrição não promoveu modificações na apresentação de neutrófilos e monócitos, corroborando em parte os dados mencionados por Melo et al. (2008), que verificaram semelhança nos valores de neutrófilos, com redução no número de monócitos em ratos desnutridos.

Apesar de eosinofilia ser freqüente em infecções parasitárias, não foram encontradas diferenças entre os grupos analisados, corroborando os achados de Atta et al. (1981), que se depararam com semelhança no comportamento de eosinófilos em camundongos infectados e sem infecção. A ausência de eosinofilia no presente estudo pode ter sido consequência das infecções microbianas

decorrentes de TB, já que é observado redução de eosinófilos em infecções bacterianas (Bain, 1997).

Atta et al. (1981) citam que o número de linfócitos tende a aumentar no decorrer da infecção esquistossomótica, contudo esses dados foram observados em nosso estudo apenas nos animais desnutridos. Entre os nutridos, não houve modificação provocada pela infecção. Por outro lado, Melo et al. (2008) encontraram um aumento no número de linfócitos de animais desnutridos, indo de encontro ao nosso estudo, onde a desnutrição não induziu diferenças significativas.

Os dados acerca das respostas imunológicas envolvidas no processo de TB e esquistossomose, principalmente quando associados à desnutrição, são escassos ou conflitantes. Logo, estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão da imunopatologia de doenças infecto-parasitárias associadas a distúrbios nutricionais.

## **Conclusões**

A desnutrição neonatal provocou modificações na resposta imune celular dos camundongos infectados por *S. mansoni*, promovendo redução nos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$ , circunstâncias que podem ter favorecido a ocorrência de translocação bacteriana nos animais. As contagens total e diferencial de leucócitos não foram modificadas pela desnutrição.

## **Agradecimentos**

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

## Referências

- Atta AM, Magalhães LA, Alcântara FG, Pareja G (1981) Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. *Ver Saúde Publ* 15: 72-92.
- Bain BJ (1997) Células sanguíneas um guia prático. 2º Ed. Artes Médicas. Porto Alegre.
- Chandra RK (1983) Nutrition, immunity and infection: present knowledge and future directions. *Lancet* 26: 688-691.
- Cheever AW, Hoffmann KF, Wynn TA (2000) Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol Today* 21(9): 465-6.
- Corrêa CL (2009) Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação. Thesis. Universidade do estado do Rio de Janeiro, Brazil.
- Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, Castro CMMB (2012) desnutrição neonatal e produção de IFN- $\gamma$  IL-12 e IL-10 por macrófagos/ linfócitos: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *Staphylococcus aureus* metilicina sensível e metilicina resistente. *Rev Nutr* 25(5): 607-619.
- Coutinho EM et al. (2003) Host nutritional status as a contributory factor to theremodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 919–925.
- Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araujo RE, Oliveira SA, Luna CF, Barbosa- Jr AA, Andrade ZA (2007) Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. *Acta Tropica*, 101(1): 15–24.
- Coutinho EM, Freitas LPCG, Abath FGC (1992) The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 13-20.
- Delmondes GMB (2009) Repercussão do treinamento físico moderado e intenso nos mecanismos de defesa de ratos adultos desnutridos precocemente. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco
- Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM (2003) Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa *Surgery*, 133(1): 601-607.
- Fallon PG (2000) Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology Today* 21(1): 29-35.
- Ferraz AAB, Campos JM, Araújo Júnior JGC, Albuquerque AC, Ferraz EM (2005) Gut Bacterial Translocation and Postoperative Infections: A Prospective Study in Schistosomal Patients. *Surg Infect* 6: 197-201.
- Flores-Villanueva PO et al. (1993) Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 151: 3192-8.
- Fock RA, Vinolo MAR, Crisma AR, Nakajima K, Rogero MM, Borrelli P (2008) Proteinenergy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. *J Nutr Sci Vitaminol* 54(5):3717.



- Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B (2012) Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 56(6): 1283-92.
- Ishikawa LLW, França TGD, ChiusoMinicucci F, Zorzellapezavento SFG, Marra NM, Pereira PCM (2009) Dietary restriction abrogates antibody production induced by a DNA vaccine encoding the mycobacterial 65 kDa heat shock protein. *Genet Vaccines Ther* 7:11.
- Katz N, Almeida K (2003) Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult* 55(1): 38-43.
- Lima KM, Aires AL, Lucena LRR, Almeida TM, Albuquerque MCPA, Castro CMMB (2012) Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. *Acta Gastroenterol Latinoam* 42:309-320.
- Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCP, Bonomo LT, Denolato ATA, Reis AM, Moura EG (2006) Leptin and Prolactin, but not corticosterone, Modulate Body Weight and Thyroid function in Protein-Malnourished Lactating rats. *Horm Metab Res* 38:1-5.
- Melo JF, Macedo EMC, Silva RPP, Viana MT, Silva WTS, Castro CMMB (2008) Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. *Rev Nutr* 21(6):683-694.
- Minagawa CY (2007) Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. Dissertation. Universidade de São Paulo, Brazil.
- Moura EG, Santos RF, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes AT, Oliveira E, Passos MC (2008) Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats – the role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res* 40(1): 1-7.
- Moura EG, Passos MCF (2005) Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* 25(3/4): 251-269
- Passos MCF, Ramos CF, Moura EG (2000) Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res* 20(11): 1603-1612.
- Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews* 2: 499-511.
- Pereira MAG (2005) Influência da desnutrição energético-proteica no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos. Dissertation. Faculdade de Farmácia da UFMG, Brazil.
- Porto SMMS, Araújo FRG, Melo JF, Silva RR, Silva KMF, Castro CMMB (2006) Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco* 51(1): 59-65.
- Queiros-Santos A (2000) Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Ramos JA (2004) Ações da dexametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênicos. Dissertation. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

- Ribeiro de Jesus, A et al. (2000) Human immune responses to *Schistosoma mansoni*: vaccine candidate antigens. *Infection and Immunity* 68: 2757-2803.
- Rudles C, LIN DH (1998) Nutrition and the immune system of the gut. *Nutrition* 14: 573-579.
- Santhiago V, Da Silva ASR, Gobatto CA, De Mello MAR (2006) Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. *Rev Bras Med Esporte* 12(2): 76-80.
- Severo MS (2009) Função microbicida de macrófagos alveolares de ratos submetidos à desnutrição neonatal: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *staphylococcus aureus* metilicilina-sensível e metilicilina resistente. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Scrimshaw NS, San Giovanni JP (1997) Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 66(2): 464S-477S.
- Silva FL (2008) Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni*. Dissertation. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil.
- Souza SL, Orozco-Solis R, Grit I, Castro RM, Bolaños-Jiménez F (2008) Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci* 27:1400-1408.
- Ulusoy H, Usul H, Aydın S, Kaklikaya N, Cobanoglu U, Reis A, Akyol A, Ozen I (2003) Effects of immunonutrition on intestinal mucosal apoptosis, mucosal atrophy, and bacterial translocation in head injured rats. *Journal of Clinical Neuroscience* 10(5): 596-601.
- Weber Sobrinho CR (2012) Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana/sepsis: perfil de citocinas na infecção crônica em camundongos submetidos à esplenectomia. Thesis. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Wiest R, Rath HC (2003) Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 397-425.

## 7. CONCLUSÕES

---

- ◆ Houve uma maior ocorrência de translocação bacteriana em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, submetidos ou não à desnutrição.
- ◆ Existiu uma tendência à maior ocorrência de translocação bacteriana em camundongos desnutridos infectados pelo *S. mansoni*, comparados aos infectados eutróficos.
- ◆ A desnutrição neonatal promoveu diminuição nos níveis de IL-10 e de IFN- $\gamma$  no sobrenadante da cultura de células esplênicas de camundongos infectados por *S. mansoni*, circunstâncias que podem ter favorecido a ocorrência de translocação bacteriana nos animais.
- ◆ Houve uma elevação na contagem total de leucócitos dos animais infectados. Essa contagem foi semelhante em camundongos desnutridos e eutróficos.
- ◆ Os valores de neutrófilos e monócitos apresentaram-se mais elevados nos grupos de animais infectados.
- ◆ A contagem de eosinófilos não mostrou diferenças significativas entre os grupos desnutridos e eutróficos, infectados ou não pelo *S. mansoni*.
- ◆ O número de linfócitos mostrou-se mais elevado no grupo desnutrido infectado, quando comparado ao desnutrido não infectado.
- ◆ A desnutrição não modificou a contagem diferencial dos leucócitos nos animais infectados e sem infecção.

