



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Christiane Leal Corrêa**

**Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em  
animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação**

**Rio de Janeiro**

**2009**

Christiane Leal Corrêa

Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Patrícia Cristina Lisboa

Coorientador: Dr. José Roberto Machado e Silva

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / RDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

C824 Corrêa, Christiane Leal.

Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação / Christiane Leal Corrêa. – 2009.  
77 f. : il.

Orientador: Patrícia Cristina Lisboa.

Coorientador: José Roberto Machado e Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Esquistossomose – Teses. 2. Parasitologia – Teses. 3. Histologia – Teses. 4. Desnutrição – Teses. 5. Lactação – Teses. I. Lisboa, Patrícia Cristina. II. Silva, José Roberto Machado e. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.995.122

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Christiane Leal Corrêa

**Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Patrícia Cristina Lisboa (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup> Elaine de Oliveira  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Renata Heisler Neves  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Prof<sup>a</sup> Karen de Jesus Oliveira e Sanchez  
Instituto Biomédico – UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Marta Guimarães Cavalcanti  
Instituto de Microbiologia – UFRJ

Rio de Janeiro

2009

## **DEDICATÓRIA**

À minha família, alicerce da minha vida. Estiveram ao meu lado em todos os momentos, alegres ou difíceis. Vocês são meu fundamental motivo para buscar ser exemplo. Muito obrigada do fundo do meu ser. AMO VOCÊS!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus estimados orientadores: Prof<sup>ª</sup> Patrícia Cristina Lisboa e Prof. José Roberto Machado e Silva, que com seus exemplos de profissionais éticos, competentes, dedicação à pesquisa e, acima de tudo AMIGOS, puderam tornar este aprendizado um período inesquecível em minha formação. Serei eternamente grata pela honra de tê-los como orientadores.

Ao prof. Egberto Gaspar de Moura – pelo incentivo e apoio concedido e pelo seu exemplo à pesquisa.

À Prof<sup>ª</sup> Elaine de Oliveira, pelo apoio freqüente e gentileza na revisão da tese.

À Prof<sup>ª</sup> Renata Heisler Neves, pelos esclarecimentos fundamentais para poder avançar no conhecimento.

Aos meus professores do FISCLINEX que tanto me ensinaram e me fascinaram com seus esclarecimentos: Prof. Alex Manhães, Prof. Aníbal Sanchez Moura, Prof<sup>ª</sup> Rosely Sichieri, Prof. José Uereles Braga, Prof. Egberto Gaspar de Moura, Prof<sup>ª</sup> Patrícia Cristina Lisboa, Prof. José Roberto Machado e Silva, Prof. Roberto Soares, Prof<sup>ª</sup> Yael Villaça, Prof<sup>ª</sup> Celly Alves, a todos vocês o meu muito obrigada, pois colocaram em mim muito além do querer fazer pesquisa.

Aos Profs. Jorge José de Carvalho e Waldemar Silva Costa pela presteza no auxílio da captura das imagens histológicas.

Ao Prof. Mário José dos Santos Pereira pelo auxílio no uso do programa Image Pró.

À Prof<sup>ª</sup> Regina Maria Figueiredo de Oliveira por compartilhar seus conhecimentos científicos, expressar suas opiniões que só acrescentam ao trabalho.

Ao Pedro Paulo de Abreu Manso do Departamento de Patologia, IOC/Fiocruz pela assistência no uso da Microscopia Laser Confocal.

À Dra. Lygia dos Reis Corrêa do Departamento de Malacologia, IOC/Fiocruz pelo fornecimento das cercárias da cepa BH de *Schistosoma mansoni*.

Aos professores e funcionários da Disciplina de Parasitologia. Departamento de Patologia e Laboratórios, FCM/UERJ pelo bom convívio que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Helminologia Romero Lascasas: Alba Cristina Miranda de Barros Alencar, Michele Costa da Silva, Lucas de Andrade Barros, Vanessa

Coelho de Góes, Frederico Wallace Leitão, Luciana Brandão Bezerra, Adriana Cardoso Gomes, Adriana Matias da Silva.

Aos demais estagiários do Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto.  
Disciplina de Parasitologia, Departamento de Patologia e Laboratórios/FCM/UERJ.

A todos da minha família, pelo apoio e amor.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À meu grande amigo que me dá forças para prosseguir e me alimenta com o pão do céu – DEUS.

Em uma de suas mais preciosas frases, Madre Tereza de Calcutá pedia a Deus:

- "Senhor, permita-me que, quando alguém falar comigo, ao se afastar de minha presença tenha se tornado uma pessoa melhor".

A profundidade de tão simples palavras revela bem o significado de nossa presença neste mundo: que tratemos nossos semelhantes como gostaríamos de ser tratados, que sejamos veículo de exemplos dignificantes e fontes de influências positivas, contribuindo para que do mundo se torne um lugar cada vez melhor.



## RESUMO

CORRÊA, Christiane Leal. *Estudo parasitológico e histopatológico da infecção esquistossomótica em animais adultos cujas mães foram desnutridas na lactação*. Brasil. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, RJ, 2009.

Estudos mostram uma grande associação entre alterações nutricionais, hormonais ou ambientais durante períodos críticos da vida, como a gestação e lactação, e o surgimento de doenças crônicas na vida adulta tais como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares, decorrentes de alterações fisio-adaptativas do organismo. Esse fenômeno biológico é denominado programação metabólica. No presente trabalho, avaliamos a resposta parasitológica e histopatológica, durante a fase aguda da infecção, em camundongos adultos infectados com *Schistosoma mansoni* no modelo de programação pela desnutrição materna na lactação. Ao nascimento da ninhada, as lactantes foram divididas em: (C) controle - livre acesso a ração normal com 23% de proteína; (RP) restrição protéica - livre acesso a dieta com 8% de proteína; (RC) restrição calórica - acesso restrito à ração controle, cuja quantidade foi calculada de acordo com a ingestão do grupo RP. A restrição alimentar foi mantida até o final da lactação. Pós-desmame, todos os filhotes tiveram livre acesso à ração. A infecção das proles de 60 dias de idade foi por via transcutânea com 50 cercárias (cepa BH). O sacrifício ocorreu após 9 semanas de infecção (120 dias de vida). Avaliamos ingestão alimentar, peso e composição corporais, massa tecidual, hormônios séricos, além de morfometria, concentração de colágeno e a resposta inflamatória celular dos granulomas hepáticos. Nos vermes adultos recuperados avaliamos a infectividade e a morfologia do sistema reprodutor e tegumento. No estudo parasitológico foi avaliado o número de ovos eliminados nas fezes e o percentual de estágios evolutivos (oograma). A desnutrição materna pós-natal programou a prole RP para menor ganho de peso e hipofagia e a prole RC para sobrepeso e hiperfagia. O período pré-patente foi mais longo (45 dias) em ambas as proles programadas. Aos 55 dias de infecção com *S. mansoni*, o grupo RP apresentou maior número de ovos nas fezes. Este grupo apresentou maior número de ovos totais nas porções intestinais e fezes, assim como aumento de ovos em todos os estágios evolutivos. Observamos que os vermes machos e fêmeas obtidos das proles RC e RP apresentaram alterações no sistema reprodutor e na estrutura do tegumento. O grupo RP infectado apresentou maior grau de lesão hepática provocada pelo número aumentado de áreas alteradas pelo estágio pré-granulomatoso classificado por exsudativo, menor capacidade de produção de colágeno e maior manifestação inflamatória, caracterizando uma deficiência na modulação do processo inflamatório. Já o grupo RC mostrou menor número de granulomas hepáticos, maior produção de colágeno e vários hepatócitos binucleados, portanto, apresentando melhores condições para modular a resposta inflamatória e melhor capacidade de regeneração hepática diante da presença de lesão, apresentando uma relação parasito-hospedeiro mais equilibrada. O conjunto dos nossos achados sugere que a desnutrição neonatal programou o estado metabólico do hospedeiro repercutindo na evolução da esquistossomose, onde o grupo RC apresentou maior habilidade na modulação da resposta inflamatória e o grupo RP exibiu fragilidades nesta complexa, mas fascinante, relação parasito-hospedeiro. Assim, a programação pela desnutrição materna na lactação afeta a evolução da esquistossomose murina experimental.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Mal nutrição. Lactação.

## ABSTRACT

Studies have shown a strong association between nutritional, hormonal or environmental changes during critical periods of life, as pregnancy and lactation, and chronic diseases in adult life such as obesity, diabetes and cardiovascular disease, due to body physiological adaptive changes. This biological phenomenon is called metabolic programming. In the present study, we evaluated parasitological behavior and histopathological response during the acute phase of infection in adult mice infected with *Schistosoma mansoni* in the programming model by maternal malnutrition during lactation. At birth, mothers were divided into: (C) control - free access to normal diet with 23% protein, (PR) protein restriction - free access to diet with 8% protein, (CR) caloric restriction - restricted access to C diet, the amount was calculated according to the PR group intake. Malnutrition was maintained until the end of lactation. Post-weaning, all pups had free access to food. At 60 days-old, offspring was infected percutaneous with 50 cercariae (BH strain). Offspring were killed after 9 weeks of infection (120 days). We evaluated food intake, body weight and body composition, tissue mass, serum hormones, and morphometry, collagen concentration and cellular inflammatory response of the liver granulomas. In adult worms recovered, we analysed infectivity and the morphology of the reproductive system and tegument. The parasitological parameters were assayed by the number of eggs in the stool and the percent of evolutive stages (oogram pattern). Postnatal maternal malnutrition programs PR offspring for lower weight gain and hypophagia and CR offspring for overweight and hyperphagia. The prepatent period was longer (45 days) in both programmed offspring. At 55 days of infection with *S. mansoni*, PR group had higher number of eggs in the feces. This group had higher number of eggs in feces and intestinal parts as well as higher eggs in all stages of development. We found that male and female worms obtained from the PR and CR offspring showed changes in the reproductive system and structure of the tegument. PR-infected group showed a higher degree of liver damage caused by the increased number of areas altered by the pre-granulomatous exudative sorted by lower capacity to produce more collagen and inflammatory manifestations, indicating a deficiency in the modulation of the inflammatory process. Since CR-infected group showed lower liver granulomas, increased production of collagen and several binucleate hepatocytes, thus providing better conditions to modulate the inflammatory response and increased power of liver regeneration in the presence of injury, presenting a host-parasite relationship more balanced. Taken together, our findings suggest that neonatal malnutrition programs the metabolic state of the host with the consequent evolution of schistosomiasis, where CR group showed higher ability in modulating the inflammatory response and the PR group exhibited weaknesses in this complex, but fascinating, host-parasite relationship. Thus, the programming by malnutrition during lactation affects the development of experimental murine schistosomiasis.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Malnutrition. Lactation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema dos helmintos adultos de *Schistosoma mansoni* - Segmento anterior do corpo do macho (à esquerda) e da fêmea (à direita) de *Schistosoma mansoni* mostrando esquematicamente os principais órgãos internos: a, ventosa oral; b, porção anterior do intestino; c, ventosa ventral; d, vesícula seminal; e, canal deferente; f, lóbulos testiculares; g, porção média bifurcada do intestino; h, ceco; i, orifício genital feminino; j, útero contendo dois ovos; k, ovo; l, oviduto; m, ovário; n, viteloduto; o, glândulas vitelinas (Segundo Rey, 2001). 26
- Figura 2** - Ciclo de vida do *S. mansoni*. O esquema mostra as etapas do ciclo, no meio aquático, no hospedeiro intermediário e finalmente no hospedeiro vertebrado (Dunne & Cooke, 2005). 31
- Figura 3:** Massa corporal ao desmame (21 dias) dos filhotes dos grupos C (n= 23), RC (n= 22) e RP (n=30). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,0001$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vs RC). 42
- Figura 4:** Massa corporal (A) e ingestão alimentar (B) aos 120 dias de idade das proles controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) não infectadas e infectadas. n=10/grupo. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RCI vs RC; # vs C, & vs RC). 43
- Figura 5:** Massa de gordura visceral (MGV) na 17<sup>a</sup> semana de vida da prole programada não infectada e infectada dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RC vs RCI; & vs RP). 44
- Figura 6:** Conteúdo corporal de gordura total na 17<sup>a</sup> semana de vida da prole programada não infectada e infectada dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RCI vs RC; RPI vs RP; # vs C). 45
- Figura 7:** Conteúdo corporal de proteínas totais na 17<sup>a</sup> semana de vida da prole programada não infectada e infectada dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção. 46
- Figura 8:** Peso do fígado dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* vs prole não infectada). 47
- Figura 9:** Peso do baço dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de

Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* vs prole não infectada). 47

**Figura 10:** Peso dos rins dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RC vs RCI; # vs C; & vs RC). 48

**Figura 11:** Peso do intestino dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção. 48

**Figura 12:** Concentração sérica de corticosterona dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (# vs C). 49

**Figura 13:** Concentração sérica de leptina dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (# vs C e \*RC vs RCI). 50

**Figura 14:** Eliminação média de ovos observados nas fezes de camundongos dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C aos 40 dias;  $\Delta$  vs C e RC aos 55 dias). 51

**Figura 15:** Número de ovos na porção distal do intestino delgado das proles C (A), RC (B) e RP (C). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (@ vs todos). 52

**Figura 16:** Oograma no segmento da porção distal do intestino delgado das proles C, RC e RP. (A) Imaturos, (B) Maduros, (C) Mortos e (D) Cascas de ovos. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C, & vs RC). 53

**Figura 17:** Média da carga de ovos nos segmentos intestinais das proles controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (@ vs todos os grupos na porção do intestino grosso). 54

**Figura 18:** Recuperação de vermes adultos de *S. mansoni* no sistema porta e vasos mesentéricos das proles dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. 55

**Figura 19:** Lobos Testiculares (LT) de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B)

e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 56

**Figura 20:** Vesícula Seminal (VS) de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 58

**Figura 21:** Presença de Tubérculos (T) no tegumento de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 59

**Figura 22:** Canal Ginecóforo (CG) de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 60

**Figura 23:** Glândulas Vitelínicas (GV) de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 61

**Figura 24:** Ovário (OV) de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 63

**Figura 25 :** Espermateca (ESP) de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 64

**Figura 26:** Tegumento de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 65

**Figura 27 :** Ovo de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal. 67

**Figura 28:** Fotomicrografia dos fígados das proles não infectados programadas pela desnutrição na lactação. A- veia porta controle (C) corado com H&E (40X), B- hepatócitos do grupo C corado com H&E (40X), C- veia porta e presença de esteatose microvesicular do grupo restrição calórica (RC) corado com H&E (40X), D- hepatócitos apresentando esteatose microvesicular do grupo RC corado com H&E (40X), E- espaço porta do grupo restrição protéica (RP) corado com H&E (40X), F- hepatócitos do grupo RP corado com H&E

(40X). Aspecto normal: A, B, E e F. 68

**Figura 29:** Número de granulomas hepáticos por campo microscópico das proles dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) na fase aguda da infecção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,001$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vc RC). 69

**Figura 30:** Estágios evolutivos de granulomas hepáticos das proles dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) necropsiados com nove semanas (fase aguda) da infecção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,001$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vc RC). LEGENDA: **E** - Exsudativo e **EP** - Exsudativo-Produtivo. 70

**Figura 31:** Fotomicrografia do fígado de animais programados e controles infectados com *Schistosoma mansoni*, granulomas hepáticos são mostrados corados por Tricrômico de Masson. A- granuloma exsudativo com células em torno do ovo no grupo controle (C) (10X), B- granuloma exsudativo-produtivo no grupo C (10X), C- granuloma exsudativo no grupo de restrição calórica (RC) (10X), D- granuloma exsudativo-produtivo no grupo RC (10X), E- granuloma exsudativo no grupo restrição protéica (RP) (10X), F- granuloma exsudativo-produtivo no grupo RP (10X). 71

**Figura 32:** Área de granulomas por campo microscópico (A) e concentração de colágeno dos granulomas (B) encontrados no fígado dos camundongos dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) na fase aguda da infecção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vc RC). LEGENDA: **E** - Exsudativo e **EP** - Exsudativo-Produtivo. 72

**Figura 33:** Fotomicrografia do fígado de animais programados infectados com *Schistosoma mansoni*, granulomas hepáticos são mostrados corados por Picrosirius e observados em microscópio de luz polarizada. A- granuloma exsudativo com células em torno do ovo no grupo controle (C) (10X), B- granuloma exsudativo-produtivo no grupo C (10X), C- granuloma exsudativo no grupo restrição calórica (RC) (10X), D- granuloma exsudativo-produtivo no grupo RC (10X), E- granuloma exsudativo no grupo restrição protéica (RP) (10X), F- granuloma exsudativo-produtivo no grupo (RP) (10X). 73

**Figura 34:** Fotomicrografia dos fígados do grupo Controle (C). A- granuloma EEP com conjunto solto e desordenado de células na região mais externa do granuloma, corado com Tricrômico de Masson(10X), B- migração leucocitária de poli e mononucleares, corado com H&E(40X), C- granuloma EXS, localizado no espaço porta, corado com H&E (10X), D- presença de ovo retido no espaço intravascular, corado com H&E (40X). 74

**Figura 35** Fotomicrografia dos fígados do grupo de restrição protéica (RP). A- estágio pré-granulomatoso de reação inicial corado com H&E (10X), B- estágio pré-granulomatoso exsudativo, apresentando área de tecido necrosado com picnose, cariorrexe e cariólse corado com H&E (10X), C- migração leucocitária pela presença do ovo corado com Tricrômico de Masson (10X), D- infiltrado leucocitário independente de granuloma corado com H&E (40X). 75

**Figura 36:** Fotomicrografia dos fígados do grupo de restrição calórica (RC). A- neoformação colagênica e menor intensidade na manifestação do infiltrado leucocitário corado com Tricrômico de Masson (10X), B- granuloma exsudativo-produtivo, apresentando célula gigante corado com Tricrômico de Masson (10X), C- fibras de colágeno apresentaram forma concêntrica em torno do ovo corado com H&E (10X), D- hepatócitos binucleados corado com H&E (40X).