## 8. REFERÊNCIAS

---

1. ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, London, n. 383, p. 787-793, Out., 1996.
2. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier (medicina), 2008.
3. ABDU, S.B. Schistosoma mansoni induce granulomatous inflammation and lesion to the enteric nervous system in mouse colon. **J Egypt Soc Parasitol.**, v. 39(1), p.183-90, Apr., 2009.
4. ANDRADE, Z.A.; WARREN K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: Alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. R Soc Trop Med Hyg**, v. 58, p. 53, 1964.
5. ARAÚJO, M.I. **Imunorregulação na Esquistossomose mansônica Humana**. 1997 (Tese) Rio de Janeiro, 1997.
6. ARAUJO, M.I.; DE JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, p.1399-403, 1996.
7. BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A.L.C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S.M.L.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B; MORAES, C.N.L.; SPINELLI, V. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p.725-728, Rio de Janeiro, 2001.
8. BARBOSA-SILVA, M.C.G.; BARROS, A.J.D. Avaliação nutricional subjetiva. Parte 1 – Revisão de sua validade após duas décadas de uso. **Arq Gastroenterol**. No.3 jul./set. 2002.

9. BARSOUM, R.S. Schistosomal glomerulopathies. **Kidney Int.**, v. 4, p. 1-12, 1993.
10. BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.** v. 3, p. 149-54, 1995.
11. BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: an overview. **Gastroenterology**, v. 108 (5), p. 1566-1581, 1995.
12. BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Ann Nutr Metab**, v. 42, p. 367-73, 1998.
13. BOSSHARDT, S.C.; FREEMAN, G.L.; SECOR, W.E.; COLLEY, D.G. IL-10 deficit correlates with chronic hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol**, v. 8, p. 347-53, 1997.
14. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annalytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, Orlando, 1976.
15. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Esquistossomose. Brasília, DF, 2006.
16. BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutr Rev.**, v. 58, p. 1-4, 2000.
17. BRUNETTO, M. A.; GOMES, M. O. S.; JEREMIAS J. L.; DE OLIVEIRA, L. D.; CARCIOFI, A. C. Imunonutrição: o papel da dieta no estabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35(Supl 2), p230-s232, 2007.
18. CAPRON A.; DESSAINT J.P. Immunologic aspects of schistosomiasis. **Annu Rev Med.**, v. 43, p.209-18, 1992.

19. CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66(2), p. 460S-463S, 1997.
20. 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.
21. CHENSUE, S.W.; WARMINGTON, K.S.; HERSHEY, S.D.; TEREBUH, P.D.; OTHMAN, M.; KUNKEL, S.L. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cells in vivo. **J Immunol**, v. 151, n. 3, p. 1391-400, 1993.
22. COLLEY, D.G. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 115, p. 150-56, 1975.
23. COURA, J.R.; AMARAL R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, p.13-19, 2004.
24. COUTINHO, E. M. Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 85-92, Rio de Janeiro, out, 2004.
25. COUTINHO, E.M. *et al.* Host nutritional status as a contributory factor to remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 919–925, Rio de Janeiro, 2003
26. COUTINHO, E. M. *et al.* Pathogenesis of schistosomal “ pipestem” fibrosis: a lowprotein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 78, p. 337-342, 1997.
27. COUTINHO, E. M. *et al.* Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Tropica**, Basel, v. 101, n. 1, p. 15–24, 2007.

28. COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n.25, p. 13 – 20, Brasília, jan./mar. 1992
29. CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D.F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.115, p. 1119-1128, 2005.
30. DE JESUS A.R.; SILVA A.; SANTANA L.B.; MAGALHAES A.; DE JESUS A.A.; DE ALMEIDA R.P.; REGO M.A.; BURATTINI M.N.; PEARCE E.J.; CARVALHO E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis.**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.
31. DOMINGUES, A.L.C.; BARRETO, V.S.T. Esquistossomose hepática. In: Matos, A. A; Dantas, W. **Conferência de Hepatologia**, São Paulo: Fundo Editorial Byk, p. 391-405, 2001.
32. DOMINGUES, A.L.C.; DOMINGUES, L.A.W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed). **Esquistossomose mansônica**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, cap. 5, p. 91-105. , 1994
33. DOUGHTY, B.L. & PHILLIPS, S.M. Delayed Hypersensitivity Granuloma Formation And Modulation Around *Schistosoma Mansoni* Eggs In vitro. li. Regulatory T Cell Subsets. **J. Immunol.**, v.128, p. 37, 1982.
34. DUSTIN, M.L.; ROTHLEIN, R.; BHAN, A.K.; DINARELLO, C.A.; SPRINGER, T.A. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J Immunol.**, v.137, n.1, p.245-54, 1986.

35. DWINELL, M.B.; JOHANESEN, P.A.; SMITH, J.M. Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa. **Surgery**, v. 133, n.1, p. 601-7, 2003.
36. ELOI-SANTOS, S.; OLSEN, N. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. **Exp Parasitol**. Orlando. v. 75, n. 2, p. 168–192, 1992.
37. ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*., v. 82, p. 139-146, 2002
38. FALLON, P.G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2000.
39. FAVRE, T.C. *et al.* Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 569-576, 2001.
40. FERRARI, T.C.A.; MOREIRA, P.R.R.; CUNHA A.S. Spinal cord schistosomiasis: A prospective study of 63 cases emphasizing clinical and therapeutic aspects. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.11 (3), p. 246-253, 2004.
41. FERRAZ, A.A.B.; CAMPOS, J.M.; ARAÚJO JÚNIOR, J.G.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; FERRAZ, E.M. Gut Bacterial Translocation and Postoperative Infections: A Prospective Study in Schistosomal Patients. **Surgical Infections**., v. 6, n. 2, p.197-201, 2005.
42. FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, v.36, n. 1, p. 67-74, 2007.



43. FINKELMAN, F. D.; PEARCE, E. J., URBAN, J.J., SHER, A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. **Parasitology Today**, v. 7, n. 3, p. 62-66, March, 1991.
44. FIORENTINO, D.F.; BOND, M.A.; MOSSMAN, T.R. Two types of t helper cell. iv. Th2 clones secrete a factor that inhibit cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170, p. 2081, 1989.
45. FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, n.11, p. 3815-3822, 1991.
46. FLORES-VILLANUEVA, P.O. *et al.* Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 151, p. 3192-8, 1993.
47. GAZZINELLI, G. *et al.* Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of antigen-incuced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, p. 2891-2895, 1983.
48. GOBEL, H. *et al.* Die exteroceptive Suppression der Aktivität des M. temporalis in der Analyse von Schmerzmechanismen. **Der Schmerz**, v.10, p. 121-129, 1996.
49. GROSSIE, JR.V.B.; KENNEDY, W.R.; NARINS, D. Effect of intestinal ischemia followed by reperfusion on the plasma and tissue zinc, copper, and iron content. **Nutrition**, v.19, p.1003-1005, 2003.
50. GRZYCH, J.M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HEINY, S. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, p.1322-7, 1991.

51. HERNANDEZ, H. J.; SHARPE, A. H.; STADECKER, M. J. Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 2884-2889, Baltimore, 1999.
52. HOFFMANN, K. F; CHEEVER, A. W; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses incuse distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, n. 164, p. 6406-6116, Baltimore, jun., 2000.
53. JACOBS, W.; VAN DE VIJVERK., DEELDER, A., VAN MARCK, E. Morphometrical and immunopathological dissection of the hepatic schistosoma haematobium granuloma in the murine host. **Parasite**. v. 5(4), p. 299-306, Dec., 1998.
54. JAMES, S.L.; SHER, A. Cell mediated immune response to schistosomiasis. **Curr Topics Immunobiol.** v 143, p. 4208, 1990.
55. JANEWAY C.A.; TRAVERS P.; WALPORT M.; SHOMCHIK M. **Imunobiologia, o sistema imune na saúde e na doença**. 5º ed. ARTMED, Porto Alegre, 2002.
56. KATZ N.; ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003.
57. KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRING, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do instituto de medicina tropical de sao paulo**; v.14, p. 397-402, 1972.
58. KELLERMEYER R.W.; WARREN K.S.; WALDMANN T.S.; COOK J.A.; JORDON P. Concentration of serum immunoglobulins in ST Lucians with schistosomiasis mansoni compared with matched uninfected St. Vicentians. **J Infect Dis**, v.127, p.557-62, 1973.

59. KOS F.J.; ENGLEMAN E.G. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. **Immunol Today**, v. 17, n. 4, p. 174-6, 1996.
60. LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* Schistosoma mansoni: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 101-109, 2000.
61. LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. **Esquistossomose mansônica. In: Coura J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, cap 76, p. 931-946, 2005.
62. LIMA, K.M. **Associação entre esquistossomose mansônica e infecções microbianas: estudo da translocação microbiana em camundongos machos e fêmeas na fase crônica, submetidos ou não a esplenectomia.** [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2011
63. LIMA, K.M.; AIRES, A.L.; LUCENA, L.R.R.; ALMEIDA, T.M.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; CASTRO, C.M.M.B. Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. **Acta Gastroenterol Latinoam**, v. 42, p. 309-320, 2012.
64. LIMA, M.S.; GAZZINELLI, G.; NASCIMENTO, E.; PARRA, J.C.; MONTESANO, M.A.; COLLEY, D.G. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. Evidence for antiidiotypic T lymphocyte responsiveness. **J Clin Invest**, v. 78, n. 4, p. 983-8, 1986.
65. LUCAS, A.; FEWTRELL, M.S.; COLE, T.J. Fetal origins of adult disease – the hypothesis revisited. **British Medical Association**, London, v.319, p. 245-249, 1999.
66. MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. **Br. Med. Bull**, v. 71, p. 1-11, 2004.

67. MALAQUIAS, L.C.; FALCÃO, P.L.; SILVEIRA, A.M.; GAZZINELLI, G.; PRATA, A.; COFFMAN, R.L. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand J Immunol**, v. 46, p. 393-8, 1997.
68. MARLETTA, M.A.; SPIERING, M.M. Trace elements and nitric oxide function. **Journal Nutrition**, v. 133, p. 1431-1433, 2003.
69. MATHEW, R.C.; BOROS, D.L. Anti-L3T4 antibody formation and abrogates antigen-induced interleukin-infection. **Infect Immun**, v. 54, n. 3, p. 820-6, 1986.
70. MEIRA, D.A. Interaction of infection, nutrition and immunity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. 28, p. 315 – 319, Brasília, 1995.
71. MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: Neves D.P., **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, p. 193-212, 2005.
72. MELO, J. F. De. **Atividade oxidante-antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos submetidos à desnutrição neonatal**. [dissertação]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2007
73. MONTENEGRO, S.M.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F.G.; TEIXEIRA, K.M.; COUTINHO, E.M.; BRINKMAN, J.; GONCALVES, I.; DOMINGUES, L.A.; DOMINGUES, A.L.; SHER, A.; WYNN, T.A. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferongamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v.179, n. 6, p. 1502-14, 1999.
74. MOORE, K.W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D.F.; TROUNSTINE, M.L.; KHAN, T.A.; MOSMANN, T.R. Homology Of Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (Il-10) To Epstein-Barr Virus Gene Bcrf1. **Science**, v.248, p.1230-1234, Washington,1990.

75. MORGAN, G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence?. **The Lancet.**, v. 349, p.1693-1695, 1997.
76. MORVEN R.; BUTTERWORTH A.E.; KIMANI G.; KAMAU T.; FULFORD A.J.C.; DUNNE D.W.; OUMA J.H.; STURROCK A.F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. **Inf Immunol.** v. 61, p. 4984-93, 1993.
77. MS - BRASIL. Ministério da saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias – Guia de bolso.** 8ª edição revisada. Brasília – DF, 2010.
78. MWATHA J.K.; KIMANI G.; KAMAU T.; MBUGUA G.G.; OUMA J.H.; MUMO J.; FULFORD A.J.; JONES BUTTERWORTH A.E.; ROBERTS M.B.; DUNNE D.W. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 160, n. 4, 1992-9, 1998.
79. NAABER, P.; SMIDT, I.; TAMME, K.; LIIGANT, A.; TAPFER, H.; MIKELSAAR, M.; TALVIK, R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. **J Med Microbiol**, v. 1, n. 49, p. 431-439, May, 2000.
80. NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, p. 193-212, 2005.
81. NISHIOKA, S.A.; FERREIRA, M.S.; BURGARELLI, M.K.N. Serratia marcescens bacteremia associated with schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, SP, v. 25, n. 3, p. 191-193, 1992.
82. OLIVEIRA, S. A. *et al.* Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research.**, Berlin, v. 93, p. 30- 35, mar, 2004

83. OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S.mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 38, p. 19–23, 1952.
84. PACHECO & LENZI. Systemic Modulation Of peripheral Eosinophilia (Air Pouch Model) In *Schistosoma mansoni* Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Suppl 2, p. 165-72, 1997.
85. PATTON, E. A. *et al.* Severe schistosomiasis in the absence of interleukin-4 (IL-4) Is IL-12 independent. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 1, p. 589-592, jan. 2001.
86. PARRA, J.C.; GAZZINELLI, G.; GOES, A.M.; MOYES, R.B.; ROCHA, R.; COLLEY, D.G.; DOUGHTY, B.L. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. II. In vitro granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies. **J Immunol**, v. 147, n. 11, p. 3949-54, 1991.
87. PEARCE, EJ, CASPAR, P, GRZYCH, JM, LEWIS, FA, SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.173, p.159-166, 1991.
88. PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 499-511, 2002.
89. PESSOA, S; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**, 11 ed, Rio de Janeiro, cap. 35, p. 361-406, 1988.
90. POGGENSEE ,G.; FELDMEIER, H. Female genital schistosomiasis: facts and hypotheses. **Acta Trop**. v.79(3), p.193, 2001.

91. QUEIROS-SANTOS, A. **Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos**. [Dissertação de Mestrado]. Univ. Federal de Pernambuco. Recife, 2000
92. REY, L. **Parasitologia**. Cap. *Schistosoma Mansoni e Esquistossomose: A Doença*, p. 351, 2001.
93. RIBEIRO DE JESUS, A *et al.* Human immune responses to *Schistosoma mansoni*: vaccine candidate antigens. **Infection and Immunity**, Washington, n. 68, p. 2757-2803, may, 2000.
94. RITTER D.M.; MCKERROW J.H. Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. **Infect Immun.** v. 64, n.11, p.4706-13, 1996.
95. RUDLES C.; LIN D.H. Nutrition and the immune system of the gut. **Nutrition**, v.14, p.573-579, 1998.
96. SAKER, K. E. Diet and the immune system: selected overview of nutritioanal immunomodulation. **Proceedings of the 3rd Pet Food Industry**, Chicago, U. S. A., p. 44-59, 2004.
97. SANTHIAGO, V.; DA SILVA, A.S.R.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.R. Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. **Rev Bras Med Esporte**, v.12. n. 2, Mar/Abr, 2006.
98. SCHLEGEL, L.; COUDRAY-LUCAS, C.; BARBUT, F.; BOUSCHER, J.L.; JARDEL, A.; ZARRABIAN, S.; CYNOBER, L. Bacterial dissemination and metabolic changes in rats induced by endotoxemia following intestinal *E. coli* Overgrowth are reduced by ornithine  $\alpha$ -ketoglutarate administration. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2897-2902, 2000.

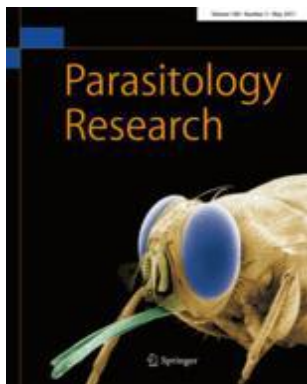
99. SCRIMSHAW, N.S.; SAN GIOVANNI, J.P. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. **Am J Clin Nutr**, v. 66(2), p. 464S-477S, 1997.
100. SILVA, F. L. **Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com Schistosoma mansoni**. (Dissertação - mestrado em saúde pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 115 p, 2008.
101. SILVEIRA, A.M.; GAZZINELLI, G.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; BETHONY, J.; GAZZINELLI, A.; CARVALHO-QUEIROZ ALVAREZ, M.C.; LIMA-SILVA, F.C.; PRATA, A.; LOVERDE, P.T.; CORREA-OLIVEIRA, R. Schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult antigen stimulated cultures. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 9, p. 514-9, 2004.
102. SHER A.; COFFMAN R.L.; HIENY S.; SCOTT P.; CHEEVER A.W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc Natl Acad Sci, U S A**, v. 87, n. 1, p. 61-5, 1990.
103. SRINIVASAN, M., PATEL, M. S. Metabolic programming in the immediate postnatal period. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 19, p. 146-152, 2008.
104. SMYTHIES , L.E.; COULSON, P.S.; WILSON R. Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to schistosoma mansoni vaccinated with attenuated cercariae. **Ann. Trop. Parasitol.** v. 653, 1992.
105. STADECKER, M.J.; FLORES-VILLANUEVA, P.O. The role of T cell anergy in the immunomodulation in schistosomiasis. **Parasitol Today**, v. 15, p. 571-4, 1992.