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas normo e hipoprotéica	37
Quadro 1 – Dados no modelo de programação metabólica pela restrição protéica materna na lactação	22
Quadro 2 – Grupos experimentais estudados	38



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>1.1 Programação metabólica</b>	19
<b>1.2 Modelos experimentais de programação por fatores nutricionais desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE) do Instituto de Biologia (IBRAG) da UERJ</b>	21
<b>2 ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA</b>	23
<b>2.1 O parasito e a doença</b>	23
<b>2.2 Ciclo biológico</b>	29
<b>2.3 Interação do <i>S. mansoni</i> com o hospedeiro vertebrado</b>	31
<b>2.4 Esquistossomose e distúrbios metabólicos do hospedeiro</b>	33
<b>3 OBJETIVOS</b>	35
<b>4 METODOLOGIA</b>	36
<b>5 RESULTADOS</b>	42
<b>6 DISCUSSÃO</b>	77
<b>7 CONCLUSÕES</b>	74
<b>REFERÊNCIAS</b>	75

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Programação Metabólica

O termo “programação” se refere a uma alteração permanente de determinada função, conseqüente a um estímulo ou agressão (*imprinting*) ocorrido em um período crítico de vida, como a gestação ou lactação (Barker, 1995; Lucas, 1999; Moura & Passos, 2005; De Moura *et al.*, 2008). Diversos estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais mostraram que alterações nutricionais, hormonais e ambientais nos períodos críticos do desenvolvimento poderiam influenciar permanentemente a estrutura e a fisiologia de órgãos e tecidos (Walker & Courtin, 1985; Pracyk *et al.*, 1992; Dorner & Plagemann, 1994; Passos *et al.*, 2000; Godfrey & Robinson, 1998), predispondo a gênese, na vida adulta, de doenças cardiovasculares e da síndrome metabólica (obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial e diabetes mellitus tipo 2) (Barker *et al.*, 1993; Godfrey & Barker, 2000; Phillips, 2002; Yura & Fuji, 2006).

Corroborando os estudos epidemiológicos e clínicos, que necessitam de uma interpretação mais cuidadosa e envolvem interferências de inúmeras variáveis, modelos experimentais têm mostrado a influência de diversos fatores sobre a prevalência de doenças na idade adulta (desnutrição materna na gestação e/ou lactação, exposição a hormônios ou fatores ambientais) (Desai *et al.*, 1995; Holemans *et al.*, 1996; Langley-Evans *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 1997; Tonkiss *et al.*, 1998; Pires *et al.*, 2006; Hoppe *et al.*, 2007). Há alguns anos, nosso laboratório vem estudando diferentes modelos de programação: determinada por fatores nutricionais, como a desnutrição calórica ou protéica na lactação (Passos *et al.*, 2000; Passos *et al.*, 2002; Dutra *et al.*, 2003; Passos *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2004; Fagundes *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2007; Lisboa *et al.*, 2008, Fagundes *et al.*, 2009) ou a supernutrição pós-natal (Rodrigues *et al.*, 2009) e fatores hormonais, como a hiperleptinemia neonatal (Cravo *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2002; Lins *et al.*, 2005; Toste *et al.*, 2006a; Toste *et al.*, 2006b; Passos *et al.*, 2007; Trevenzoli *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2009, Pereira-Toste *et al.*, 2009, Fraga-Marques *et al.*, 2009a, 2009b), a hipoprolactinemia materna (Bonomo *et al.*, 2005; Bonomo *et al.*, 2007; Bonomo *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2009) e a hipertiroxinemia (Moura *et al.*, 2008). Estes trabalhos evidenciam uma importante associação entre programação e

futuras disfunções endócrino-metabólicas, com destaque para a obesidade e distúrbios da função endócrina.

### **Programação por fatores nutricionais**

Na maioria das vezes, o estímulo indutor da programação é a falta de nutrientes para o desenvolvimento do feto, que altera a disposição de nutrientes para os tecidos com desvio preferencial de suprimento ao cérebro em detrimento dos demais órgãos, como o fígado (Barker & Clark, 1997).

Ravelli *et al.*, (1976) foram um dos primeiros pesquisadores a relacionar a obesidade na idade adulta com a desnutrição nos primeiros dias de vida. Neste estudo epidemiológico, verificou-se maior incidência de obesidade nos filhos adultos cujas mães sofreram restrição alimentar nos dois primeiros trimestres da gestação. Posteriormente, estudos experimentais também evidenciaram tal associação (Jones *et al.*, 1984; Anguita *et al.*, 1993; Passos *et al.*, 2000).

Sawaya *et al* (2003) e Ferreira *et al* (2005) mostraram que em populações de favelados de São Paulo, a baixa estatura se associa ao nível de pobreza ao nascer e é também indicador de risco para obesidade abdominal e hipertensão arterial. Sawaya (2006) também mostrou que além da obesidade e hipertensão, meninos e meninas com baixa estatura também apresentam maiores riscos de desenvolver cardiopatias e diabetes na vida adulta. No município do Rio de Janeiro, evidenciou-se que a deposição abdominal de gordura e a hipertensão arterial em adultos se associam à desnutrição perinatal (Sichieri *et al.*, 2000a, Sichieri *et al.*, 2000b).

Diversos estudos têm avaliado a possível associação entre subnutrição fetal e hipertensão e/ou falência cardíaca. Foi demonstrado que pacientes com restrição nutricional na vida fetal são mais propensos à hipertensão arterial (Langley-Evans & Jackson, 1996). Esses conceitos foram reforçados por estudos que indicam que a dieta materna na gestação e a nutrição perinatal inadequada afetam a organogênese e, conseqüentemente, a funcionalidade na maturidade. Tais alterações levariam o adulto a apresentar problemas como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e renais (Ingelfinger & Woods, 2002). Fernandez-Twinn *et al.*, (2006) mostraram que restrição

protéica materna na gestação e lactação programa a resposta do coração aos estímulos  $\beta$  adrenérgicos, sugerindo um maior o risco de falência cardíaca.

Pires *et al.*, (2006) e Almeida & Mandarin-de-Lacerda (2005) mostraram que a restrição protéica (5% de proteína) ou calórica (50%) na gestação e lactação altera a estrutura renal da prole, aumentando a chance de apresentar hipertensão na vida adulta. Ainda neste contexto, Marcelino *et al.*, (2004) demonstraram hipertensão arterial e diminuição da enzima óxido nítrico sintase na prole de mães submetidas à dieta com 0% de proteína no início da lactação. Nwagwu & Cook (2000) demonstraram que a prole adulta de ratas submetidas à restrição protéica moderada na gestação apresentou hipertensão, rins menores, maior volume urinário, menor *clearance* de creatinina, uremia e maior albuminúria. Woods *et al.*, (2004) e Hoppe *et al* (2007) observaram correlação entre restrição protéica na gestação e diminuição do número de néfrons na prole.

Já foi demonstrado aumento de catecolaminas em ratos adultos cujas mães receberam dieta hipoprotéica na gestação e lactação (Petry *et al.*, 2000). Molendi-Coste *et al* (2006) sugerem que a desnutrição materna perinatal altera acentuadamente a diferenciação da medula adrenal na vida pos-natal, resultando no aumento da atividade de células cromafins ao desmame, o que pode persistir até a vida adulta e participar da programação das doenças crônicas.

A desnutrição protéica e/ou calórica, na gestação ou lactação, programa várias modificações na homeostase glicêmica na vida adulta, tais como: hiperinsulinemia e resistência à insulina (Fernandez-Twinn *et al.*, 2003), menor secreção de insulina (Hales *et al.*, 1991; Desai & Hales, 1997; Moura *et al.*, 1997; Bertin *et al.*, 1999; Caldeira Filho & Moura, 2000; Ozanne & Hales, 2002; Moura *et al.*, 2002; Benyshek *et al.*, 2004; Gravena *et al.*, 2007), maior sensibilidade à mesma (Moura *et al.*, 1997; Caldeira Filho & Moura, 2000; Sampaio de Freitas *et al.*, 2003), diminuição de células beta, menor conteúdo de insulina pancreática (Bertin *et al.*, 1999; Breant *et al.*, 2006) e aumento da gliconeogênese (Burns *et al.*, 1997). Sardinha *et al* (2006) verificaram que a ação anorexigênica da insulina varia de acordo com o gênero em animais adultos submetidos à desnutrição na gestação. Após injeção intracerebroventricular de insulina, os machos adultos apresentaram hipofagia, diferente das fêmeas, que apresentaram resistência hipotalâmica a este hormônio. Recentemente, Pinheiro *et al* (2008) também verificaram que a restrição protéica na gestação e/ou lactação causa efeitos adversos na glicemia,

insulinemia, leptinemia, peso e gordura corporal da prole e que tais alterações podem ser passadas transgeracionalmente para a segunda geração dos filhotes.

Na gestação, a restrição calórica de 30% está associada à hiperleptinemia, hiperfagia, hiperinsulinemia e obesidade na prole adulta do sexo feminino (Vickers *et al.*, 2001a; Vickers *et al.*, 2001b). Na lactação, a desnutrição protéica materna severa (0% de proteína) aumenta a leptina sérica (Moura *et al.*, 2002).

## **1.2 Modelo experimental de programação por fatores nutricionais desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Endócrina (LFE) do Instituto de Biologia (IBRAG) da UERJ**

Embora diversos trabalhos mostrem os efeitos em longo prazo da desnutrição na gestação ou gestação e lactação, poucos enfocam exclusivamente o período crítico da lactação. O período da lactação é crítico, uma vez que é neste período onde importante desenvolvimento cognitivo. Como o crescimento e o 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.

Em nosso laboratório, foi desenvolvido um modelo de restrição energética materna exclusivamente na lactação para avaliar os seus efeitos em longo prazo sobre diversos parâmetros. Verificamos que a prole adulta destas mães apresenta sobrepeso (Passos *et al.*, 2000), alto T<sub>3</sub> e baixo TSH séricos (Passos *et al.*, 2002, Dutra *et al.*, 2003), maior expressão do GH (Moura *et al.*, 2007), maior expressão do receptor de leptina (Ob-Rb) na hipófise (Vicente *et al.*, 2004) e resistência ao efeito anorexigênico da leptina (Passos *et al.*, 2004).

Até o momento, nossos dados de ratos aos 180 dias de idade cujas mães foram submetidas à restrição protéica de 8% apenas na lactação sugerem o desenvolvimento de uma importante disfunção metabólica, mesmo em vigência de uma alimentação pós-desmame com quantidades adequadas de proteína (quadro 1).

Quadro 1 – Resumos dos nossos dados no modelo de programação pela restrição protéica materna na lactação em ratos

<b>PROLE ADULTA (180 dias)</b>		
Peso corporal	↓	Passos <i>et al.</i> , 2000
Ingestão alimentar	normal	Passos <i>et al.</i> , 2000
Captação tireóidea de <sup>125</sup> I	↑	Passos <i>et al.</i> , 2002
T <sub>3</sub> e T <sub>4</sub> séricos	↑	Passos <i>et al.</i> , 2002
TSH sérico	↓	Dutra <i>et al.</i> , 2003
GPDm hepática	↑	Lisboa <i>et al.</i> , 2008
D1 hepática	↑	Dutra <i>et al.</i> , 2003
Desiodases tireoideanas	normais	Dutra <i>et al.</i> , 2003, Lisboa <i>et al.</i> , 2008
D2 hipofisária e D1 muscular	↑	Lisboa <i>et al.</i> , 2008
D1 hipofisária e D2 muscular	normal	Lisboa <i>et al.</i> , 2008
Secreção de TSH pós-TRH in vitro	↓	Lisboa <i>et al.</i> , 2008
Gordura visceral e total	↓	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Proteína corporal total	normal	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Água corporal total	normal	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Leptinemia	normal	Teixeira <i>et al.</i> , 2002
Insulinemia	↓	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Glicemia	↓	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
HOMA	normal	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Adiponectinemia	normal	Fagundes <i>et al.</i> , 2009
Glicogênio muscular	↑	Fagundes <i>et al.</i> , 2009
Corticosteronemia	↑	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Conteúdo medular de catecolaminas	↑	Fagundes <i>et al.</i> , 2007
Secreção “in vitro” de catecolaminas	↑	Fagundes <i>et al.</i> , 2009
Tirosina hidroxilase adrenal	normal	Fagundes <i>et al.</i> , 2009
Ob-Rb hipofisário	↑	Vicente <i>et al.</i> , 2004
Efeito anorexigênico da leptina	resistente	Passos <i>et al.</i> , 2004
RNA <sub>m</sub> do GH	↓	De Moura <i>et al.</i> , 2007
Comprimento corporal	normal	De Moura <i>et al.</i> , 2007

## 2 ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA

É uma helmintíase causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* que habita as veias do trato digestivo de humanos, sendo endêmica em 76 países em desenvolvimento. Infecta mais de 200 milhões de pessoas nas zonas rurais e urbanas mais carentes, colocando mais de 600 milhões de pessoas em risco (Oliveira *et al.*, 2004), principalmente na África, Ásia e América do Sul, representando um grave problema de Saúde Pública (Chitsulo *et al.*, 2000).

Apesar de sua distribuição ter mudado ao longo dos anos em função dos programas de controle da doença, o número de pessoas infectadas ou que vivem em áreas de risco ainda é muito alto, principalmente no continente africano, onde parece haver 85% dos casos (Engels *et al.*, 2002). Estima-se que cerca de 200 milhões de indivíduos estejam infectados, sendo 120 milhões sintomáticos, desses 20 milhões sofrem sérios problemas de saúde (Chitsulo *et al.*, 2000).

Vinda da África, a infecção pelo *S. mansoni*, encontrou aqui as condições ideais para a manutenção do ciclo biológico: precárias condições sanitárias, caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* (hospedeiros intermediários) e hospedeiros suscetíveis. Na fase adulta, o *S. mansoni* infecta humanos, porém, ocasionalmente encontram-se babuínos, roedores e outros mamíferos infectados (D'Andrea *et al.*, 2000).

Atualmente, a área de transmissão de esquistossomíase no Brasil se estende do Maranhão até o Rio Grande do Sul onde já se encontram focos isolados (Coura & Amaral, 2004). Ainda hoje, novos focos surgem mostrando uma adaptação do parasito a novas condições e sua crescente expansão (Barbosa *et al.*, 2000; Barbosa *et al.*, 2001; Graeff-Teixeira *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2005). Com isso, não se tem com exatidão o número de indivíduos infectados por *S. mansoni* no Brasil (Katz & Peixoto, 2000).

### 2.1 O parasito e a doença

A espécie *Schistosoma mansoni* foi descrita originalmente por Sambon, baseada na morfologia dos ovos, sendo os caracteres do verme adulto descritos posteriormente por Silva (1908 *apud* Cunha *et al.*, 1970).

O *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), é um verme Platyhelminthe, Trematoda, Digenea da Família Schistosomatidae. É um parasito do homem e de alguns mamíferos, em cujas vênulas do mesentério que liga o intestino ao fígado (sistema porta-hepático) vivem os adultos, ocasionando a esquistossomíase mansônica. Esta família compreende os trematódeos cujas formas adultas são dióicas, com duas ventosas e cujo tubo digestivo se bifurca inicialmente, unindo-se posteriormente para formar o ceco.

São helmintos acelomados achatados dorso-ventralmente, bilateralmente simétricos, não-segmentados e com tubo digestivo incompleto. O nome trematódeo faz referência à presença de duas ventosas no corpo desses helmintos; a ventosa ventral, particularmente desenvolvida, com funções de fixação e locomoção e a ventosa oral, circundando a boca, em espécies parasitas. Normalmente são hermafroditas salvo algumas exceções, como é o caso do gênero *Schistosoma* (Digenea: Schistosomatidae). Neste gênero estão descritas espécies de importância à medicina humana como *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. guineensis* (Webster *et al.*, 2005). Somente a primeira ocorre nas Américas, devido à presença do hospedeiro intermediário, o caramujo de água doce do gênero *Biomphalaria*. O agente etiológico *Schistosoma mansoni*, descrito por Sambon, (1907) é o agente etiológico da esquistossomíase mansônica ou intestinal, devido à localização do helminto nas veias mesentéricas.

*Schistosoma mansoni* é um platelminto que, ao contrário dos outros trematódeos são vermes longos e finos, tem sexos separados e elevado dimorfismo sexual (figura 1). O macho tem cor esbranquiçada, cerca de 1 cm de comprimento por 0,1 cm de largura em média. É cilíndrico apenas na porção anterior do corpo entre as ventosas; o resto do corpo é achatado dorso-ventralmente e se dobra em forma de U, formando uma calha longitudinal (canal ginecóforo), onde abriga a fêmea na cópula. É coberto com tegumento formado por uma cutícula acelular espessa, com função de proteção e de absorção de oxigênio e nutrientes do plasma (Cunha *et al.*, 1970; Rey, 2001). A fêmea é filariforme com cerca de 1,4 cm de comprimento por 0,016 cm de largura e acinzentada devido a resíduos da digestão do sangue (Rey, 2001). A manutenção da fêmea no canal ginecóforo é necessária para alcançar seu pleno desenvolvimento, assim como para a manutenção de sua maturidade sexual (Popiel *et al.*, 1984; Basch, 1990; Ribeiro-Paes & Rodrigues, 1997). O corpo mais fino da fêmea parece facilitar o pareamento e oviposição em estreitos capilares e pode ter sido resultado da divisão de funções entre

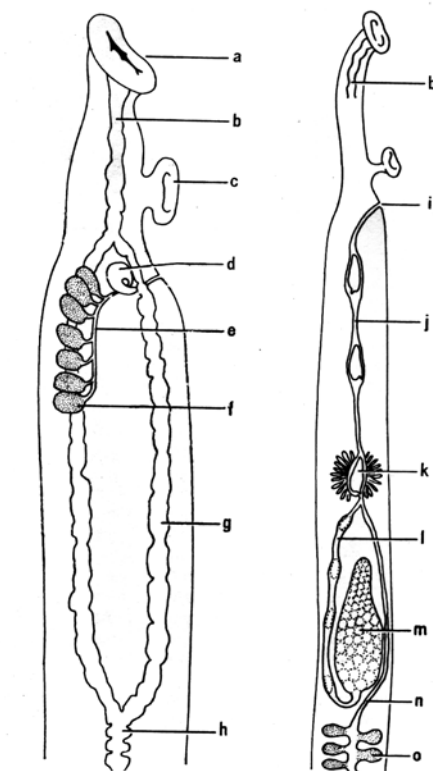


machos e fêmeas. Ao macho cabe a locomoção que facilita a chegada da fêmea ao local adequado para a postura de ovos (Morand & Muller-Graff, 2000).

O helminto adulto é coberto por um tegumento sincicial limitado externamente por uma membrana plasmática coberta por uma secreção laminar, a membranocálix (Braschi *et al.*, 2006). No tegumento existem microespinhos na área das ventosas e do canal ginecóforo e ainda ocorre na superfície dorsal dos machos a presença de tubérculos que conferem suporte à locomoção (Rey, 2001).