106. STANDEN, D. The effect of temperature light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.225-24, 1952.
107. STEINBERG, S.M. Bacterial translocation: what it is what it is not. **The American Journal of Surgery**, v. 186, p. 301-306, 2003.
108. STOCKINGER, B., BOURGEOIS, C. AND KASSIOTIS, G. CD4<sup>+</sup> memory T cells: functional differentiation and homeostasis. **Immunological Reviews**, v. 211, p. 39–48, 2006.
109. SVS/MS – Secretaria de vigilância em saúde/MS. **Guia de vigilância epidemiológica**. Caderno 10. 2008
110. ULUSOY, H.; USUL, H.; AYDIN, S.; KAKLIKKAYA, N.; COBANOGLU, U.; REIS, A.; AKYOL, A.; OZEN, I. Effects of immunonutrition on intestinal mucosal apoptosis, mucosal atrophy, and bacterial translocation in head injured rats **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 10 (5), p. 596-601, 2003.
111. VAN DEN BIGGELAAR, A.H.; BORRMANN, S.; KREMSNER, P.; YAZDANBAKHS, M. Immune responses induced by repeated treatment do not result in protective immunity to *Schistosoma haematobium*: interleukin (IL)-5 and IL-10 responses. **J Infect Dis**, v. 186, n. 10, p. 1474-82, 2002.
112. WADE, S. *et al.* Early nutritional experiments: effects on the humoral and cellular immune responses in mice. **J Nutr.**, v. 113, n.6, p. 1131 – 1139, 1983.
113. WEBER SOBRINHO, C.R. Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana/sepsis: perfil de citocinas na infecção crônica em camundongos submetidos à esplenectomia. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. (2012)

114. WEINSTOCK, J.V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the schistosome ova and the host. **Immunol Invest**, v. 21, n. 5, p. 455-75, 1992.
115. WIEST, R.; RATH, H.C. Bacterial translocation in the gut. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 397-425, 2003.
116. WILLIAMS, M.E.; MONTENEGRO, S.; DOMINGUES, A.L.; WYNN, T.A.; TEIXEIRA, K.; MAHANTY, S.; COUTINHO, A.; SHER, A. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, p.946-954, 1994.
117. WILSON, M. S. *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 85, p. 148–154, 2006.
118. WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 7, p. 505-511, 1995.
119. YAMASHITA T.; BOROS D.L. Il-4 Influences Il-2 Production And Granulomatous Inflammation In Murine Schistosomiasis *Mansoni*. **J. Immunol.**, v. 149, n. 11, p. 3659, 1992.

## APÊNDICE A – Artigo



Association between chronic schistosomiasis and bacterial translocation: Levels of cytokines IL-10 and IFN- $\gamma$  and leukocyte profile in adult mice subjected to neonatal malnutrition

**Danielly Cantarelli de Oliveira** - Graduate in Tropical Medicine. Federal University of Pernambuco. Rua Menezes Drumond, 293, Apt 302, Madalena, CEP: 50610-320, Recife, PE, Brazil. Responsible for the research project, research implementation, data analysis, writing and formatting the article.

**Bruno Henrique Andrade Galvão** - Graduate in Tropical Medicine. Federal University of Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50810-020, Recife, PE, Brazil.

**Carlos Andre Laranjeira Miranda Filho** - Sector of Microbiology of Laboratory Immunopathology Keizo Asami, LIKA/UFPE. Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

**André de Lima Aires** - Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50810-020, Recife, PE, Brazil.

**Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque** - Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50810-020, Recife, PE, Brazil.

**Gláucia Maria Assis Costa** - Graduate in Tropical Medicine. Federal University of Pernambuco. Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

**Célia Maria Machado Barbosa de Castro** - Graduate in Tropical Medicine and nutrition. Federal University of Pernambuco. Sector of Microbiology of Laboratory Immunopathology Keizo Asami, LIKA/UFPE. Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, PE, Brazil.

### Author for correspondence:

**Danielly Cantarelli de Oliveira** – Rua Menezes Drumond, 293, Apt 302, Madalena, CEP: 50610-320, Recife, PE, Brazil. [danielly\\_cantarelli@hotmail.com](mailto:danielly_cantarelli@hotmail.com)

This work was funded by UFPE and D. C. Oliveira received funds from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

## **Abstract**

Studies suggest that nutritional deficiencies may be related to suppression of the immune response in animals infected with *S. mansoni*, and is therefore capable of promoting bacterial translocation (BT). This study evaluated immunological aspects of the association between schistosomiasis and bacterial translocation in mice undernourished during the neonatal period. Female mice formed groups Nourished Infected (NI), Not Nourished Infected (NNI), Malnourished Infected (MI) and Malnourished Not Infected (MNI). We analyzed the body weight (BW), overall and differential counts of leukocyte, the occurrence of BT and levels of IFN- $\gamma$  and IL-10. The malnourished animals had a smaller gain than the BW nourished. There was a higher rate of BT in infected animals. Among those infected, a trend towards a higher incidence of BT in malnourished, however, the difference was not significant. There was a lower production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in MI group compared to NI. The overall counts of leukocyte was elevated in groups MI and NI. The numbers of neutrophils and monocytes were higher in the animals infected. The values of lymphocytes were shown to be increased in the group MI compared to MNI. It can be concluded that malnutrition modifies the immune response and appears to favor bacterial translocation in mice infected with *S. mansoni*.

**Keywords:** Schistosomiasis. Malnutrition. Bacterial translocation. Cytokines.

## **Introduction**

It is called microbial translocation the passage of viable micro-organisms and/or endotoxins through the mucosa and lamina propria of the digestive tract to the mesenteric lymph nodes and other organs (Rath and Wiest 2003). It is believed that translocation is a multifactorial phenomenon, whose predisposing factors are related to the physical conditions of the host, especially nutritional and immune status. For that to occur, there must be weakened immune system of the patient, abnormal microflora or breakdown of the defensive barrier of the intestinal mucosa, alone or in combination (Dwinell et al. 2003; Rath and Wiest 2003).

Schistosomiasis patients have, in addition to changes in the immune system (IS), damage to the intestine, portal system and mesenteric lymph nodes, situations favoring translocation. In a case series study, Ferraz et al. (2005) showed the prevalence of aerobic bacteria in mesenteric lymph nodes of patients with hepatosplenic schistosomiasis and conclude that the presence of these bacteria could be associated with translocation, consequently, play role in the occurrence of infectious postoperative complications. Lima et al. (2012), investigating the association between schistosomiasis and chronic microbial infections in mice, suggested a higher incidence of bacterial translocation (BT) in the presence of the disease. Corroborating, Weber Sobrinho (2012) also showed an increased incidence of BT in animals infected with *Schistosoma mansoni*.

Together with schistosomal infection, other parameters can affect immune responses and favor BT. Among them, energetic/proteic malnutrition, implicated in physiological and metabolic changes (Santhiago et al. 2006), especially if imposed during lactation, when it can be a stressor induces late changes in immune function (Queiros-Santos 2000). Nutritional deficiencies probably relate to the suppression of the immune response in animals infected with *S. mansoni* (Coutinho et al. 2007). In addition, authors believe that malnutrition is associated with atrophy of the intestinal mucosa, resulting in increased permeability and decreased intestinal enzymes, contributing to a change in this mechanical barrier (Rudles and Lin 1998, Ulusoy et al. 2003) and may benefit from the process of translocation.

Thus, the present study aimed to analyze the association between immunological aspects schistosomiasis and bacterial translocation in mice undernourished early.

## **Materials and Methods**

### **Animals and diets**

We used 32 mice, female, Swiss Webster strain, from the colony of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA / UFPE). Animals were kept

under controlled temperature (22-23 °C) and lighting (light/dark cycle of 12/12 hours). The study was approved by the Ethics Committee on the use of animals, of Biological Sciences Center, from Federal University of Pernambuco (CEUA-UFPE) and follows guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation with (COBEA).

Until 24 hours after birth, the animals were divided into two groups according to maternal diet: Nourished (N) (n=16) (17% casein) and Malnourished (M) (n = 16) (8% casein) (Table 1). Mothers received water and food *ad libitum*. After weaning (22 days of age), the animals of both groups became fed diet Labina (purina®), for nutritional replacement until the end of the experiments.

The animals' body weight was measured daily (in digital electronic scale - Gehaka ®) during lactation (21 days) and weekly from 22 days in order to keep the weight gain.

INGREDIENTS	17% CASEIN	8% CASEIN
Corn starch	41,01%	48,51%
Casein	18,89%	8,89%
Dextrinized starch	13,05%	16,65%
Saccharose	10%	12,1%
Soybean oil	7%	4%
Microcrystalline Cellulose	5%	5%
Mineral mix AIN 93 G	3,5%	3,5%
Vit Mix AIN 93	1%	1%
L Cystine	0,3%	0,1%
BHT	0,0014%	0,0008%
Choline bitartrate	0,25%	0,25%

**TABLE 1 - Composition of Diets Casein 8% and 17%, used in animal feed (AIN93-G PragSoluções biociências®)**

### Infection with *S. mansoni* and study groups

The infection was performed in thirty-fifth day of life of the animal, percutaneously. The mice were put in contact with approximately 30 cercariae, strain Belo Horizonte (BH), obtained from *Biomphalaria glabrata* snails maintained

by the Sector of Parasitology, Department of Tropical Medicine (UFPE). Confirmation of infection was performed after 45 days, by the Kato-Katz method.

Eight animals were infected in each group (N and M), constituting subgroups: Nourished Infected (NI), Not Nourished Infected (NNI), Malnourished Infected (MI) and Malnourished Not Infected (MNI).

Since the chronic phase of murine schistosomiasis is established from the 12th week of exposure to cercariae (Fallon 2000; Macdonald and Pearce 2002), given the time of experimentation for the study was 14 weeks of infection.

### **Evaluation of bacterial translocation**

After the period of experimentation, the mice were anesthetized for collect of peripheral blood by caudal puncture. Before collect, was performed strict asepsis of the tail and the body of the animal with povidone-iodine to avoid contamination of samples.

Then, the animals were euthanized by cervical dislocation and held after trichotomy and antisepsis, swordtail pubic midline incision with the aid of surgical scissors. Was collect the spleen, liver fragments, portal blood, feces and mesenteric lymph nodes from the middle region of the small intestine.

The spleen was immediately taken to the laminar flow, which withdrew fragments for microbiological culture and the rest was for the study of cellular immune response. Fragments of spleen, liver and mesenteric lymph nodes were macerated, homogenized separately in sterile petri plates, inoculated, as well as peripheral and portal blood, in vials containing BHI (Brain Heart Infusion - HIMEDIA®) and incubated in a bacteriological incubator at 37° C, for 48 to 72h.

Feces samples were mixed with the same amount of 0.9% sterile saline, homogenized and cultured on Petri plates containing culture medium.

All material collected was subjected to culture medium for the growth of aerobic gram-positive and gram-negative (blood agar and EMB Levine - HIMEDIA®). After growth (24 to 48 hours at 37 °C) were used conventional biochemical tests for the identification of bacteria.

It was microbial translocation the presence of micro-organism in culture from blood and/or organ homogenate, where it was present in the feces of the animal.

### **Evaluation of cytokine production**

Were obtained splenic cell suspensions by maceration of the spleen in medium RPMI 1640 (Invitrogen®) plus antibiotics (Penicillin and Streptomycin 1%) and amino acid (1% L-glutamine) and centrifuged for 5 min at 1500 RPM, under 4 °C. Red blood cells were lysed by addition of sterile water to precipitate during 18s. Cells were resuspended in RPMI medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Immunoqímica®) and viability observed by the use of Trypan Blue 10%. The cell suspensions were spread on culture plates with 48 wells in duplicate at a concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells/0.5 mL and subjected to different stimulus [Soluble Egg Antigen (SEA) - 20 ug/ml, Concanavalin A (ConA) - 500 mg/ml or Lipopolissacarídeo (LPS) - 5 g/ml] or simply culture medium (without stimulation), and then cultured for 48 hours at 37 °C in incubator of 5% CO<sub>2</sub>. Unstimulated cultures were used as internal negative control and we used cultures stimulated with mitogen (ConA) for positive control.

After the incubation period, the plates were centrifuged at 1500 RPM for 10 minutes, and the supernatants collected and stored in tubes properly identified.

The levels of cytokines IL-10 and IFN- $\gamma$  in the supernatant of cultures of splenocytes were assayed by enzyme immunoassay using the commercially available kits Quantikine® ELISA mouse IL-10 and Quantikine® ELISA mouse IFN- $\gamma$  (R&D Systems®), according to fabricant's instructions. The reading of absorbance was performed in an ELISA reader (Thermo plate microplate reader – TP Reader®), using a wavelength of 450 nm.

### **Search white blood cells**

To search for white blood cells, blood was obtained by cardiac puncture. The collect was performed with animals anesthetized, at the time prior to euthanasia. The extracted blood was deposited on the tube previously plus a drop (20 uL) of the anticoagulant ethylene diamine tetra acetic 3% - EDTA. The data of



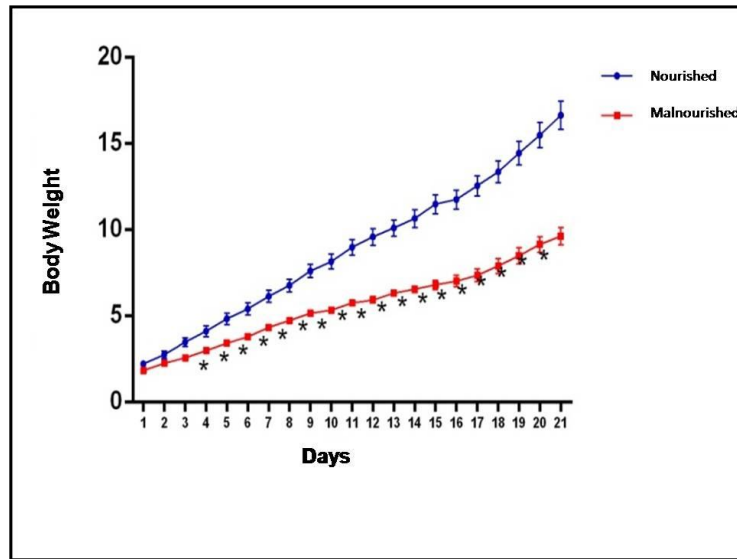
total leukocytes were automated and the number of neutrophils, lymphocytes, eosinophils and monocytes was determined from the evaluation of blood smear slides. The absolute number of each cell was determined for the total leukocyte from its one hundred percent found in leukocytes counted in the body of each blade.

### **Statistical Analysis**

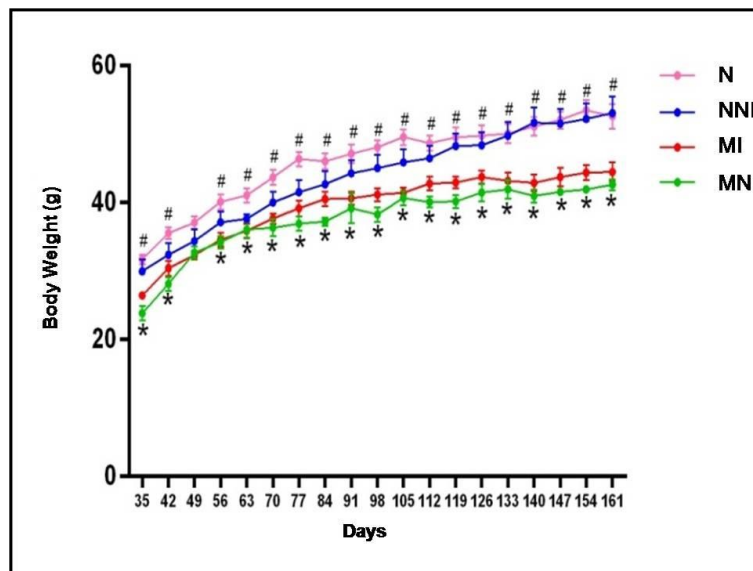
For comparative analysis of quantitative variables were applied Student t test, Mann-Whitney test or analysis of variance ANOVA. The results of weight gain were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Data cytokine production and leukocyte counts were represented as mean  $\pm$  standard error. For the analysis of qualitative variables we used the chi-square test. The statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The software used for the analyzes was SigmaStat® 2.0.

### **Results**

Evaluation of the weight outcome revealed that malnourished animals had lower body weight gain compared to normal weight from day 4 ( $p < 0.05$ ) (Graph 1), difference observed throughout their lifetime (Graph 2). There were no significant differences when comparing infected mice and without infection (MI *versus* MNI or NI *versus* NNI).



**GRAPH 1** – Curves of weight nourished and undernourished mice from the 1<sup>st</sup> to the 21<sup>st</sup> day of life. Data as mean  $\pm$  SD - *Student t test*, \*  $p < 0.05$ .



**GRAPH 2** - Weight curves of mice from the 35<sup>th</sup> until the 161<sup>st</sup> day of life. NI - Nourished Infected, NNI - Nourished Not Infected, MI - Malnourished Infected, MNI - Malnourished Not Infected. Data as mean  $\pm$  SD - *Student t test*.

\* Difference between NI and MI ( $p < 0.05$ )

# Difference between NNI and MNI ( $p < 0.05$ )

The absolute and relative frequency of the incidence of bacterial translocation by groups are shown in Table 2. It was found a higher rate of

translocation in infected groups when compared to uninfected ( $p < 0.05$ ). Among those infected, a trend towards a higher incidence of translocation in the malnourished group compared to the fed, but the difference was not significant.