O sistema reprodutor dos machos consiste basicamente de um testículo com número variado de massas testiculares globosas localizadas dorsalmente abaixo do nível da ventosa ventral (Machado-Silva *et al.*, 1998). De cada lóbulo testicular emergem canais eferentes que se unem formando um canal deferente único que segue até a vesícula seminal, uma dilatação deste canal. Entretanto, o estudo por microscopia confocal não confirmou a existência dessa estrutura (Neves *et al.*, 2001). Da vesícula parte o canal seminal que se abre para o meio externo, através de um poro genital localizado no canal ginecóforo (Kastner *et al.*, 1975).

A fêmea possui um ovário alongado localizado na metade anterior do corpo, e neste podem ser encontrados oócitos em diversos estágios de desenvolvimento. Na região posterior do ovário encontra-se uma espermateca, fina e alongada onde os espermatozoides do macho são armazenados e um oviduto que se direciona para a região anterior do corpo transportando os oócitos até o oótipo. Neste também desemboca o viteloduto, canal que transporta o material produzido pelas glândulas vitelínicas que ocupam os 2/3 posteriores da fêmea. Neste oótipo, cuboidal e bem protegido por músculos longitudinais e circulares é formada a casca do ovo, cujo material é produzido pela glândula de Mehlis, que de acordo com novos relatos não são estruturas anexas como se acreditava e sim as próprias células cubóides do oótipo (Neves *et al.*, 2005). O oótipo se prolonga por um útero que se apresenta como um canal reto que segue até se abrir em um poro genital localizado abaixo da ventosa ventral (Kastner *et al.*, 1975).



**Figura 1** – Esquema dos helmintos adultos de *Schistosoma mansoni* - Segmento anterior do corpo do macho (à esquerda) e da fêmea (à direita) de *Schistosoma mansoni* mostrando esquematicamente os principais órgãos internos: **a**, ventosa oral; **b**, porção anterior do intestino; **c**, ventosa ventral; **d**, vesícula seminal; **e**, canal deferente; **f**, lóbulos testiculares; **g**, porção média bifurcada do intestino; **h**, ceco; **i**, orifício genital feminino; **j**, útero contendo dois ovos; **k**, ovo; **l**, oviduto; **m**, ovário; **n**, viteloduto; **o**, glândulas vitelinas (Segundo Rey, 2001).

Os ovos de *Schistosoma mansoni* medem em média 147  $\mu\text{m}$  por 68  $\mu\text{m}$  e são caracterizados pela presença de um espículo lateral, que determina a espécie. Seu revestimento é formado por duas membranas finas e transparentes que permitem visualizar no seu interior, a larva miracídio. Na postura, os ovos abrigam embriões ainda imaturos, que maturam no decorrer do trânsito intestinal, até a evacuação das fezes do hospedeiro. A sobrevivência dos miracídios, dentro dos ovos que permanecem nas fezes, é em média de 4 a 5 dias. Por outro lado, a exposição direta das fezes ao sol provoca morte das larvas em 48 horas (Cunha *et al.*, 1970).

A contaminação ambiental se dá quando fezes humanas, contendo ovos, atingem coleções hídricas, seja por esgoto despejado diretamente em águas de rios e lagos, ou por falta de instalações sanitárias que propiciam o depósito direto de fezes no solo, de onde podem ser carregadas por chuvas às coleções hídricas próximas (rios, lagos, valas, brejos, etc). Segundo a literatura (Lutz, 1919 e Standen, 1951 *apud* Cunha *et al.*, 1970),

uma vez que os ovos do verme atinjam a água doce, a eclosão do mesmo e a liberação das larvas miracídio dependem das condições dos parâmetros abaixo, a saber:

1. A luminosidade intensa acelera a eclosão e a obscuridade inibe o processo;
2. Pouca turbidez da água, para que a luz possa atravessá-la e facilitar a eclosão, daí a importância da presença de águas claras e transparentes;
3. Os extremos de temperaturas de 4°C e 37°C inibem a eclosão, embora não afetem a viabilidade dos ovos. A temperatura ótima para a eclosão é em torno de 26°C;
4. A eclosão é inibida em salinidade superior a 0,6%; no entanto, segundo Standen (1951 *apud* Cunha *et al.*, 1970), as condições ótimas são encontradas na maioria dos criadouros naturais de planorbídeos das áreas endêmicas.

Depois de liberada, a larva miracídio nada ativamente atraída pela luz, em direção à superfície do líquido. Suas dimensões são, em média, de 180 µm de comprimento por 62 µm de largura. Em seu interior estão células germinativas que darão origem aos esporocistos primários, que originam os secundários e, por fim, as larvas infectantes livre natantes, as cercárias. A sobrevivência dos miracídios após a eclosão é de menos de 24 horas. A temperatura da água, neste caso, assume um papel importante, uma vez que deverá estar entre 24°C e 26°C (Barbosa & Coelho, 1956 *apud* Cunha *et al.*, 1970).

A cercária tem forma ovalada, cauda cilíndrica alongada, que se bifurca na porção terminal. Tem 14 µm de comprimento, por 40 µm de largura, e sua cauda 270µm. Ao todo mede aproximadamente meio milímetro, estando no limite da visibilidade do olho humano. Estas larvas desenvolvem-se em moluscos de água doce, do gênero *Biomphalaria*, sendo a espécie na região de estudo *Biomphalaria glabrata*. A larva miracídio infecta o molusco e, nas primeiras 48 horas, já está formado o esporocisto primário. A formação do esporocisto secundário se inicia a partir do 14º dia após a penetração do miracídio. A formação das cercárias se inicia com a multiplicação das células germinativas. Em condições ótimas de temperatura, em torno de 26°C, e com cerca de quatro semanas após a penetração, já estão maduras, iniciando-se sua eliminação (Cunha *et al.*, 1970).

A eliminação de cercárias é dependente da espécie e do tamanho do planorbídeo infectado, mas em geral, se dá prioritariamente entre 11 e 17 horas, é progressiva até a quinta semana, quando são eliminadas médias diárias em torno de 6000 por caramujo; e,

cada caramujo que sobreviver infectado por 15 a 20 dias, poderá eliminar neste período, cerca de meio milhão de cercárias (Barbosa & Coelho, 1956 *apud* Cunha *et al.*, 1970).

Uma vez livres na água, as cercárias têm longevidade de aproximadamente três dias e nadam ativamente até encontrar o hospedeiro definitivo, por exemplo, o homem. A penetração na pele do hospedeiro se dá através de fixação das ventosas oral e ventral, efeito lítico das glândulas anteriores, e movimentação vibratória intensa da cauda. Ao alcançar a camada muscular, abandona a cauda, transformando-se em esquistossômulo. Estes migram para as camadas mais profundas da pele, atingindo vasos linfáticos ou sanguíneos que os levarão para o pulmão, onde passam dos vasos arteriais para as vênulas, e de onde são conduzidos ao coração e à circulação geral (Gordon & Griffiths, 1951 e Standen, 1953 *apud* Cunha, 1970). Somente aqueles que atingirem o sistema porta-hepático completarão seu desenvolvimento, pois depende de alimentação sanguínea, comumente iniciada no fígado e, quando vermes adultos, nas veias mesentéricas (Cunha *et al.*, 1970).

A esquistossomíase mansônica também recebe outras denominações como bilhardíase ou doença de Manson e, popularmente, como xistosa, doença do caramujo, barriga d'água, xistosomose. A transmissão se dá pelo contato do homem com água contendo cercárias e, uma vez infectado, e particularmente se ocorrer reinfecção, esta pessoa poderá continuar eliminando ovos por vários anos. O período de tempo entre a penetração da cercária na pele do hospedeiro e estabelecimento nas vias mesentéricas é de cerca de 10 dias. No vigésimo sétimo dia, já se encontram vermes acasalados e, a partir do quadragésimo dia, os ovos já podem ser encontrados nas fezes (Cunha *et al.*, 1970).

A estimativa de produção de ovos é de cerca de 300 ovos/dia por fêmea, logo, dependendo da quantidade de vermes, esta produção pode elevar-se de centenas a milhares de ovos/dia. A produção de ovos é o aspecto mais importante do parasitismo e a maior causa da patologia da esquistossomose. Estes ovos, tanto provocam hemorragias e ulcerações durante a passagem pela luz intestinal, quanto provocam a formação de granulomas, como resposta do sistema imunológico. Os granulomas se formam a partir daqueles que ficam retidos nas paredes do intestino, fígado, capilares sinusóides e, eventualmente nos locais para onde foram transportados via corrente sanguínea. A presença de granulomas no fígado provoca bloqueio da circulação pré-sinusoidal, desenvolvimento de tecido fibroso cicatricial, redução do fluxo sanguíneo na

área drenada pela veia porta e, posteriormente, hipertensão e aumento do diâmetro dos vasos abdominais. Em fases avançadas da doença, estes vasos podem não suportar a pressão e se romperem, causando hemorragias (Magalhães, 2001).

A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção. A sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro. As manifestações clínicas variam, dependendo da localização e intensidade do parasitismo, da capacidade de resposta do indivíduo e do tratamento instituído.

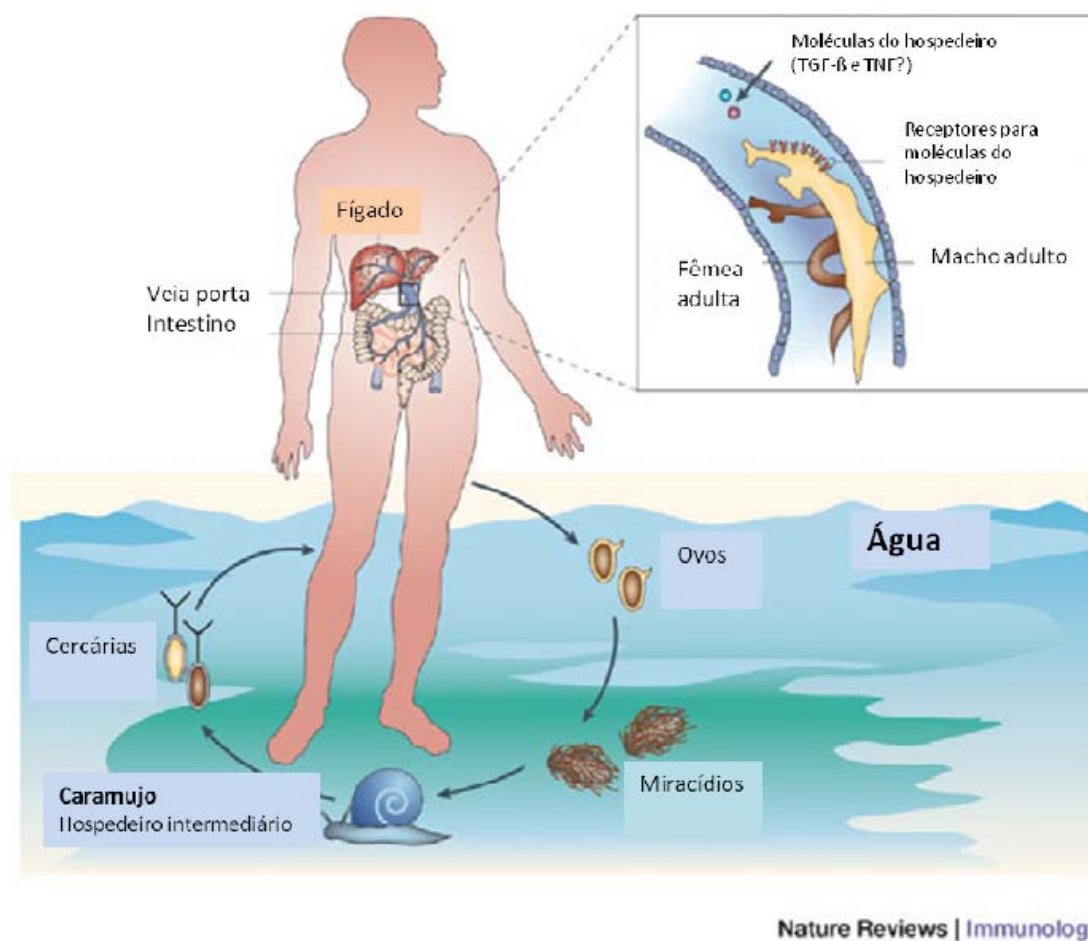
As diversas formas de manifestação clínica da Esquistossomose mansônica, podem ser resumidas em: (1) Fase pré-postural (dermatite e Esquistossomose aguda ou febre de Katayama) e (2) Fase pós-postural (Tipo I ou forma intestinal, Tipo II ou forma hepatointestinal, Tipo III ou forma hepatoesplênica compensada, Tipo IV ou forma hepatoesplênica descompensada, formas particulares pulmonar e cárdio-pulmonar, neuroesquistossomose, síndrome cianótica, pólipos inflamatórios e formas insólitas peritoneal, pancreática, cutânea, testicular ou miocárdica) (Magalhães, 2001; Malta *et al.*, 2005).

## 2.2 Ciclo biológico

O *S. mansoni* tem um ciclo de vida complexo, que envolve um molusco aquático pulmonado de água doce (do gênero *Biomphalaria*) e um hospedeiro vertebrado (homem e outros mamíferos). Os ovos liberados nas fezes do hospedeiro vertebrado entram em contato com a água, resultando na eclosão dos miracídios. Esse processo é dependente de temperatura (22° a 25° C) e luz. Os miracídios nadam, entram em contato com os moluscos, penetram pelas suas partes e iniciam um processo de reorganização estrutural no local de penetração do parasito. As etapas seguintes são representadas por multiplicação do parasito, produzindo gerações de esporocistos primários e secundários. A última etapa que é de diferenciação resulta em alguns milhares de cercárias. As cercárias que são liberadas dos moluscos, principalmente, durante a luz do dia, nadam ativamente e penetram na pele de um hospedeiro suscetível, fazendo uso de secreções proteolíticas (Rey, 2001; Pearce & Simpson, 1992; Jacobs *et. al.*, 1999).

A entrada em um novo ambiente requer mudanças estruturais, inicialmente, representada pela transformação da parte anterior da cercária em esquistossômulo, que passa por uma reorganização estrutural representada por modificações no revestimento

externo (tegumento) e internamente com a regressão de glândulas necessárias à penetração do hospedeiro. Após alguns dias na pele, os esquistossômulos entram na circulação e migram para os pulmões (5-7 dias após a penetração). Os esquistossômulos então se movem para o sistema porta hepático, onde se desenvolvem em adultos sexualmente maduros. Machos e fêmeas têm diferenças comportamentais, antigênicas e fisiológicas. O desenvolvimento dos machos ocorre de maneira independente da presença da fêmea. A fêmea adulta vive dentro do canal ginecóforo e não se torna madura na ausência dos machos. Por volta de 4-5 semanas de infecção, os vermes migram acasalados para as veias mesentéricas, onde se dá início a produção de ovos (oviposição) (Rey, 2001). Cada fêmea é capaz de liberar aproximadamente 300 ovos por dia, que são depositados nas paredes dos capilares (Loverde & Chen, 1991). Neste local, os ovos permanecem por cerca de duas semanas, passando por um processo de desenvolvimento das células embrionárias do miracídeo, que corresponde a um ovo maduro com o miracídeo totalmente desenvolvido (Jurberg *et al.*, 2009). Esses ovos caem no lúmen intestinal e são liberados nas fezes (Loverde & Chen, 1991). A Figura 2 ilustra o ciclo biológico do *S. mansoni*.



**Figura 2** - Ciclo de vida do *S. mansoni*. O esquema mostra as etapas do ciclo, no meio aquático, no hospedeiro intermediário e finalmente no hospedeiro vertebrado (Dunne & Cooke, 2005).

### 2.3 Interação do *S. mansoni* com o hospedeiro vertebrado

Esta relação se baseia no jogo entre estratégias de sobrevivência do parasito e convivência com os mecanismos de defesa do hospedeiro. Para tal, o parasito depende do tegumento que cobre toda a superfície dos vermes adultos, sendo a interface entre o parasito e o hospedeiro (Abath & Werkhauser, 1996). No tegumento que é uma estrutura extremamente especializada, as propriedades moleculares do tegumento são diretamente responsáveis pelo mecanismo de escape do parasito (Skelly & Wilson, 2006). Diferentemente de outros helmintos, os vermes adultos provocam poucos danos diretos ao hospedeiro. Por outro lado, os ovos que não conseguem alcançar a luz intestinal são arrastados pela corrente sanguínea ficam retidos nos capilares hepáticos, provocando uma intensa resposta inflamatória granulomatosa (Bica *et al.*, 2000). Há fortes evidências de que a resposta granulomatosa seja a responsável pelas

manifestações patológicas da doença (Boros, 1989), ao invés de uma ação direta do ovo. Os ovos agregados nos tecidos do hospedeiro constituem um grave aspecto da esquistossomose. A forma hepática da doença é a mais importante, com os granulomas gerando fibrose e hepato-esplenomegalia nos casos mais severos. Inicialmente a reação inflamatória é reversível, mas em casos mais avançados pode resultar em danos irreversíveis ao fígado. A formação do granuloma é iniciada por antígenos secretados pelos miracídeos, através de poros existentes na rígida casca do ovo. A variabilidade do granuloma é devido ao fato que esta estrutura organizada é composta pelos componentes do hospedeiro e do parasito, funcionando como uma relação híbrida entre dois seres filogeneticamente diferentes, dependendo, conseqüentemente, das características epigenéticas do hospedeiro (Lenzi *et al.*, 1998).

Na formação dos granulomas, os ovos são circundados por um agregado de células inflamatórias compostas por eosinófilos, linfócitos, macrófagos e neutrófilos envoltos em colágeno (Warren & Domingo, 1970), podendo ou não haver necroses ou infiltração de outros leucócitos (Adams, 1976), o que induz uma resposta de hipersensibilidade retardada mediada por linfócitos T, provocada por produtos derivados do ovo (Colley, 1987).

O granuloma hepático é uma fonte das citocinas fibrogênicas, sendo produzidas como resultado da resposta do hospedeiro ao antígeno do ovo. A matriz extracelular dos granulomas hepáticos é essencialmente formada por proteoglicanos, fibronectina e colágeno. O colágeno do tipo I e III, fibronectina e as glicoproteínas não colagênicas são os principais componentes das fibras reticulares (Unsworth *et al.*, 1982) e são densamente depositadas em volta do ovo do *S. mansoni*.

Durante seu desenvolvimento, os granulomas esquistossomóticos apresentam diferentes estágios de maturação (Lenzi *et al.*, 1999). A maioria dos componentes da matriz extracelular presente no granuloma esquistossomótico é modificada ao longo da evolução da infecção, sofrendo alterações na sua composição e metabolismo, durante os processos inflamatórios (Lenzi *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2000).