Groups	Incidence of bacterial translocation
Nourished Infected	4/8 (50%) <sup>a</sup>
Malnourished Infected	7/8 (87,5%) <sup>b</sup>
Nourished Not Infected	0/8 (0%)
Malnourished Not Infected	1/8 (12,5%)

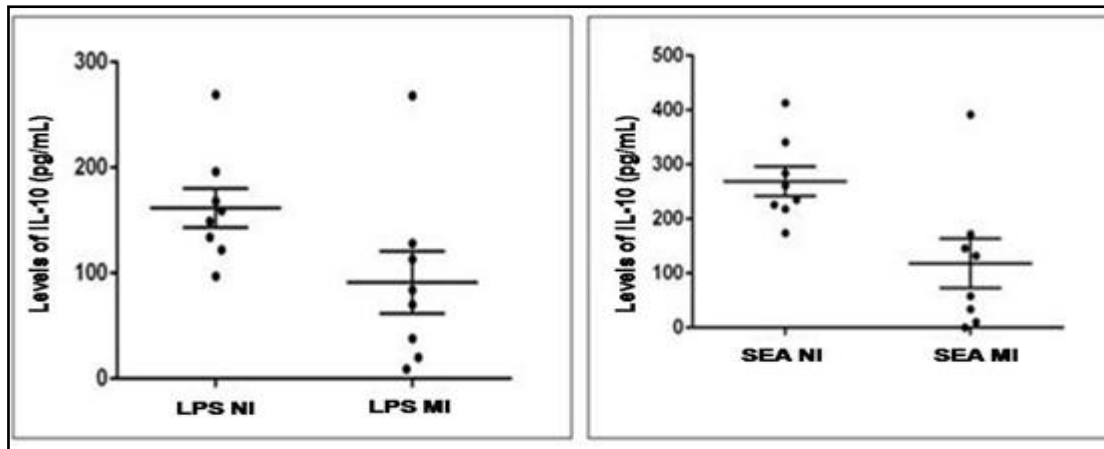
**TABLE 2** – Incidence of bacterial translocation according to the comparison groups. Data such as absolute and relative frequency - *Chi-Square*.

<sup>a</sup> Difference between Nourished infected and Nourished Not Infected ( $p=0,021$ )

<sup>b</sup> Difference between Malnourished Infected and Malnourished Not Infected ( $p=0,003$ )

The bacterial isolates responsible for translocation in nourished animals were *Bacillus* sp., *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus rettgeri* and *Staphylococcus saprophyticus*. In malnourished animals were found *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* and *Staphylococcus saprophyticus*.

The levels of IL-10 in culture supernatants of spleen cells were shown to be higher in group NI, when compared to the MI group ( $p < 0.05$ ). (Graph 3).

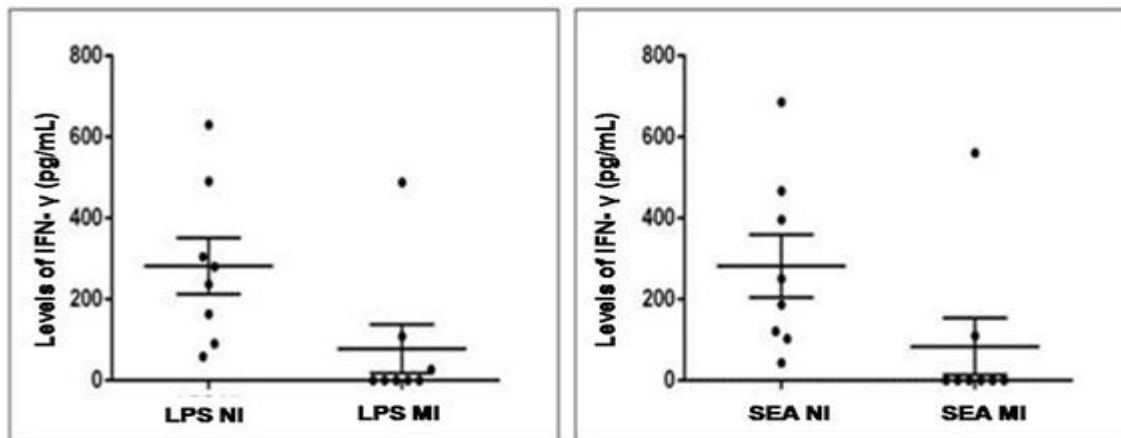


**GRAPH 3** - Production of IL-10 in culture supernatants of splenocytes of mice infected with *S. mansoni*, second stimulus. LPS - lipopolysaccharide from *E. coli*, SEA - Soluble Egg Antigen *S. mansoni*, NI - Nourished Infected, MI - Malnourished Infected. Data as Mean  $\pm$  Standard Error - *Mann Whitney*.

\* LPS: NI x MI ( $p=0,021$ )

\*\* SEA: NI x MI ( $p=0,007$ )

Regarding the production of IFN- $\gamma$ , we observed lower levels in the MI group, when compared to the NI group ( $p < 0.05$ ) (Graph 4).

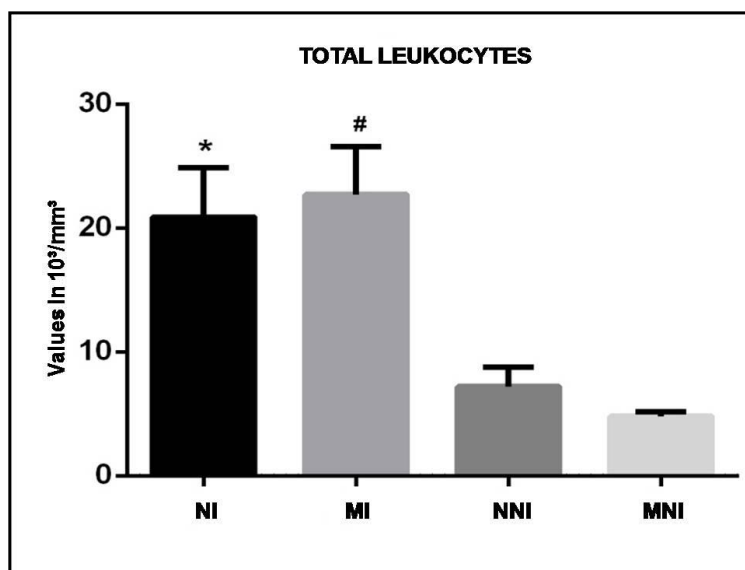


**GRAPH 4** – Production of IFN- $\gamma$  in culture supernatants of splenocytes of mice infected with *S. mansoni*, second stimulus. LPS - lipopolysaccharide from *E. coli*, SEA - Soluble Egg Antigen *S. mansoni*, NI - Nourished Infected, MI - Malnourished Infected. Data as Mean  $\pm$  Standard Error - *Mann Whitney*.

\* LPS: NI x MI ( $p=0,009$ )

\*\* SEA: NI x MI ( $p=0,011$ )

The total number of leukocytes was compared between groups, according to nutritional status and infection. There was an increase in the values of the infected groups compared to controls, both for the group N, and for the M ( $p < 0.001$ ). No differences were found between animals infected (NI versus MI), nor between uninfected (NNI versus MNI) (Graph 5).

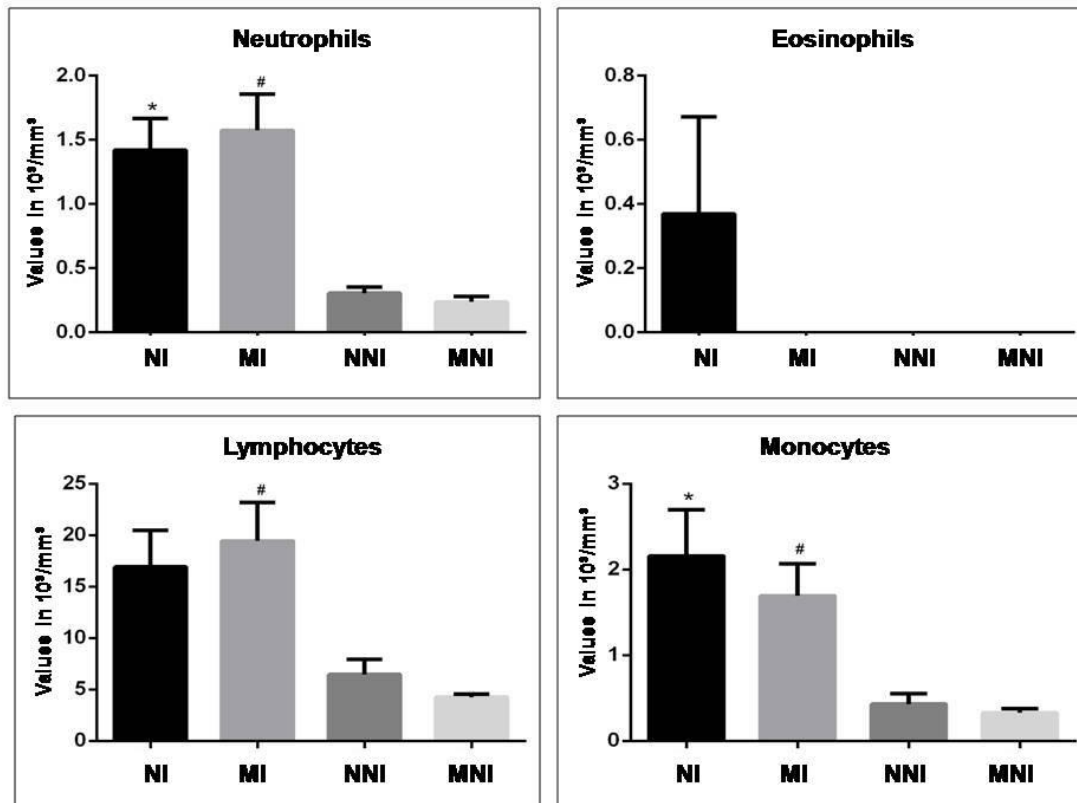


**GRAPH 5** - Total leukocytes from cardiac blood, according to the comparison groups. NI - Nourished infected, MI - Malnourished Infected, NNI - Nourished Not Infected, MNI - Malnourished Not Infected. Data as mean  $\pm$  standard error. ANOVA Analysis of variance.

\* Difference between NI and NNI ( $p < 0.001$ )

# Difference between MI and MNI ( $p < 0.001$ )

Analyzing differential leukocyte count, there is an elevation in neutrophils and monocytes values in NI and MI groups, were compared to groups NNI and MNI, respectively ( $p < 0.001$ ). Among the infected groups, doesn't have significant differences. The eosinophil count was found to be similar between groups. The number of lymphocytes appeared higher in the group MI, as compared to the MNI ( $p < 0.001$ ), whereas among other comparative groups showed no differences (Graph 6).



**GRAPH 6** – Differential Leukocyte count of blood heart, second comparison groups. NI - Nourished infected, MI - Malnourished Infected, NNI - Nourished Not Infected, MNI - Malnourished Not Infected. Data as mean  $\pm$  standard error. ANOVA with post hoc Tukey.

\* Difference between NI and NNI ( $p < 0,001$ )

# Difference between MI and MNI ( $p < 0,001$ )

## Discussion

In the study, we used model of malnutrition imposed during lactation, followed by nutritional supplementation. Lactation is a critical period for the development of mammals and is important for establishing the phenomenon of programming (Moura and Passos 2005, Moura et al. 2008). Soon, nutritional factors such as malnutrition, when imposed on the mother during this phase may influence the growth of offspring (Corrêa 2009).

It is known that infants rats fed with protein restriction have hypophagia caused by a combination of hypoprolactinaemia and hyperleptinemia (Lisboa et al.

2006). Consequently start to transfer a milk deficient in protein and volume to their offspring (Passos et al. 2000). Corroborating previous data (Porto et al., 2006, Souza et al. 2008, Corrêa 2009, Costa et al. 2012), which demonstrated the effect of permanent weight deficit promoted by nutritional aggression when imposed during gestation and lactation, the low protein diet used affect directly the weight gain of the animals from the 4<sup>th</sup> day of life, leading to retardation of weight gain of the lactation period to adulthood.

The offer of a normal protein diet (Labina®) from weaning, seems not to have been effective in recovering the deficiency of body weight caused still breastfeeding, a phenomenon previously observed in studies with the same model of malnutrition (Delmondes 2009, Severo 2009, Costa et al. 2012).

The nutritional status of both groups seems not to have been influenced by the *Schistosoma mansoni* infection, since infected animals presented, in weight evolution, behavior similar to their respective uninfected controls. These findings are in agreement with the observations made by previous studies (Coutinho et al., 2003, Coutinho et al., 2007, Silva 2008). In contrast, Lima et al. (2012) found that mice with schistosomiasis had reduced weight evolution when compared to controls. It is noteworthy that the study by Lima et al. (2012), animals were infected with a higher load cercarial (50 cercariae), which may have contributed to the difference found.

Nutritional status is a key modulator of the immune response, which on the one hand, an important determinant of risk and prognosis of infectious diseases and, secondly, directly influenced by infection (Scrimshaw and San Giovanni 1997). Coutinho et al. (1992) report that the protein malabsorption caused in malnourished mice is exacerbated when animals are exposed to infection by *S. mansoni*.

Schistosomiasis patients may exhibit impaired mesenteric circulation per share traumatic and irritating espoliativa of adult parasites that feed on blood vessels and block (Katz and Almeida 2003). Additionally, there is an immunodepression in the chronic phase of the disease, apparently due to an increase in the secretion of Th2 cytokine profile, with a decrease in the secretion of

IFN- $\gamma$  (Ribeiro de Jesus et al. 2000). Such events may favor the occurrence of bacterial translocation (BT), and allow the installation of sepsis (LIMA et al. 2012).

Meanwhile, it is known that malnutrition leads to impairment of mucosal enzyme activity, decreased absorption of nutrients and glutamine, mesenteric blood flow fall, and impaired immune function and intestinal barrier (Chandra 1983), conditions known to facilitate translocation. Therefore, we measured the rate of occurrence of BT in mice malnourished and well-nourished, infected or not by *S. mansoni*.

The analysis suggests a greater occurrence of translocation in infected mice compared with controls without infection. These results corroborate studies Lima et al. (2012) and Weber Sobrinho (2012), who also found a high incidence of BT in mice during the chronic infection with *S. mansoni*.

It is reported that Gram-negative aerobic bacteria translocate with relative ease, even in individuals with no injured enterocytes intact. Although there are studies showing that BT may occur independently of changes in the gastrointestinal tract and is called translocation saline (Rath and Wiest 2003), it was not observed in the present study, since it did not occur in animals free of intervention. In malnourished animals not infected, we observed only one case of BT, probably due to immunological changes and/or intestinal mucosa resulting from malnutrition, as quoted by Pereira (2005).

Among infected animals, a trend towards a higher incidence of BT in the undernourished group, but the observed difference was not significant. It was expected a higher incidence of BT in the undernourished group, since the overlap of the infection to malnutrition aggravates the situation of immunosuppression in animals, besides increasing predisposing factors for the occurrence of TB, previously cited. It is believed, therefore, that the lack of statistical significance occurred due to sample size seen in this study.

Some of the isolates were described by Ferraz et al. (2005), Lima et al. (2012) and Weber Sobrinho (2012), and recently quoted as belonging to the group of intestinal bacteria are able to translocate (Fouts et al. 2012). All bacteria were



previously described to be part of the enteric microflora of mice (Minagawa 2007, Lima et al. 2012, Weber Sobrinho 2012).

It is suspected that occurrence of BT in animals is partly due to changes in immunological pattern resulting from infection. The type of immunity found in mice infected with *S. mansoni* shows variations in Th1/Th2 profiles with disease progression. In the early stages of infection, the response is predominantly Th1-type and, as the immature forms will be developing, copulating and producing eggs, which was predominantly Th1 response is replaced by the predominance of Th2 response, induced mainly by egg antigens *S. mansoni* (Flores-Villanueva et al. 1993, Cheever et al. 2000).

During the chronic phase, the observed profile is characterized by a low production of IFN- $\gamma$  and increased production of Th2 cytokine, such as IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (Ribeiro de Jesus et al. 2000). The IL-10 to act on the Th1 and Th2 to divert it, precludes the synthesis of IFN- $\gamma$ , important for T cell proliferation and activation of macrophages, causing an immunodeficiency, that could facilitate BT.

Weber Sobrinho (2012), assessing levels of cytokines in murine model of infection with *S. mansoni* associated with bacterial translocation/ post splenectomy sepsis therapy, found higher levels of IL-10 in mice with schistosomiasis, and observed greater occurrence of translocation in this group. Fock et al. (2008) found that malnourished animals are capable of producing higher levels of IL-10 when compared to those fed after infection with LPS. Moreover, Costa et al. (2012) found no differences in IL-10 between groups of animals nourished and underwent neonatal malnutrition.

Against our expectations, the levels of IL-10 produced in this study were lower in malnourished animals infected compared to infected nourished. It is assumed that the immunosuppression caused by malnutrition in the critical period of development of the animal has reached such proportions that there was one deficit, including the production of IL-10, opposite the chronic infection with *S. mansoni*.

Similarly, the production of IFN- $\gamma$  by splenocytes was also compromised by neonatal undernutrition. The data obtained in this study demonstrate that spleen cells from mice malnourished offer lower production of IFN- $\gamma$ . These results

corroborate partly those obtained by Ishikawa et al. (2009), which reported a reduction in IFN- $\gamma$  production in undernourished groups of animals when compared to animals fed on culture of spleen cells stimulated with LPS. Another study, carried out by Silva (2008) found no detectable levels of IFN- $\gamma$  in mice malnourished and eutrophic front of chronic infection with *S. mansoni*, not ruling out the possibility of there having been a production below the sensitivity of the test applied.

The organic changes caused by malnutrition and by schistosome infection, as well as for BT, can lead to changes in standard laboratory tests, such as total and differential counts of leukocytes. The interpretation of laboratory requires assessing whether the result is normal or not. Once rarely have information to make this statement, it is necessary, instead, consider if the result is what would be expected in a healthy individual, biologically so similar as the individual in question (Bain 1997).

The study of leukocyte count in mice demonstrated an increase in total leukocytes of animals infected with *S. mansoni*, in both groups, confirming the results obtained by Ramos (2004), who also found a leukocytosis in mice subjected to chronic infection. Atta et al. (1981), mention that the total leukocytes from mice infected with *S. mansoni* increase as the outcome of infection. The total leukocyte count does not seem to have been influenced by malnutrition, since the values were similar in nourished and undernourished animals. These results are in agreement with those of Melo et al. (2008), whose data leukocyte count in peripheral blood indicate that neonatal malnutrition does not change the total number of leukocytes in adult rats.