O estudo morfométrico confirmou que o processo de desenvolvimento da reação granulomatosa hepática é influenciado pelo hospedeiro (Costa-Silva *et al.*, 2002), pela cepa do parasito (Coelho *et al.*, 1989) e pela fase doença (aguda ou crônica) (Raso *et al.*, 1986; Cheever *et al.*, 2002). Com o passar do tempo, os ovos se disseminam para os pulmões, onde mais granulomas são formados.



## 2.4 Esquistossomose e distúrbios metabólicos do hospedeiro

Além da especialização do tegumento, o *S. mansoni* também faz uso de hormônios e citocinas humanos para regular seus próprios processos metabólicos e de desenvolvimento (Escobedo *et al.*, 2005). Já foi mostrado que *Schistosoma haematobium* sintetiza uma glutationa-S-transferase de 28-kDa que se liga a testosterona e facilita o transporte, metabolismo e ação fisiológica do hormônio no parasito (Remoue *et al.*, 2002). Essa complexa relação supostamente é decorrente dos muitos anos de co-evolução entre parasito e hospedeiro.

Estudos em camundongos com diabetes *mellitus* mostraram que a eliminação fecal de ovos de *Schistosoma mansoni* foi menor comparado a animais sem essa alteração metabólica (Hulstijn *et al.*, 2001; 2003). Essas diferenças poderiam estar relacionadas com deficiência na maturação dos ovos ou por mudanças na resposta inflamatória intestinal, que mudando o metabolismo do hospedeiro poderia afetar a biologia do helminto e a própria resposta do hospedeiro a este.

Estudos anteriores mostraram alterações dramáticas no desenvolvimento do verme adulto (Neves *et al.*, 2001, 2002, Oliveira *et al.*, 2003), bem como a diminuição do granuloma esquistossomótico periovular e lesões crônicas mais leves em camundongos desnutridos, em comparação com ratos alimentados com uma dieta normal (Coutinho *et al.*, 2003). Já foi observado que a privação de nutrientes leva a um micro-ambiente hostil para vermes adultos (Ferreira & Coutinho, 1999, Neves *et al.*, 2002, Simões *et al.*, 2002, Oliveira *et al.*, 2003).

Vários trabalhos demonstraram que *Schistosoma* é altamente dependente do metabolismo do hospedeiro (Saule *et al.*, 2005). Modelos animais demonstraram reduções na concentração de lipoproteínas no plasma durante a infecção experimental por esquistossomose (El-Marzouki & Amin 1997, Muller *et al.*, 2001, Ramos *et al.*, 2004). Além disso, a infecção esquistossomótica neutraliza os efeitos de uma dieta aterogênica, através da modulação do metabolismo lipídico de recolhimento, induzindo uma redução no colesterol total (Doenhoff *et al.*, 2002). Camundongos deficientes de produção de Apoproteína E (ApoE)-deficient C57BL / 6) foram submetidos a exposição crônica aos ovos de *Schistosoma* promoveu o desenvolvimento de uma resposta Th2 e reduziu os níveis de colesterol total e LDL no soro, mas não conseguiu reduzir o desenvolvimento de lesões da aorta (La Flamme *et al.*, 2007).

Estudos sobre o papel da dislipidemia durante a infecção aguda da esquistossomose observou que uma dieta rica em gordura favorece o desenvolvimento dos vermes adultos (Neves *et al.*, 2007a). Além disso, a maturação dos ovos, a produção de fezes, viabilidade de ovos foram maiores em comparação com camundongos alimentados com uma dieta padrão (Neves *et al.*, 2007b).

Diversos estudos abordaram a interação entre a desnutrição e a infecção por helmintos intestinais (Oberhelman *et al.*, 1998; Stephenson *et al.*, 2000; Crompton & Nesheim, 2002; Muniz *et al.*, 2002, Simões *et al.*, 2002), destacando que os parasitos influenciam negativamente o estado nutricional do hospedeiro, afetando o seu crescimento físico, desenvolvimento educacional e psicomotor (Stephenson *et al.*, 2000). É freqüente a associação da esquistossomose com a desnutrição, uma vez que regiões endêmicas são habitadas por populações de baixo padrão socioeconômico no nordeste do Brasil (Coutinho, 1980; Coutinho, 2004; Coutinho *et al.*, 1991, Coutinho *et al.*, 1992; Ferreira & Coutinho, 1999).

Estudos em roedores infectados por *S. mansoni* têm permitido avançar no conhecimento sobre a interação esquistossomose e restrição nutricional. A eliminação de vermes por esquistossomicida (praziquantel) é menor em camundongos com deficiência protéica do que os normoprotéicos (Lima *et al.*, 1998). A privação de nutrientes leva a um micro-ambiente hostil, com um efeito deletério sobre vermes macho e fêmea, culminando em alterações morfológicas na arquitetura do tegumento e do sistema reprodutivo (Barros *et al.*, 2009).

A capacidade de adaptar os processos metabólicos às mudanças ambientais influencia o comportamento do *Schistosoma* dentro do hospedeiro, devido a diversas adaptações nutricionais (Halton, 1997). Assim, mudanças no hospedeiro modificam o parasito, que por sua vez, alteram a relação parasito-hospedeiro podendo assim repercutir na capacidade de infecção do parasito. Dessa forma, essa interação implica no desenvolvimento de estratégias adaptativas de convivência entre organismos distintos.

### 3 OBJETIVOS

Analisar, durante a fase aguda da infecção, a resposta parasitológica e histopatológica em camundongos adultos infectados com *Schistosoma mansoni* no modelo de programação metabólica pela desnutrição materna na lactação.

#### 3.1 Objetivos específicos

Na prole cujas mães foram submetidas à restrição protéica ou calórica na lactação, que foi infectada com *s. Mansoni*, avaliar:

- A massa corporal e ingestão alimentar;
- A composição corporal (gordura visceral, conteúdo de gordura e proteína) e a massa tecidual (fígado, baço, rim e intestino);
- As concentrações séricas de leptina e corticosterona.
- A morfometria, a concentração de colágeno e a resposta inflamatória celular (eosinófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, plasmócitos, fibroblastos e neutrófilos) dos granulomas hepáticos.

No hospedeiro, AVALIAR:

- O número de ovos eliminados nas fezes;
- Percentual dos estágios evolutivos dos ovos nos tecidos intestinais;

NO *S. mansoni*, AVALIAR:

- A infectividade (recuperação de vermes adultos);
- As características morfológicas do sistema reprodutor e tegumento;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ com o nº CEA/232/2008.

### 4.2 Hospedeiros e Parasitos:

Foram utilizados *Mus musculus* Swiss Webster, cedidos pelo Instituto de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman.

As cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa BH, Belo Horizonte) foram fornecidas pelo Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz.

### 4.3 Modelo experimental de programação em camundongos pela restrição protéica (RP) e calórica (RC) materna na lactação

Camundongos foram mantidos em biotério em caixas de polipropileno (40 x 33cm), com temperatura controlada ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), ciclo artificial de claro-escuro (luz de 7 às 19h) com ração e água *ad libitum*. Aos três meses de idade, os animais foram acasalados (2 fêmeas: 1 macho) e, em seguida, as fêmeas grávidas foram mantidas em gaiola individual com livre acesso à água e ração até o dia do nascimento da ninhada. Seguimos os princípios básicos de manuseio e cuidado com os animais descritos em *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (Bayne, 1996).

Após o nascimento da ninhada, as lactantes foram divididas nos seguintes grupos:

- Controle (C), com livre acesso a ração normal com 23% de proteína,
- RP, com livre acesso a dieta com 8% de proteína (Tabela 1),
- RC, com acesso restrito à ração controle, cuja quantidade foi calculada de acordo com a ingestão do grupo RP.

A desnutrição materna foi iniciada ao nascimento da ninhada (dia 0) e foi mantida até o final da lactação (dia 21). Utilizamos 6 filhotes machos por ninhada, pois este número confere a melhor performance lactacional (Passos *et al.*, 2000).

Após o desmame, os filhotes C, RP e RC tiveram livre acesso à ração normal, com 23% de proteína, até os 120 dias de idade (Nuvilab-Nuvital Nutrientes LTDA, Paraná, Brasil).

**Tabela 1-** Composição das dietas normo e hipoprotéica

	<b>Controle</b>	<b>Hipoprotéica</b>
<b>Ingredientes – g</b>		
Proteína	234.0	81.0
Amido de milho	672.0	825.0
Óleo de soja	50.0	50.0
Mistura de vitaminas *	4.0	4.0
Mistura de minerais *	40.0	40.0
<b>Análise:</b>		
Energia Total – kcal	4074	4074
Proteína %	23.0	8.0
Carboidrato %	66.0	81.0
Lipídios %	11.0	11.0

\*De acordo com as recomendações do American Institute of Nutrition Rodents Diets, AIN-93G (1993)

### **Análise nutricional**

A massa corporal das proles foi monitorada diariamente nos 21 dias da lactação. Após o desmame, a massa corporal e a ingestão de ração foram analisados de 4 em 4 dias.

O consumo alimentar diário foi determinado pela fórmula:

$$\text{Consumo} = \left[ \frac{\text{Ri} - \text{Rf}}{\text{n}} \right] / 4$$

onde :

**Ri** – ração inicial colocada na gaiola

**Rf** – ração restante na gaiola 4 dias depois

**n** – número de animais na gaiola

**4** – dias transcorridos entre as pesagens

### Composição corporal

No dia do sacrifício (120 dias de idade), a massa de gordura visceral (MGV) das proles programadas foi retirada para estimativa de adiposidade central - mesentérica, epididimal e retroperitoneal (Toste *et al.*, 2006b). Após a pesagem, esta foi devolvida à carcaça para posterior avaliação do conteúdo lipídico total.

Realizamos o método da carcaça (Fagundes *et al.*, 2007), onde o conteúdo de gordura corporal total foi analisado por método gravimétrico e o conteúdo de proteínas corporais totais foi quantificado por método colorimétrico.

### Infecção com *S. mansoni*

Aos 60 dias de idade, 30 camundongos da prole foram infectados por via transcutânea com 50 cercárias (cepa BH) obtidas após a exposição à luz de *Biomphalaria glabrata* experimentalmente infectada (Hulstijn *et al.*, 2001). Igual número, não infectado, foi considerado o grupo controle. Os pontos estudados foram: período pré-patente, cinética de eliminação de ovos, maturação e viabilidade dos ovos, recuperação dos vermes e a histopatologia hepática.

**Quadro 2:** Grupos experimentais estudados

<b>Animais</b>		<b>Infecção Aguda</b>
Controle	Com infecção	10
	Sem infecção	10
RP	Com infecção	10
	Sem infecção	10
RC	Com infecção	10
	Sem infecção	10

### Estudo Parasitológico

**Período pré-patente:**

A partir do 35º dia de infecção, foram realizados exames coproscópicos dos camundongos pela técnica de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972), duas vezes por semana, com duas lâminas para cada animal.

**Dinâmica de eliminação de ovos nas fezes:**

O procedimento anterior repetiu-se até o 55º dia de infecção. Em cada exame, os ovos foram contados e calculados a média de duas lâminas, que foi multiplicada pelo fator de correção 24 e expresso em número de ovos/g fezes (Katz *et al.*, 1972).

**Necropsia**

Os camundongos C, RC e RP foram sacrificados por deslocamento cervical na 17ª semana de vida, ou seja, após 9 semanas de infecção (fase aguda), o sistema porta e vasos mesentéricos foram perfundidos com solução salina citratada (0,9%) (Smithers & Terry, 1965). Em seguida à perfusão, os vasos mesentéricos foram cuidadosamente examinados à procura de vermes residuais. Os vermes foram fixados em AFA (solução de etanol a 95%, formalina e ácido acético glacial) (Neves *et al.*, 1998), contados e agrupados segundo o sexo.

Nesta etapa, foram coletados e pesados: fígado, baço, rim e intestino.

**Infectividade:**

Determinada segundo o total de vermes encontrados pela carga parasitária (Silva *et al.*, 1992).

**Oograma:**

O intestino delgado de cada animal foi medido e dividido em dois segmentos: proximal (do piloro até a primeira metade do intestino delgado), distal (da segunda metade do intestino delgado até a ampola cecal) e o intestino grosso (da ampola cecal até o reto), segundo adaptação da técnica de Brener (1965). Um segmento de 1,0 cm da

porção distal foi retirado e esmagado entre lâminas para determinação do estágio e o percentual de maturação dos ovos (Cunha *et al.*, 1986; Ferrari *et al.*, 2003).

Foi realizada também a contagem de ovos retidos na mucosa intestinal pela técnica da digestão tecidual em hidróxido de potássio (Cheever, 1968). Cada segmento dos intestinos foi colocada em tubos de vidro com 10 ml de KOH à 4%, permanecendo em banho-maria por 4 a 5 h, a 56°C. Após a digestão dos tecidos, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1 ml de água desionizada. Dez amostras de 100 µl de cada sedimento, foram examinadas ao microscópio óptico entre lâmina e lamínula com aumento de 100 vezes (Martinez *et al.*, 2003).

### **Estudos morfológicos dos vermes adultos recuperados de camundongos programados**

A morfologia dos vermes foi analisada por microscopia de campo claro (Olympus BX50). As imagens foram capturadas por uma máquina fotográfica (Sony, 640 x 480 pixels, RGB), transferidas a um computador com a utilização do programa Image Pro Plus, Media Cybernetics, USA (Neves *et al.*, 2005).

### **Avaliação das mudanças histopatológicas causadas por *S. mansoni* no fígado dos camundongos programados**

O tecido foi clivado e fixado em tampão fosfato formalina, pH 7.4 (Carson *et al.*, 1973) à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se o processamento histológico de rotina: desidratação em série alcoólica gradual, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H&E), tricrômico de Masson e Picrosirius + microscópio de polarização (Junqueira *et al.*, 1979). As imagens foram analisadas em microscópio de campo claro para verificação da histopatologia hepática a morfometria dos granulomas (Costa-Silva *et al.*, 2002).



## **Determinações bioquímicas**

O sangue foi obtido em ambiente asséptico, por meio de por punção do plexo subaxilar e punção cardíaca, sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas (4°C, 3000 rpm por 20 minutos) e o soro foi congelado a -20°C, para posterior utilização.

### **Dosagem da leptinemia**

Quantificada por radioimunoensaio específico para roedores (Linco Research, Inc, Missouri, EUA). A variação intra-ensaio foi de 2,9%. O limite de sensibilidade foi de 0,5 ng/mL.

### **Dosagem da corticosteronemia**

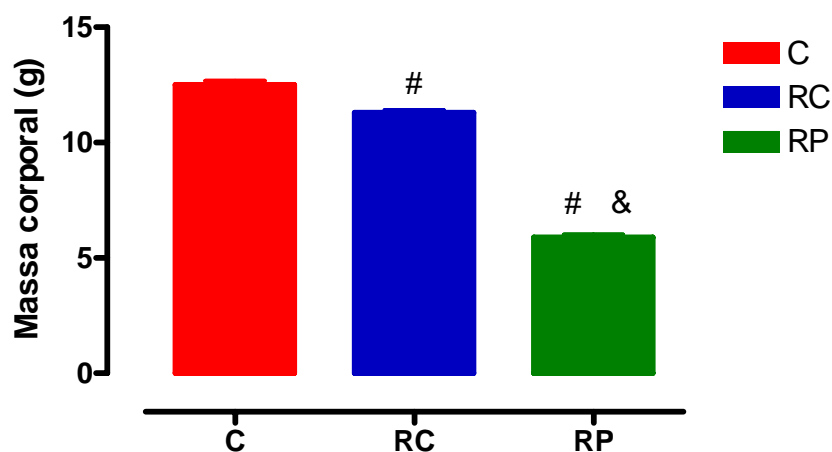
Avaliada através de radioimunoensaio, utilizando o kit específico para murinos (ImmuChemTM <sup>125</sup>I, duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 4,4%, sendo o limite mínimo de detecção de 50ng/mL. Os valores foram expressos em ng/mL.

### **Análise estatística**

Utilizamos o programa Prism®4 para Microsoft Windows® para realização das análises estatísticas e montagem dos gráficos. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados por Análise de Variância Univariada (One-Way ANOVA), seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Utilizamos o teste t de *Student* para avaliar o efeito da infecção (grupo não infectado vs grupo infectado).

## 5 RESULTADOS

Os filhotes RC e RP apresentaram menor massa corporal em relação ao C já a partir do 5º dia de vida. Como visto na Fig. 3, ao desmame, ambos os grupos desnutridos apresentaram redução da massa corporal (RC vs C: -11%, RP vs C: -53%; RP vs RC: -48%;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 3:** Massa corporal ao desmame (21 dias) dos filhotes dos grupos C (n= 23), RC (n= 22) e RP (n=30). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,0001$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vs RC).

### Avaliação nutricional pós-desmame

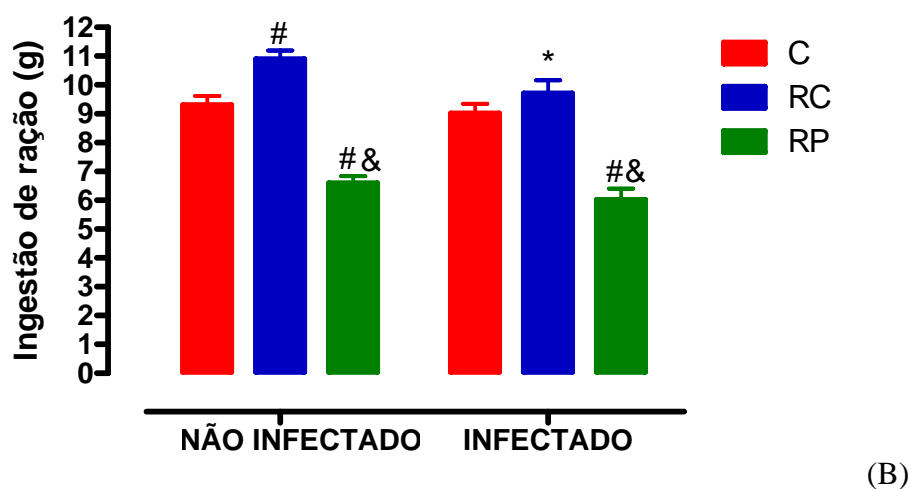
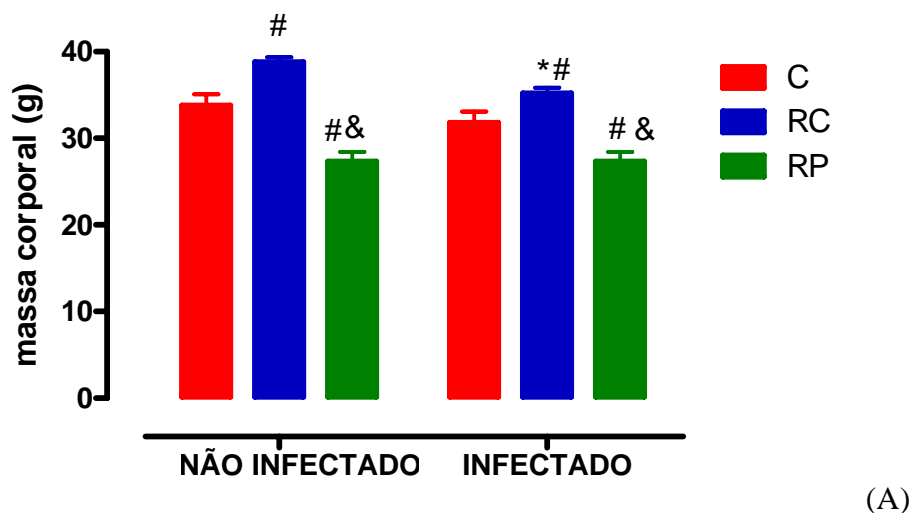
#### Efeito da programação

Nos animais não infectados, observamos que a prole RP apresentou redução da massa corporal (-19% vs C,  $p < 0,01$ ). Já a prole RC exibiu maior ganho de massa corporal (+15% vs C,  $p < 0,05$ ). A ingestão alimentar foi maior na prole RC (vs C + 19%,  $p < 0,01$ ) e menor na prole RP (-39% vs C; -40% vs RC,  $p < 0,001$ ).

#### Efeito da infecção

O grupo RC infectado mostrou menor massa corporal (fig. 4A) em comparação ao camundongo RC não infectado (RC vs RCI: -9%;  $p < 0,001$ ), assim como menor ingestão de ração (-11% vs RCI,  $p < 0,05$  - fig. 2B).

Ao sacrifício (9<sup>a</sup> semana de infecção), a prole RP infectada exibiu menor massa corporal (-14% vs C,  $p < 0,05$ ; -23% vs RC,  $p < 0,001$ ) e menor consumo de ração (-33% vs C; -38% vs RC;  $p < 0,001$ ).



**Figura 4:** Massa corporal (A) e ingestão alimentar (B) aos 120 dias de idade das proles controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) não infectadas e infectadas.  $n=10$ /grupo. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RCI vs RC; # vs C, & vs RC).

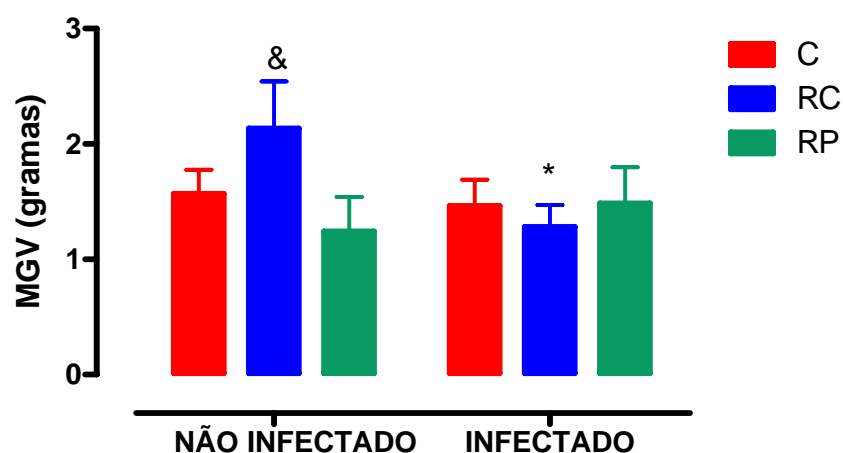
### Efeito da programação

A gordura visceral dos animais não infectados do grupo RC foi maior (+72% vs RP;  $p < 0,05$ ).

### Efeito da infecção

Observamos que a infecção reduziu a gordura visceral (fig.5) do grupo RC em 40% (RC vs RCI;  $p < 0,05$ ). A infecção não alterou significativamente a gordura visceral das proles C e RP.

Nos animais programados infectados, não observamos alteração da MGV entre os grupos.



**Figura 5:** Massa de gordura visceral (MGV) na 17<sup>a</sup> semana de vida da prole programada não infectada e infectada dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RC vs RCI; & vs RP).

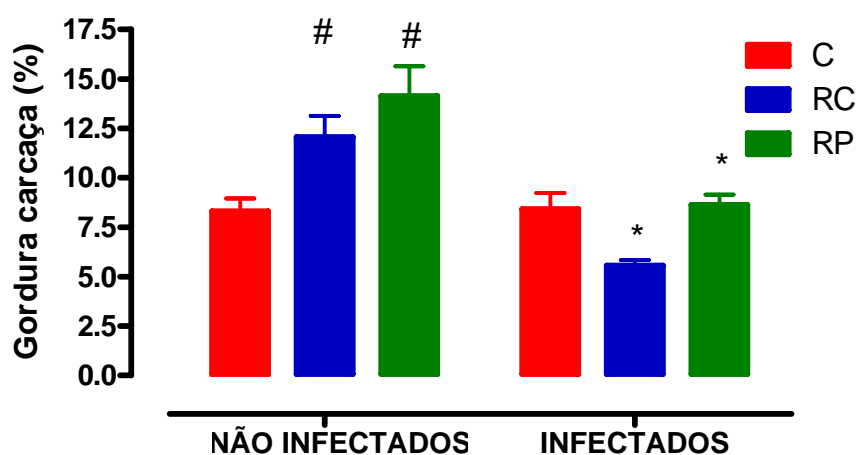
### Efeito da programação

Nos animais não infectados, observamos que a gordura corporal total foi maior nos grupos RC (+45% vs C;  $p < 0,05$ ) e RP (+70% vs C;  $p < 0,001$ ).

### Efeito da infecção

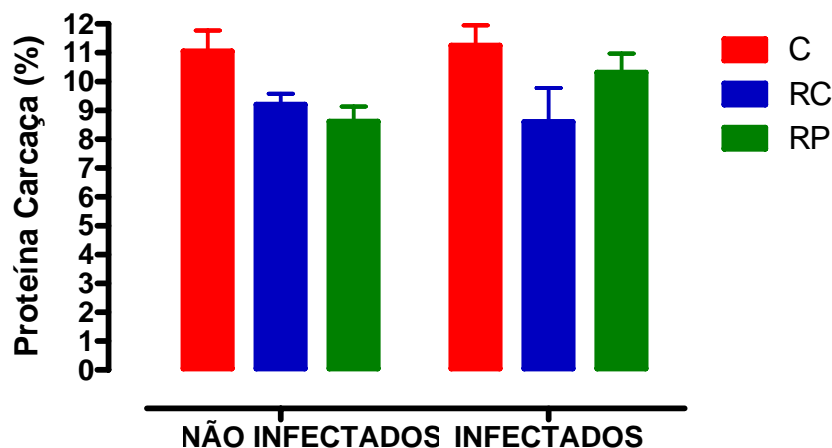
Os grupos RC e RP infectados mostraram menor massa de gordura corporal (fig. 6) em comparação aos seus respectivos grupos não infectados (RC vs RCI: -54%; RP vs RPI: -39%;  $p < 0,001$ ).

Quanto aos animais programados infectados, verificamos que a prole RC apresentou apenas tendência a menor gordura corporal.



**Figura 6:** Conteúdo corporal de gordura total na 17ª semana de vida da prole programada não infectada e infectada dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RCI vs RC; RPI vs RP; # vs C).

O conteúdo de proteínas totais (fig. 7) não foi afetado significativamente pela infecção ou pela programação.



**Figura 7:** Conteúdo corporal de proteínas totais na 17<sup>a</sup> semana de vida da prole programada não infectada e infectada dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção.

## Peso dos órgãos

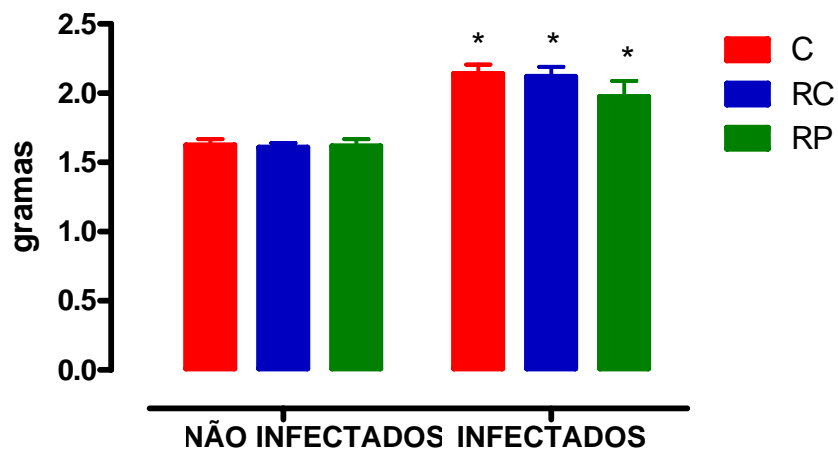
### Efeito da programação

Verificamos que os pesos de fígado (fig. 8), baço (fig. 9), rim (fig. 10) e intestinos (fig. 11) das proles C, RC e RP não infectadas não foram estatisticamente diferentes.

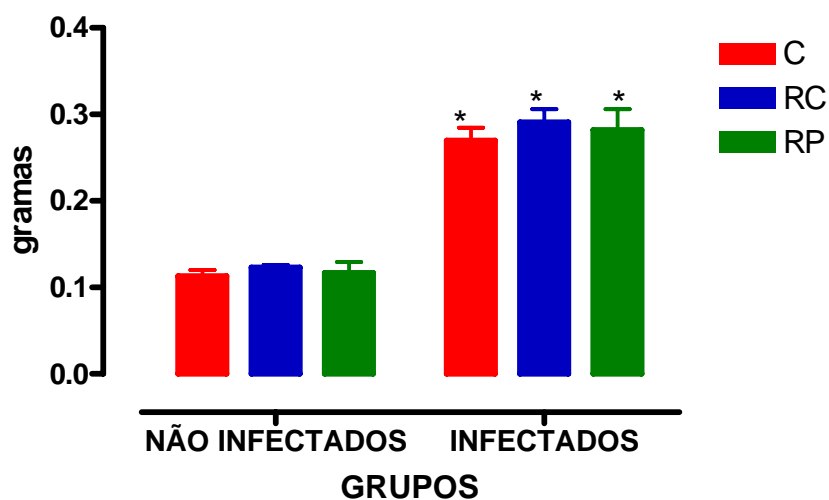
### Efeito da infecção

A infecção causou aumento significativo do peso do fígado em todas as proles (C vs CI: +32%; RC vs RCI: +32%,  $p < 0,0001$ ; RP vs RPI: +16%,  $p < 0,05$  - fig. 8), assim como no peso do baço (C vs CI: +139%; RC vs RCI: +137%; RP vs RPI: +141%;  $p < 0,0001$  - fig. 9). A infecção causou aumento do peso dos rins na prole RC (+30% vs RCI;  $p < 0,0001$  - fig. 10). Não observamos diferença significativa no peso dos intestinos entre os grupos infectados e não infectados (fig. 11).

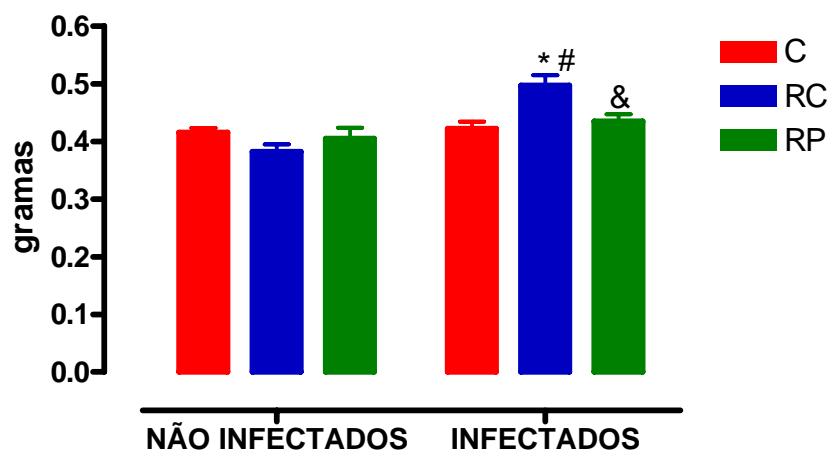
Entre os camundongos programados infectados, o grupo RC mostrou maior peso dos rins (+18% vs C e +12% vs RP;  $p < 0,01$ ).



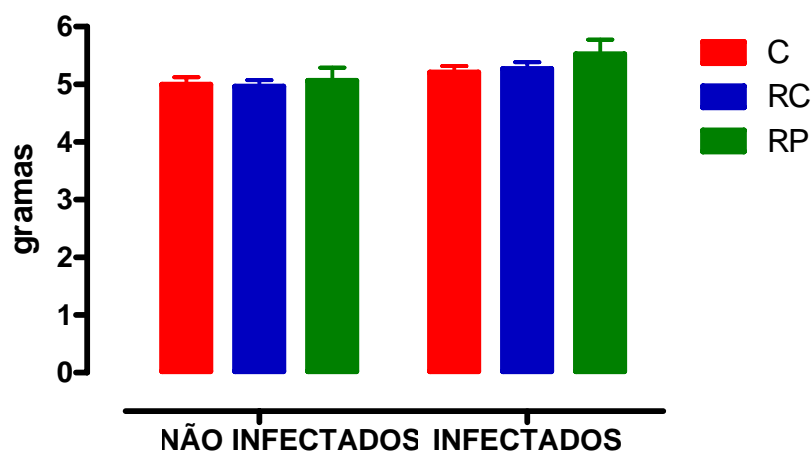
**Figura 8:** Peso do fígado dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* vs prole não infectada).



**Figura 9:** Peso do baço dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* vs prole não infectada).



**Figura 10:** Peso dos rins dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (\* RC vs C; # vs C; & vs RC).



**Figura 11:** Peso do intestino dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção.



## Concentrações séricas hormonais

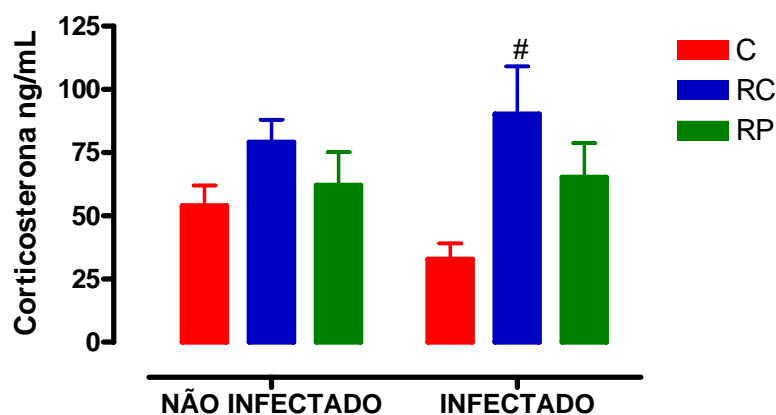
### Efeito da programação

Observamos que a programação não foi capaz de alterar significativamente a corticosterona sérica das proles programadas (fig. 12). Quanto a leptina, verificamos que a prole RC apresentou maiores concentrações séricas (+115% vs C; fig. 13).

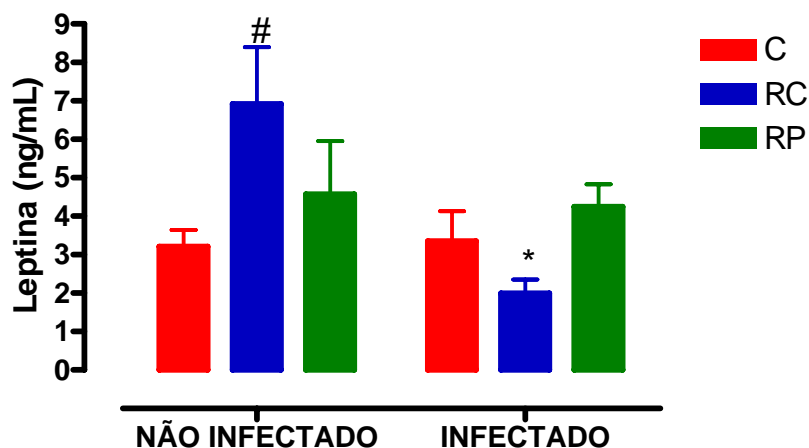
### Efeito da infecção

A infecção nos camundongos programados do grupo RC levou a hipercorticosteronemia (+175% vs C;  $p < 0,05$ ).

A infecção causou na prole RC uma redução na concentração de leptina sérica em comparação ao seu respectivo grupo não infectado (RC vs RCI: -71%; fig. 13).



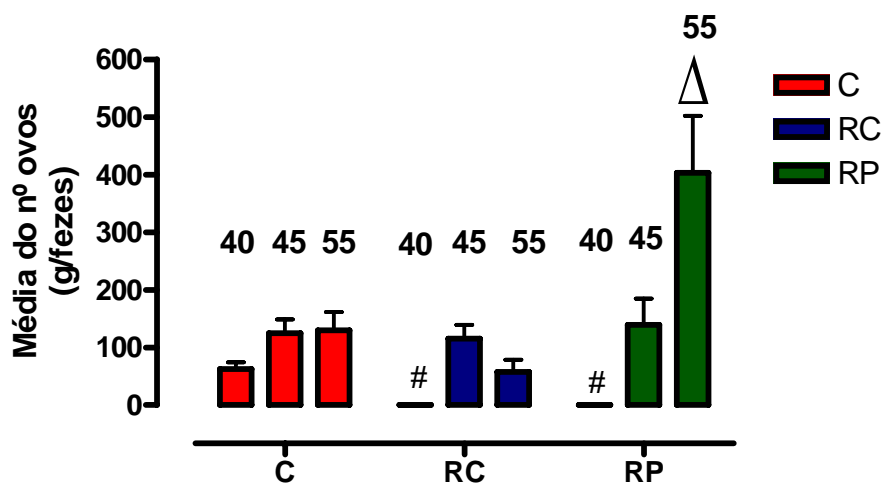
**Figura 12:** Concentração sérica de corticosterona dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (# vs C).



**Figura 13:** Concentração sérica de leptina dos camundongos não infectados e infectados dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Utilizamos o teste t de Student para avaliar o efeito da infecção (# vs C e \*RC vs RCi).

#### **Avaliações parasitológicas período pré-patente e dinâmica de eliminação de ovos nas fezes**

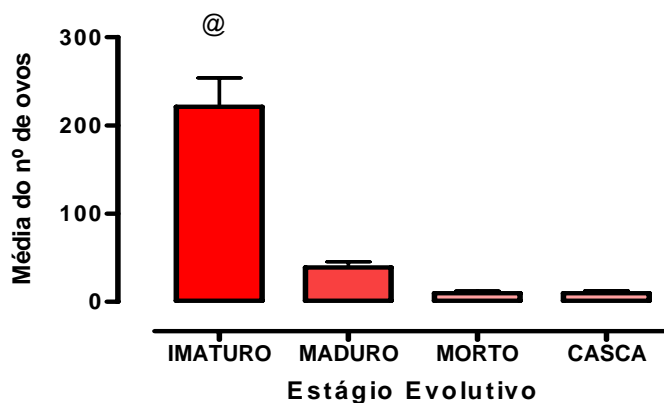
Na prole C, o período pré-patente foi de 40 dias, enquanto que nas proles RC e RP este período foi mais longo, com 45 dias ( $p < 0,001$ ). Aos 45 dias de infecção, todos os grupos apresentaram quantidades semelhantes de ovos nas fezes. Aos 55 dias de infecção, o grupo RP apresentou maior número de ovos nas fezes (+211% vs C; +600% vs RC,  $p < 0,01$  - fig.14). O número total de ovos eliminados nas fezes apresentou diferença significativa entre os grupos RP e RC (RP vs RC +113%,  $p = 0,0013$ ).



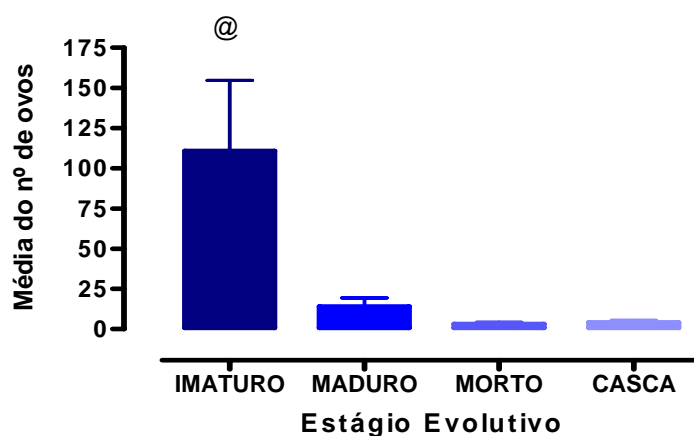
**Figura 14:** Eliminação média de ovos observados nas fezes de camundongos dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C aos 40 dias;  $\Delta$  vs C e RC aos 55 dias).

### Padrão de oograma

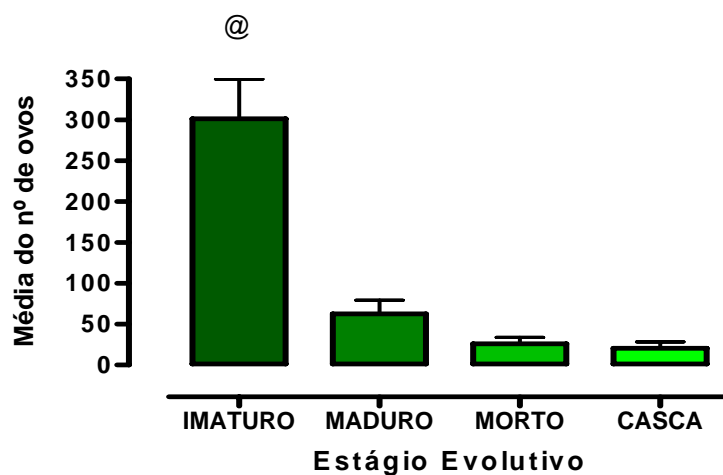
Todas as proles apresentaram maior quantidade de ovos imaturos na porção distal do intestino delgado (fig. 15).



(A)



(B)



(C)

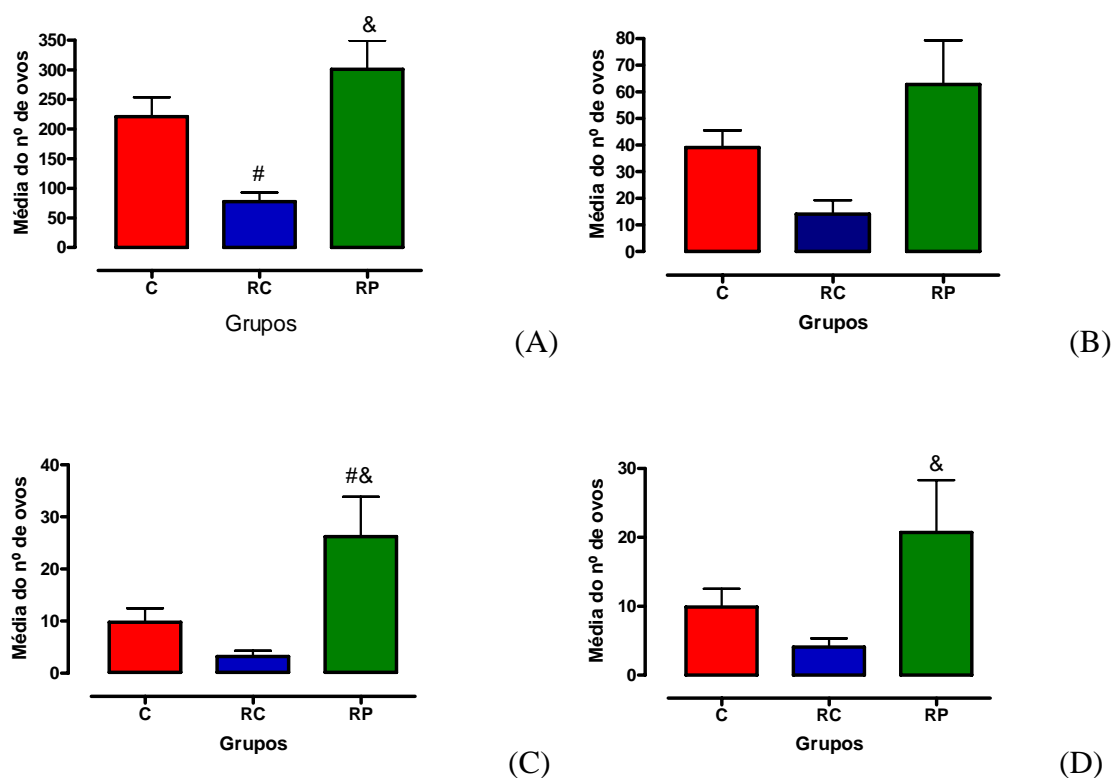
**Figura 15:** Número de ovos na porção distal do intestino delgado das proles C (A), RC (B) e RP (C). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (@ vs todos).

A prole RC (fig. 16A) apresentou menor quantidade de ovos imaturos (-65% vs C,  $p < 0,01$ ) enquanto que a prole RP exibiu aumento de 288% de ovos imaturos em relação ao RC ( $p < 0,001$ ).

Observamos maior quantidade de ovos maduros (fig. 16 B) na prole RP (+561% vs RC,  $p < 0,01$ ).

Observamos maior quantidade de ovos mortos na prole RP (+167% vs C,  $p < 0,05$ ; +803% vs RC,  $p < 0,01$  fig. 16C).

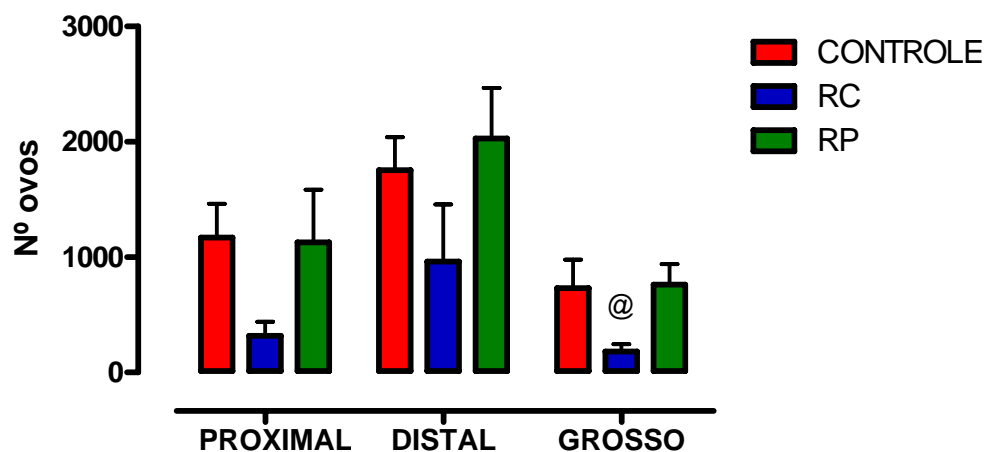
Maior quantidade de cascas (fig.16 D) foi observada no grupo RP (+ 405% vs RC,  $p < 0,05$ ).



**Figura 16:** Oograma no segmento da porção distal do intestino delgado das proles C, RC e RP. (A) Imaturos, (B) Maduros, (C) Mortos e (D) Cascas de ovos. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C, & vs RC).

### Carga de ovos nas porções intestinais

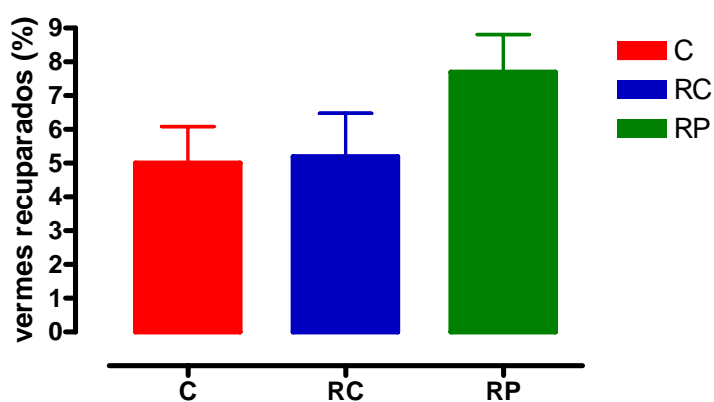
Nas porções proximal e distal do intestino delgado, não observamos alterações na carga de ovos entre as proles programadas. Entretanto, a carga foi maior no segmento distal. No intestino grosso, a prole RC apresentou a menor quantidade de ovos (-75% vs C,  $p < 0,05$ ).



**Figura 17:** Média da carga de ovos nos segmentos intestinais das proles controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (@ vs todos os grupos na porção do intestino grosso).

## Infectividade

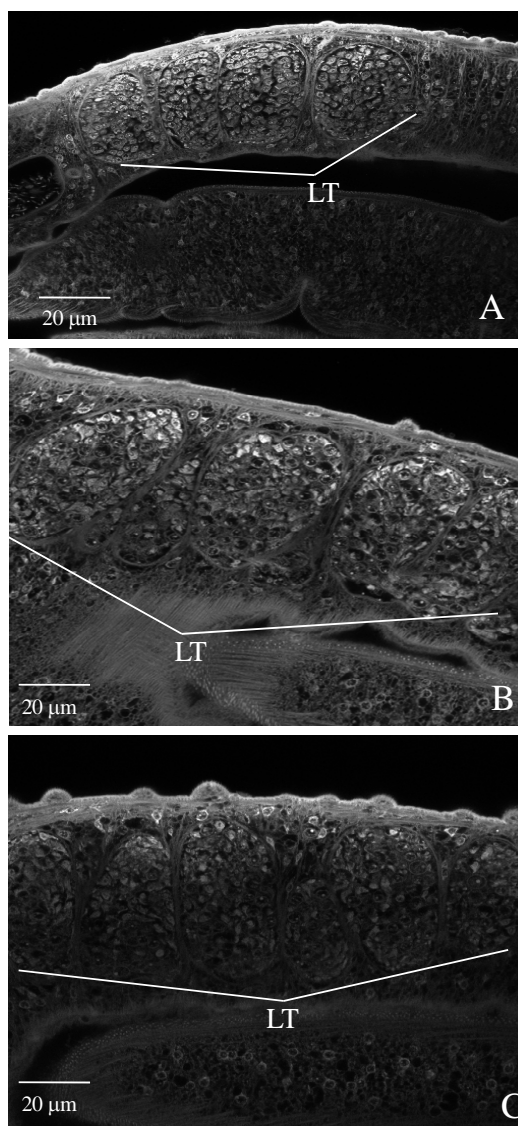
A infectividade foi de 12%. Todos os 179 helmintos (105 machos - 74 fêmeas) recuperados dos camundongos na 17ª semana de vida estavam localizados na veia porta hepática e mesentéricas. Deste total, 50 são C (10%), 52 são RC (10,4%) e 77 são RP (15,4%), sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 18:** Recuperação de vermes adultos de *S. mansoni* no sistema porta e vasos mesentéricos das proles dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP). Valores expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls.

### Análise morfológica dos machos de *S. mansoni*

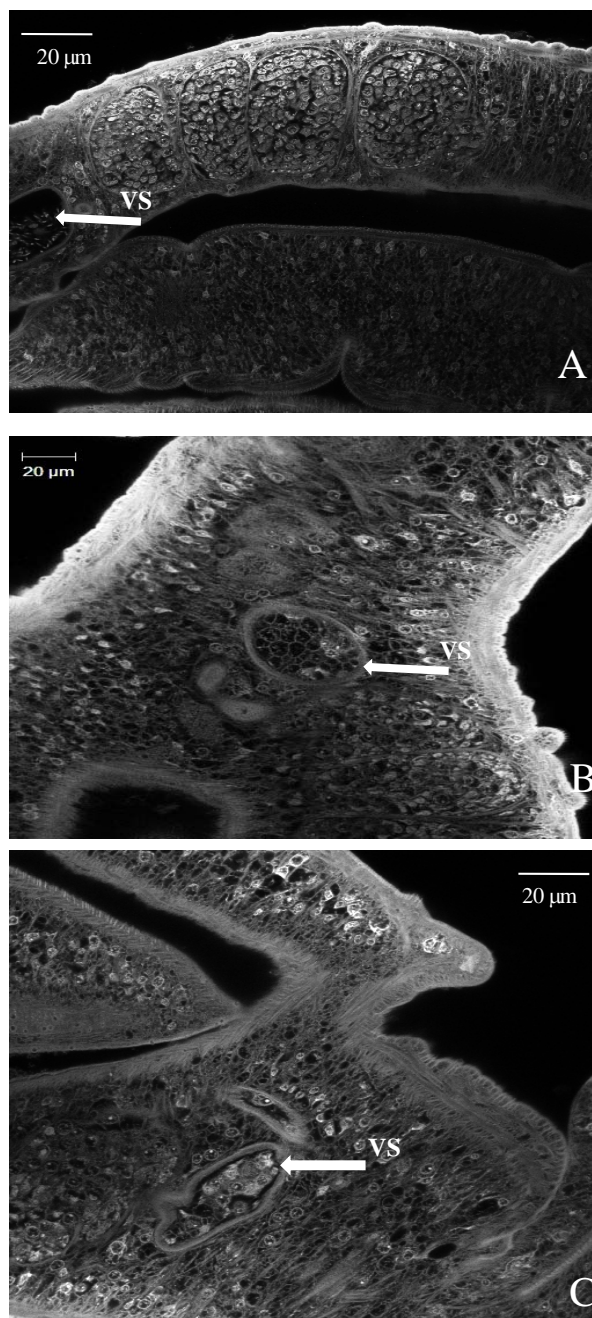
Observamos que os vermes recuperados da prole C apresentaram sistema reprodutor com presença de 6 a 12 lóbulos testiculares, enquanto que os da prole RC apresentaram de 6 a 9 lóbulos testiculares e os da prole RP, apresentaram de 6 a 13 lóbulos testiculares. Todos apresentaram células germinativas bem diferenciadas em seu interior (fig. 19).



**Figura 19 :** Lobos Testiculares (LT) de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

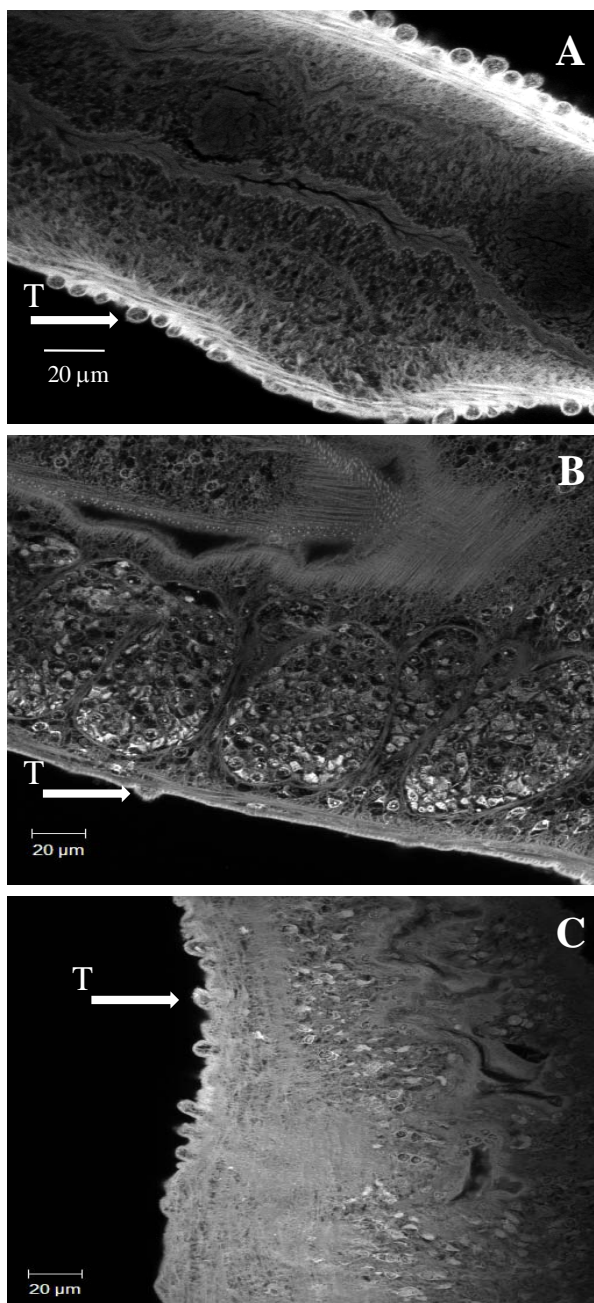


No interior da vesícula seminal de todos os vermes adultos dos grupos RC e RP foram observadas células com padrão de diferenciação modificado (células arredondadas e com variações na concentração de material interno, figuras 20 B e 20 C, respectivamente) em relação ao tipo celular encontrado no grupo controle (células com padrão morfológico alongado, fig. 20 A). No grupo RC, 70% das vesículas seminais observadas apresentaram redução de células em seu interior em relação às proles C e RP (fig. 20 A,C).



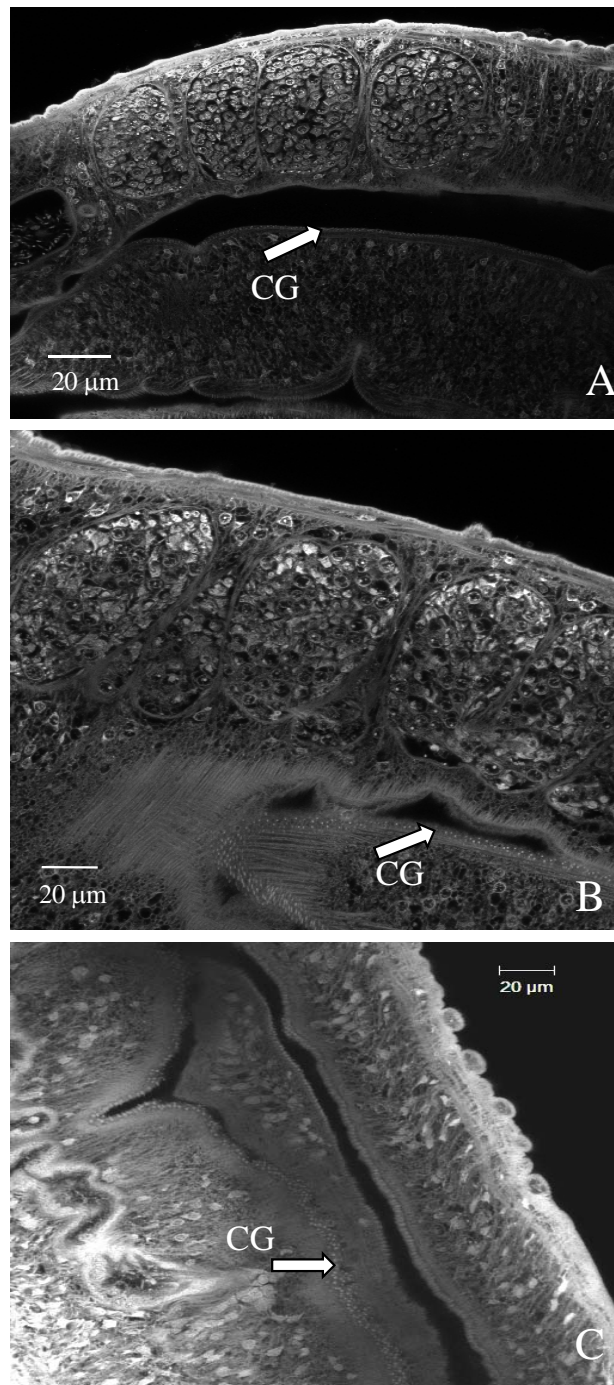
**Figura 20:** Vesícula Seminal (VS) de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

Quanto à morfologia do tegumento, verificamos que todos os vermes adultos do grupo RC, apresentaram uma distribuição irregular de tubérculos ao longo do corpo do parasito com baixas projeções e aparência rudimentar sem espinhos (100% vs C, fig. 21 B). No grupo RP, observou-se uma distribuição irregular de tubérculos ao longo do corpo do parasito em todos os vermes adultos (100% vs C, fig. 21 C).



**Figura 21:** Presença de Tubérculos (T) no tegumento de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

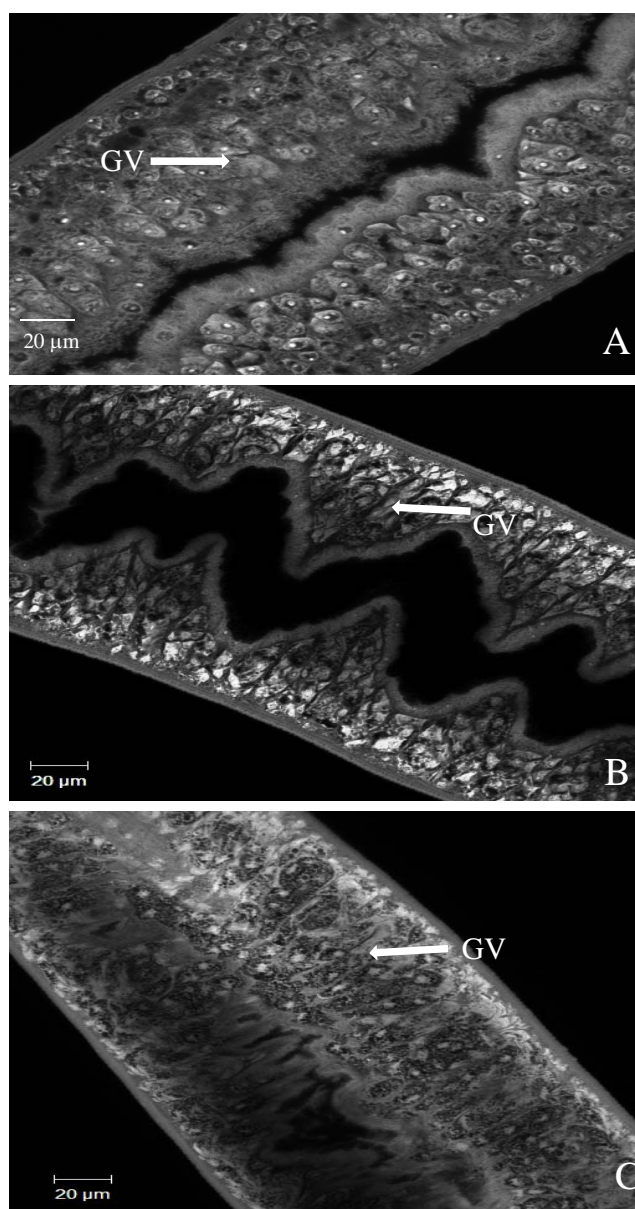
Conforme esperado, os vermes das três proles apresentaram do canal ginecóforo, eventualmente, destacando a presença de espinhos (fig. 22).



**Figura 22:** Canal Ginecóforo (CG) de machos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

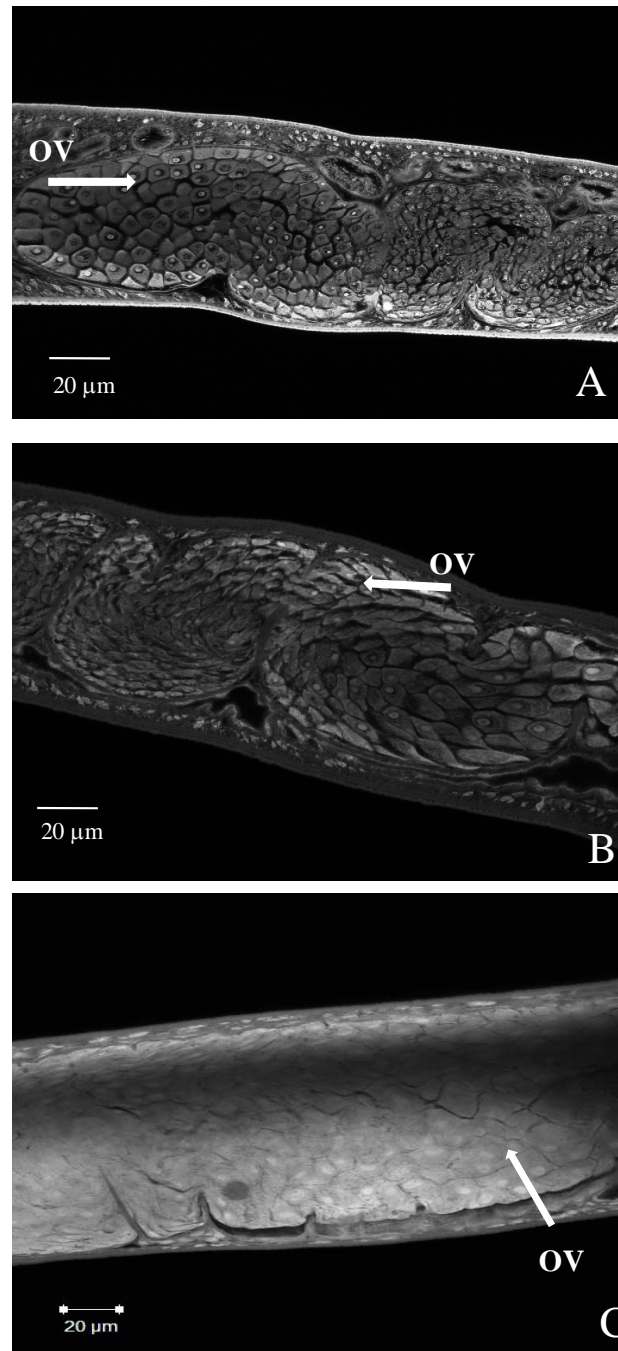
### Análise morfológica das fêmeas de *S. mansoni*

Os vermes recuperados da prole C apresentaram glândulas vitelínicas bem estruturadas, com diferenciação celular e núcleos celulares bem evidentes, enquanto que os vermes recuperados das proles RC e RP apresentaram glândulas vitelínicas mal estruturadas (100% vs C) e com perda do padrão morfológico celular. Estes grupos também apresentaram menor densidade e produção reduzida de vitelo (60% vs C) (fig. 23).



**-Figura 23:** Glândulas Vitelínicas (GV) de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

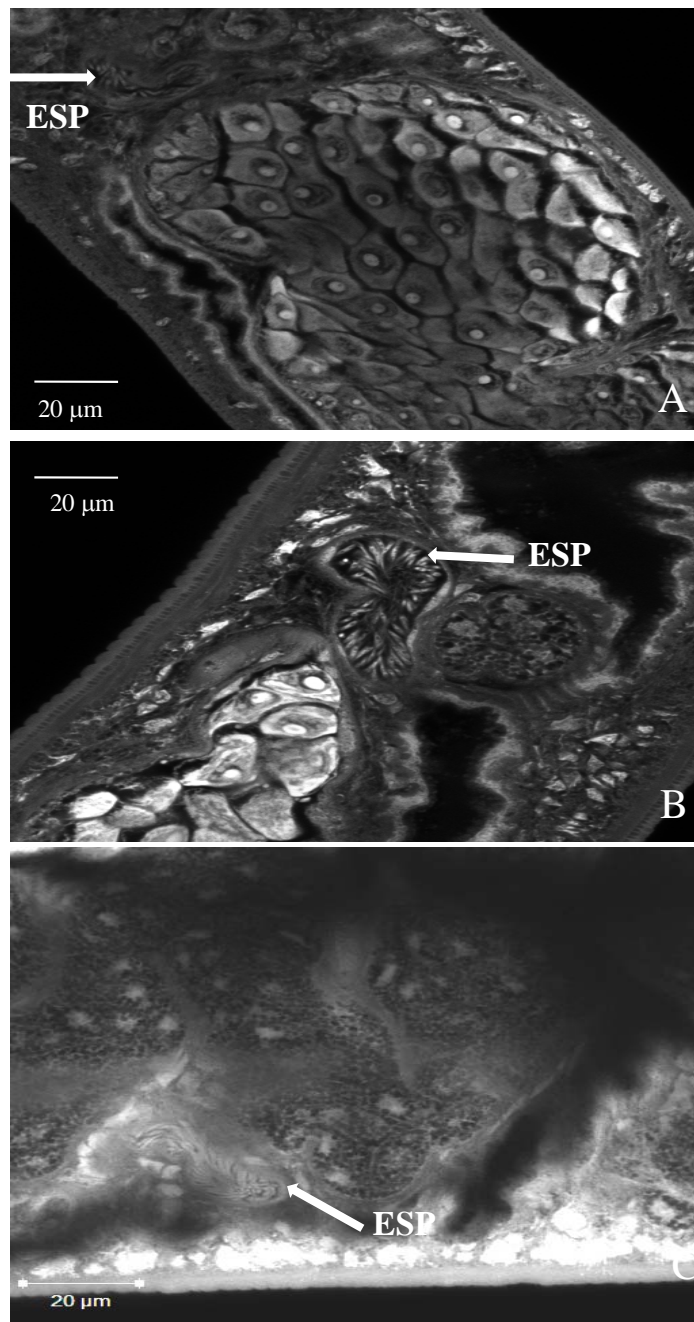
Na morfologia dos ovários dos vermes adultos recuperados do grupo RC, pode-se observar que 67% exibiram ovários com presença de oócitos bem diferenciados em relação ao grupo C (fig. 24 B). No grupo RP, no ovário foi observado imaturidade dos oócitos, alteração de tamanho, forma e quantidade de células (100% vs C, fig. 24 C).



**Figura 24:** Ovário (OV) de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

No grupo RC, a espermateca, exibiu quantidade aproximada de espermatozoides em seu interior em 60% em relação ao grupo C, enquanto que no grupo RP a espermateca foi de difícil visualização na microscopia ótica. Com a visualização no

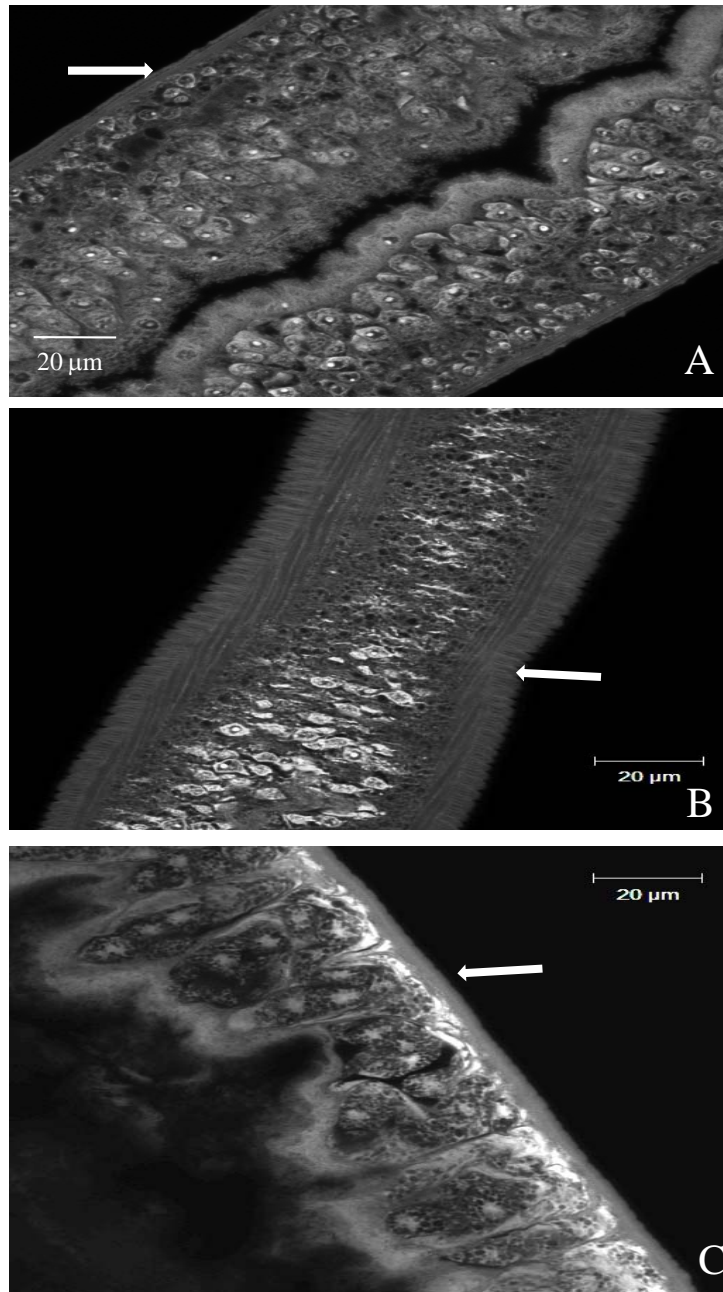
confocal, a espermateca de todos os vermes recuperados exibiu menor quantidade de espermatozóides quando comparada com o grupo C (fig. 25).



**Figura 25** : Espermateca (ESP) de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

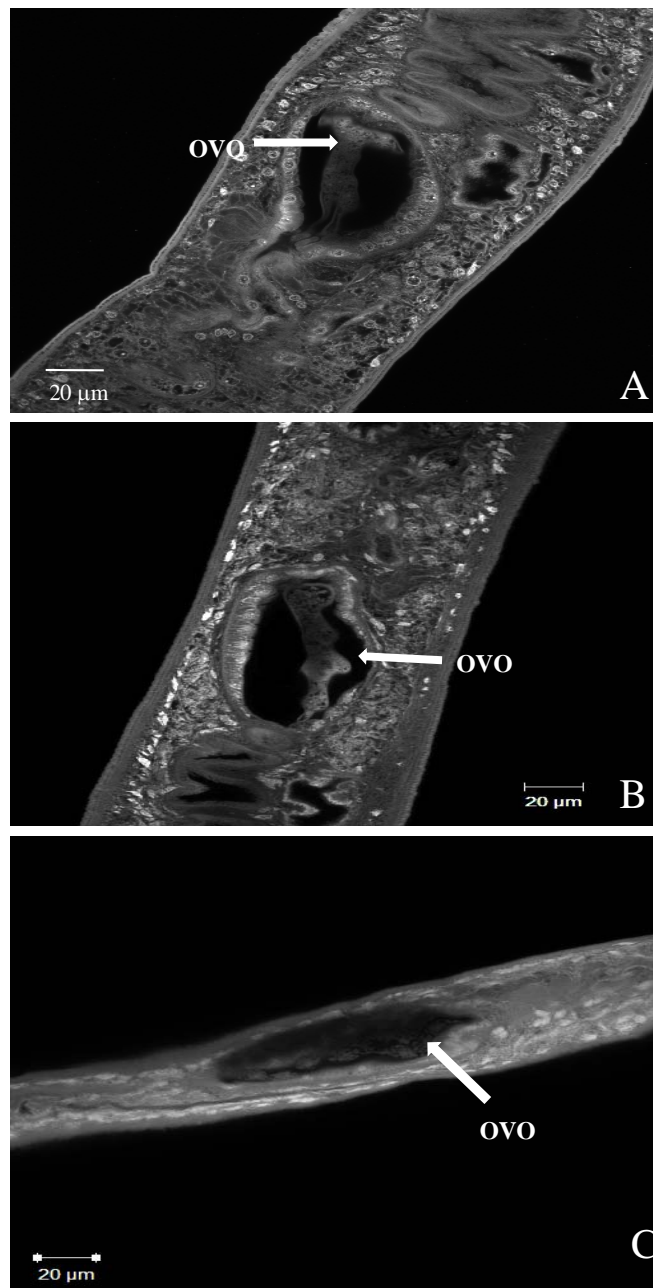


Nos grupos RC e RP, o tegumento apresentou aspecto serrilhado (90% vs C). No grupo RC (fig. 26 B) este aspecto foi mais acentuado.



**Figura 26:** Tegumento de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

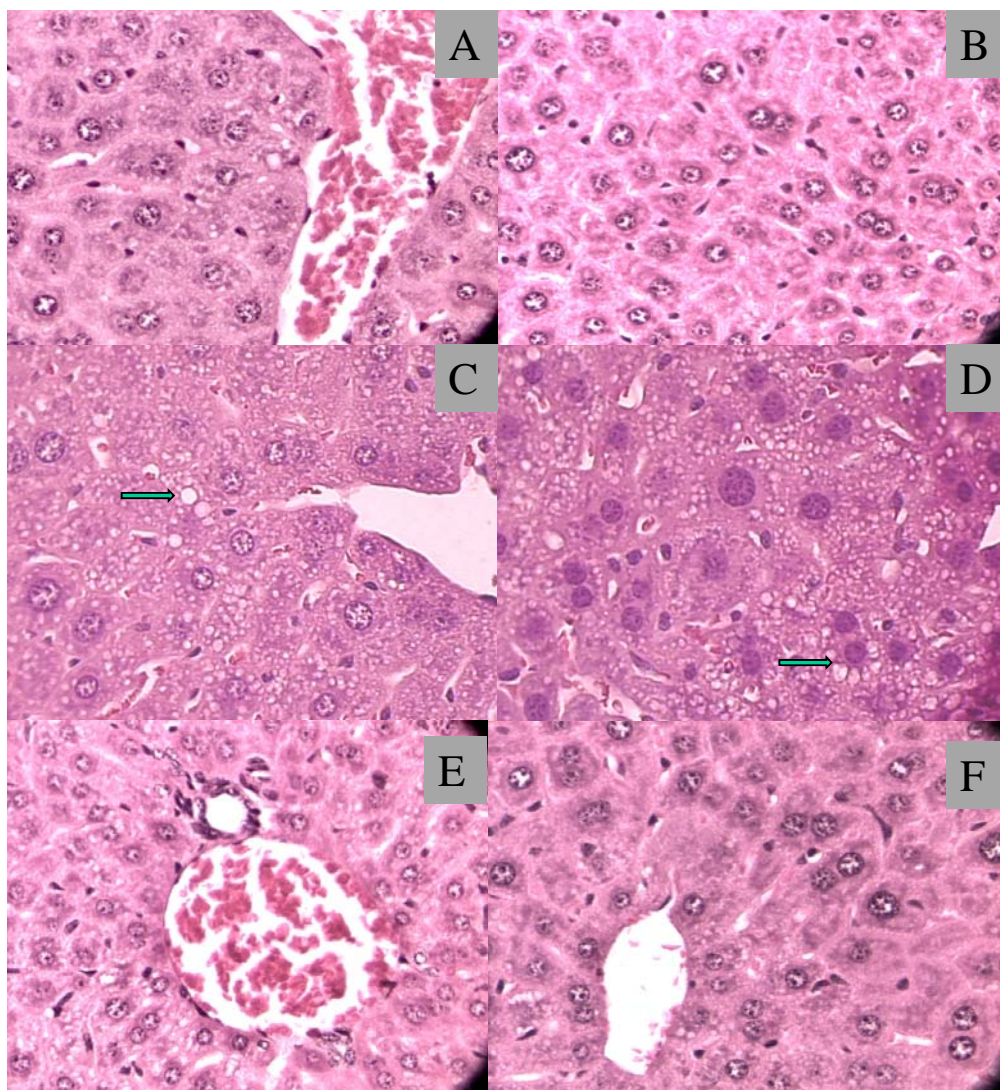
Em todos os grupos foram observados miracídeos em diferentes estágios de desenvolvimento no oótipo e no útero (fig. 27 A, B e C). No grupo C, todos os ovos foram observados no útero e os ovos já continham o espículo lateral (imagem não mostrada). No grupo RC foram observados ovos presentes no oótipo (100%), enquanto que no grupo RP, os ovos observados apresentaram características morfológicas variadas e a localização ficou dividida em 50% entre presença no útero e no oótipo, quando comparado ao grupo C.



**Figura 27 :** Ovo de fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* em camundongos controle (A), programados por restrição calórica (B) e programados por restrição protéica (C), observados com microscopia de varredura a laser confocal.

### Avaliação histopatológica hepática de camundongos não infectados programados pela desnutrição materna na lactação

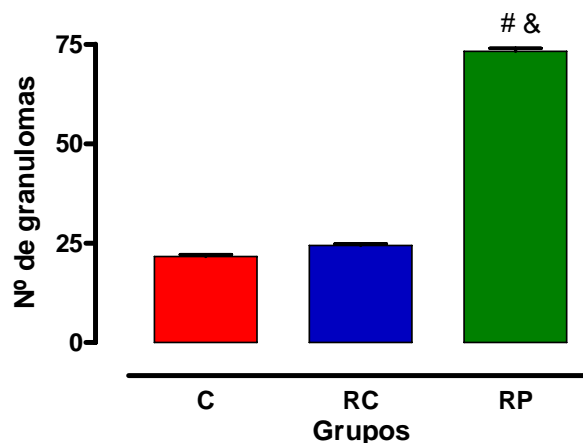
As proles C e RP exibiram as estruturas do fígado com aspectos normais mantendo a arquitetura trabecular preservada. A prole RC apresentou esteatose hepática microvesicular (fig.28).



**Figura 28:** Fotomicrografia dos fígados das proles não infectados programadas pela desnutrição na lactação. A- veia porta controle (C) corado com H&E (40X), B- hepatócitos do grupo C corado com H&E (40X), C- veia porta e presença de esteatose microvesicular → do grupo restrição calórica (RC) corado com H&E (40X), D- hepatócitos apresentando esteatose microvesicular → do grupo RC corado com H&E (40X), E- espaço porta do grupo restrição protéica (RP) corado com H&E (40X), F- hepatócitos do grupo RP corado com H&E (40X). Aspecto normal: A, B, E e F.

## Avaliação quantitativa e avaliação histopatológica hepática em camundongos esquistossomóticos programados pela desnutrição materna na lactação

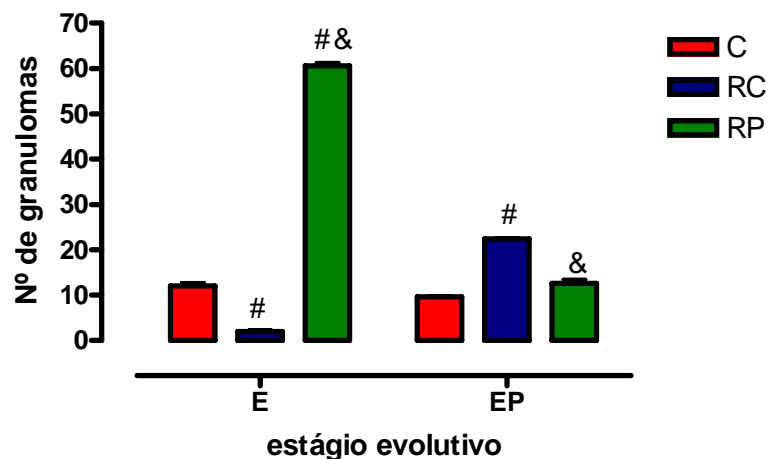
Observamos que a prole RP apresentou aumento no número total de granulomas hepáticos (+233% vs C e +200% vs RC;  $p < 0,001$ ) (fig.29).



**Figura 29:** Número de granulomas hepáticos por campo microscópico das proles dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) na fase aguda da infecção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,001$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vs RC).

Os granulomas hepáticos foram classificados segundo Lenzi et al. (1998) em 5 fases: duas fases pré-granulomatosas e três fases granulomatosas. As fases pré-granulomatosas são: fraca e/ou inicial reativa (IR) e exsudativa (E) (formação de um tecido frouxo de células inflamatórias ao redor do ovo). As fases granulomatosas são: exsudativa-produtiva (EP) (com produção de fibras colágenas dando um aspecto circunferencial), produtiva (P) (avançada fase fibrótica) e Involutiva (I). Os estágios evolutivos dos granulomas hepáticos não observados foram o produtivo e o involutivo.

Na figura 30 estão apresentados os tipos de granulomas encontrados de acordo com os grupos. Verificamos que a prole RC teve menor número de granulomas do tipo exsudativos (E) (-83% vs C,  $p < 0,001$ ) e maior número de granulomas do tipo exsudativo-produtivo (EP) (+133% vs C; +78% vs RP,  $p < 0,001$ ). A prole RP apresentou maior número de granulomas do tipo E (+405% vs C; +2.930% vs RC,  $p < 0,001$ ) e menor número de granulomas do tipo EP (-44% vs RC,  $p < 0,001$ ).

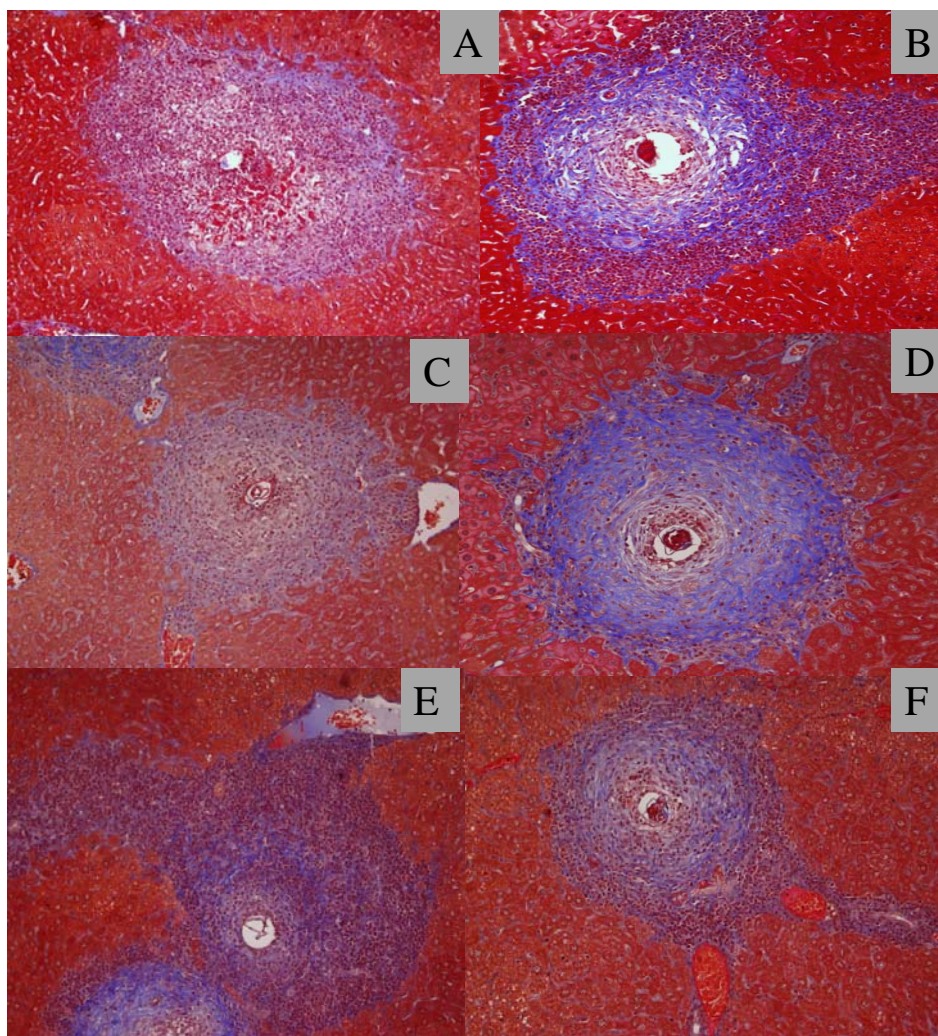


(B)

**Figura 30:** Estágios evolutivos de granulomas hepáticos das proles dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) necropsiados com nove semanas (fase aguda) da infecção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,001$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vs RC). LEGENDA: **E** - Exsudativo e **EP** - Exsudativo-Produtivo.

Na figura 31 são apresentadas lesões peri-ovulares na fase pré-granulomatosa, caracterizada por exsudativa (A, C e E) e fase granulomatosa exsudativo-produtivo (B, D e F) nos diferentes grupos (A e B grupo controle, C e D restrição calórica e E e F restrição protéica). Na fase pré-granulomatosa exsudativa pode-se observar a destruição do parênquima adjacente com a formação de um tecido necrótico (A, C e E) e a migração leucocitária proveniente de estrutura vascular adjacente (C e E).

Os granulomas exsudativo-produtivo apresentam uma estrutura neocolagênica formando uma malha com concentricidade das fibras (B, D e F). Nos grupos C e RP podem-se observar três camadas claramente definidas pelo arranjo das fibras: zona interior que consistiu de macrófagos, a zona central ou paracentral rico em fibras e na zona externa, predominantemente celular com escassas quantidades de fibras (B e F). No grupo RC a malha da camada fibrosa paracentral apresentou-se mais compacta, paralelas e concêntricas, mostrando um arranjo circunferencial (D).



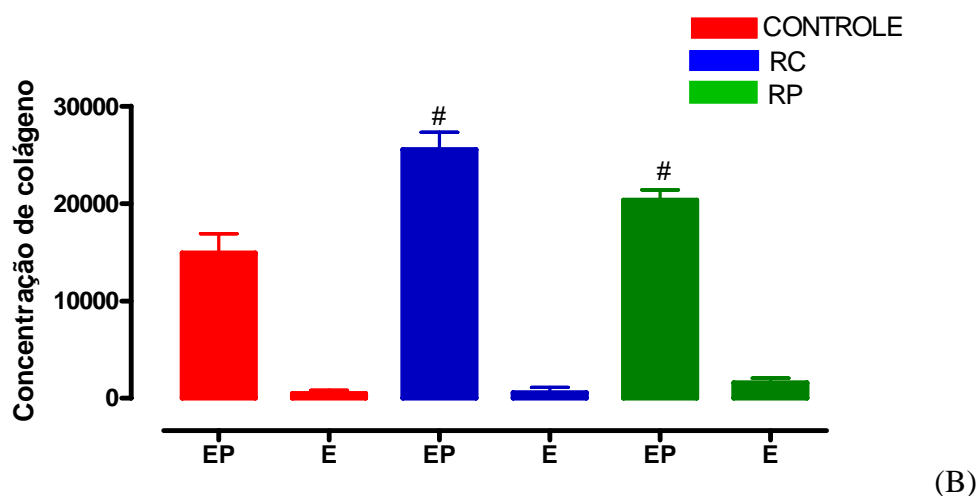
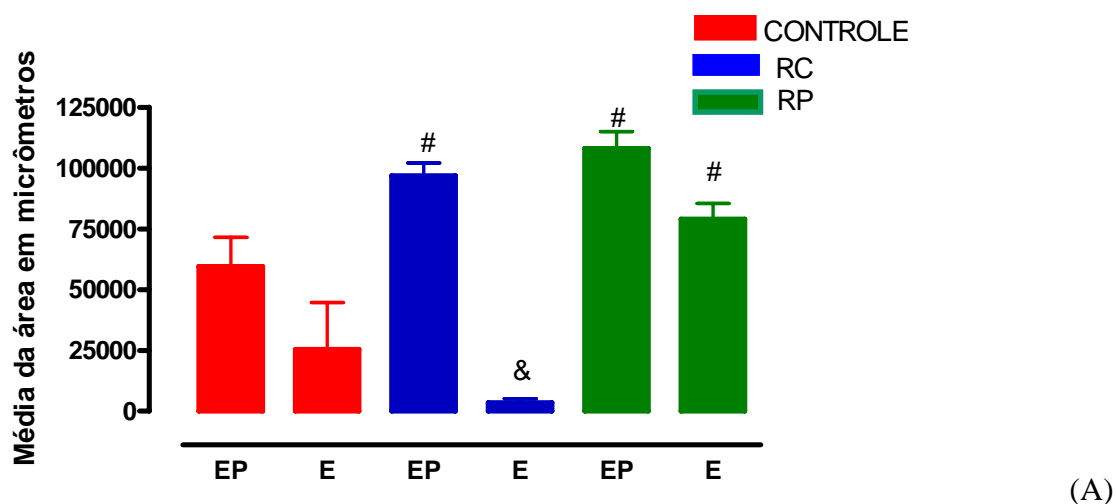
**Figura 31:** Fotomicrografia do fígado de animais programados e controles infectados com *Schistosoma mansoni*, granulomas hepáticos são mostrados corados por Tricrômico de Masson. A- granuloma exsudativo com células em torno do ovo no grupo controle (C) (10X), B- granuloma exsudativo-productivo no grupo C (10X), C- granuloma exsudativo no grupo de restrição calórica (RC) (10X), D- granuloma exsudativo-productivo no grupo RC (10X), E- granuloma exsudativo no grupo restrição protéica (RP) (10X), F- granuloma exsudativo-productivo no grupo RP (10X).

### Morfometria dos granulomas hepáticos e concentração de colágeno

Apenas realizamos as análises morfométricas das áreas com presença de ovos de *S. mansoni*. Comparando o estágio de desenvolvimento dos granulomas hepáticos dentro de cada grupo, observamos que a prole RP apresentou maior aumento na área de granulomas do tipo E (82% vs C;  $p < 0,01$ ) (fig. 32A). Por sua vez, foi 92% menor na prole RC (vs RP;  $p < 0,001$ ). Quanto aos granulomas EP, observamos que a prole RC

apresentou um aumento de 63% (vs C;  $p < 0,05$ ), enquanto a prole RP apresentou aumento de 82% (vs C;  $p < 0,05$ ).

A concentração de colágeno (fig.32 B) não foi significativamente diferente entre as proles nos granulomas do tipo E. A concentração de colágeno nos granulomas EP na prole RC apresentou aumento de 71% (vs C;  $p < 0,05$ ), enquanto a prole RP apresentou aumento de 36% (vs C;  $p < 0,05$ ).