We also evaluated the leukocyte count. We observed an elevation in neutrophils and monocytes values of the two groups infected. Our data are discordant results obtained by Ramos (2004), who found neutropenia in mice infected as well as those found by Atta et al. (1981), who observed a similar behavior of monocytes in animals infected and uninfected. It is believed that the presence of bacteria in blood and/or organs as a result of translocation, may have modified the standard leukocyte stimulating neutrophilia and monocytosis. According to Bain (1997), the usual response to bacterial infection is neutrophilia,

increased neutrophil count, reducing the counts of eosinophils. Malnutrition did not promote changes in the presentation of neutrophils and monocytes, partly corroborating the data mentioned by Melo et al. (2008), who found similarities in the values of neutrophils, a reduction in the number of monocytes in undernourished rats.

Although eosinophilia is frequent in parasitic infections, no differences were found between the groups analyzed, corroborating the findings of Atta et al. (1981), who encountered similar behavior of eosinophils in mice infected and uninfected. The absence of eosinophilia in this study may have been a result of microbial infection caused by BT, since reduction of eosinophils is observed in bacterial infection (Bain, 1997).

Atta et al. (1981) report that the number of lymphocytes tends to increase during the schistosome infection, but these data were observed in our study only in malnourished animals. Among nourished, there was no change caused by infection. Moreover, Melo et al. (2008) found an increase in the number of lymphocytes of malnourished animals, going against our study, where the malnutrition no induced significant differences.

The data about the immune responses involved in the BT and schistosomiasis, especially when associated with malnutrition, are scarce or conflicting. Therefore, additional studies are needed to better understand the immunology of infectious and parasitic diseases associated with nutritional disorders.

## **Conclusions**

Neonatal malnutrition caused changes in the immune response of mice infected with *S. mansoni*, promoting a reduction in the levels of IL-10 and IFN- $\gamma$ , conditions that may have favored the occurrence of bacterial translocation in animals. The counts total and differential leukocytes were not modified by malnutrition.

## Acknowledgements

The authors thank Dra. Maria Helena Lima Ribeiro Madruga, veterinary of Laboratory of Immunopathology Keizo Asami - LIKA / UFPE, for your great cooperation during this work.

## References

- Atta AM, Magalhães LA, Alcântara FG, Pareja G (1981) Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. *Ver Saúde Publ* 15: 72-92.
- Bain BJ (1997) Células sanguíneas um guia prático. 2º Ed. Artes Médicas. Porto Alegre.
- Chandra RK (1983) Nutrition, immunity and infection: present knowledge and future directions. *Lancet* 26: 688-691.
- Cheever AW, Hoffmann KF, Wynn TA (2000) Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol Today* 21(9): 465-6.
- Corrêa CL (2009) Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação. Thesis. Universidade do estado do Rio de Janeiro, Brazil.
- Costa TB, Morais NG, Almeida TM, Severo MS, Castro CMMB (2012) desnutrição neonatal e produção de IFN- $\gamma$  IL-12 e IL-10 por macrófagos/ linfócitos: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *Staphylococcus aureus* metilicina sensível e metilicina resistente. *Rev Nutr* 25(5): 607-619.
- Coutinho EM et al. (2003) Host nutritional status as a contributory factor to theremodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 919–925.
- Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araujo RE, Oliveira SA, Luna CF, Barbosa- Jr AA, Andrade ZA (2007) Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. *Acta Tropica*, 101(1): 15–24.
- Coutinho EM, Freitas LPCG, Abath FGC (1992) The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 13-20.
- Delmondes GMB (2009) Repercussão do treinamento físico moderado e intenso nos mecanismos de defesa de ratos adultos desnutridos precocemente. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco
- Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM (2003) Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa *Surgery*, 133(1): 601-607.
- Fallon PG (2000) Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology Today* 21(1): 29-35.

- Ferraz AAB, Campos JM, Araújo Júnior JGC, Albuquerque AC, Ferraz EM (2005) Gut Bacterial Translocation and Postoperative Infections: A Prospective Study in Schistosomal Patients. *Surg Infect* 6: 197-201.
- Flores-Villanueva PO et al. (1993) Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 151: 3192-8.
- Fock RA, Vinolo MAR, Crisma AR, Nakajima K, Rogero MM, Borrelli P (2008) Protein energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. *J Nutr Sci Vitaminol* 54(5):3717.
- Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B (2012) Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *J Hepatol* 56(6): 1283-92.
- Ishikawa LLW, França TGD, Chiuso Minicucci F, Zorzellapezavento SFG, Marra NM, Pereira PCM (2009) Dietary restriction abrogates antibody production induced by a DNA vaccine encoding the mycobacterial 65 kDa heat shock protein. *Genet Vaccines Ther* 7:11.
- Katz N, Almeida K (2003) Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult* 55(1): 38-43.
- Lima KM, Aires AL, Lucena LRR, Almeida TM, Albuquerque MCPA, Castro CMMB (2012) Fatores que influenciam a translocação bacteriana em camundongos com esquistossomose crônica. *Acta Gastroenterol Latinoam* 42:309-320.
- Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCP, Bonomo LT, Denolato ATA, Reis AM, Moura EG (2006) Leptin and Prolactin, but not corticosterone, Modulate Body Weight and Thyroid function in Protein-Malnourished Lactating rats. *Horm Metab Res* 38:1-5.
- Melo JF, Macedo EMC, Silva RPP, Viana MT, Silva WTS, Castro CMMB (2008) Efeito da desnutrição neonatal sobre o recrutamento celular e a atividade oxidante-antioxidante de macrófagos em ratos adultos endotoxêmicos. *Rev Nutr* 21(6):683-694.
- Minagawa CY (2007) Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpes de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. Dissertation. Universidade de São Paulo, Brazil.
- Moura EG, Santos RF, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes AT, Oliveira E, Passos MC (2008) Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats – the role of leptin and deiodinase activities. *Horm Metab Res* 40(1): 1-7.
- Moura EG, Passos MCF (2005) Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* 25(3/4): 251-269
- Passos MCF, Ramos CF, Moura EG (2000) Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr Res* 20(11): 1603-1612.
- Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews* 2: 499-511.
- Pereira MAG (2005) Influência da desnutrição energético-proteica no processo de translocação bacteriana em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos. Dissertation. Faculdade de Farmácia da UFMG, Brazil.
- Porto SMMS, Araújo FRG, Melo JF, Silva RR, Silva KMF, Castro CMMB (2006) Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos

- no período neonatal. Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco 51(1): 59-65.
- Queiros-Santos A (2000) Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Ramos JA (2004) Ações da dexametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênicos. Dissertation. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.
- Ribeiro de Jesus, A et al. (2000) Human immune responses to *Schistosoma mansoni*: vaccine candidate antigens. Infection and Immunity 68: 2757-2803.
- Rudles C, LIN DH (1998) Nutrition and the immune system of the gut. Nutrition 14: 573-579.
- Santhiago V, Da Silva ASR, Gobatto CA, De Mello MAR (2006) Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. Rev Bras Med Esporte 12(2): 76-80.
- Severo MS (2009) Função microbicida de macrófagos alveolares de ratos submetidos à desnutrição neonatal: estudo da infecção celular, *in vitro*, por *staphylococcus aureus* metilicinasensível e metilicina resistente. Dissertation. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Scrimshaw NS, San Giovanni JP (1997) Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. Am J Clin Nutr 66(2): 464S-477S.
- Silva FL (2008) Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni*. Dissertation. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil.
- Souza SL, Orozco-Solis R, Grit I, Castro RM, Bolaños-Jiménez F (2008) Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. Eur J Neurosci 27:1400-1408.
- Ulusoy H, Usul H, Aydin S, Kaklikaya N, Cobanoglu U, Reis A, Akyol A, Ozen I (2003) Effects of immunonutrition on intestinal mucosal apoptosis, mucosal atrophy, and bacterial translocation in head injured rats. Journal of Clinical Neuroscience 10(5): 596-601.
- Weber Sobrinho CR (2012) Associação entre esquistossomose mansônica e translocação bacteriana/sepsis: perfil de citocinas na infecção crônica em camundongos submetidos à esplenectomia. Thesis. Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.
- Wiest R, Rath HC (2003) Bacterial translocation in the gut. Best Pract Res Clin Gastroenterol 17: 397-425.

## ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 06 de agosto de 2012.

Ofício nº 465/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**  
Departamento de Medicina Tropical  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.017352/2012-68

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Associação entre esquistossomose mansônica e translocação microbiana: estudo dos aspectos imunológicos em camundongos submetidos à desnutrição neonatal"**.

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

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

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

Origem dos animais: Biotério do LIKA - UFPE; Animais: Camundongos; Linhagem: Swiss webster; Sexo: fêmeas; Idade: 45 dias; Peso: 50 gramas; Número de animais previsto no protocolo: 60

Atenciosamente,

Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver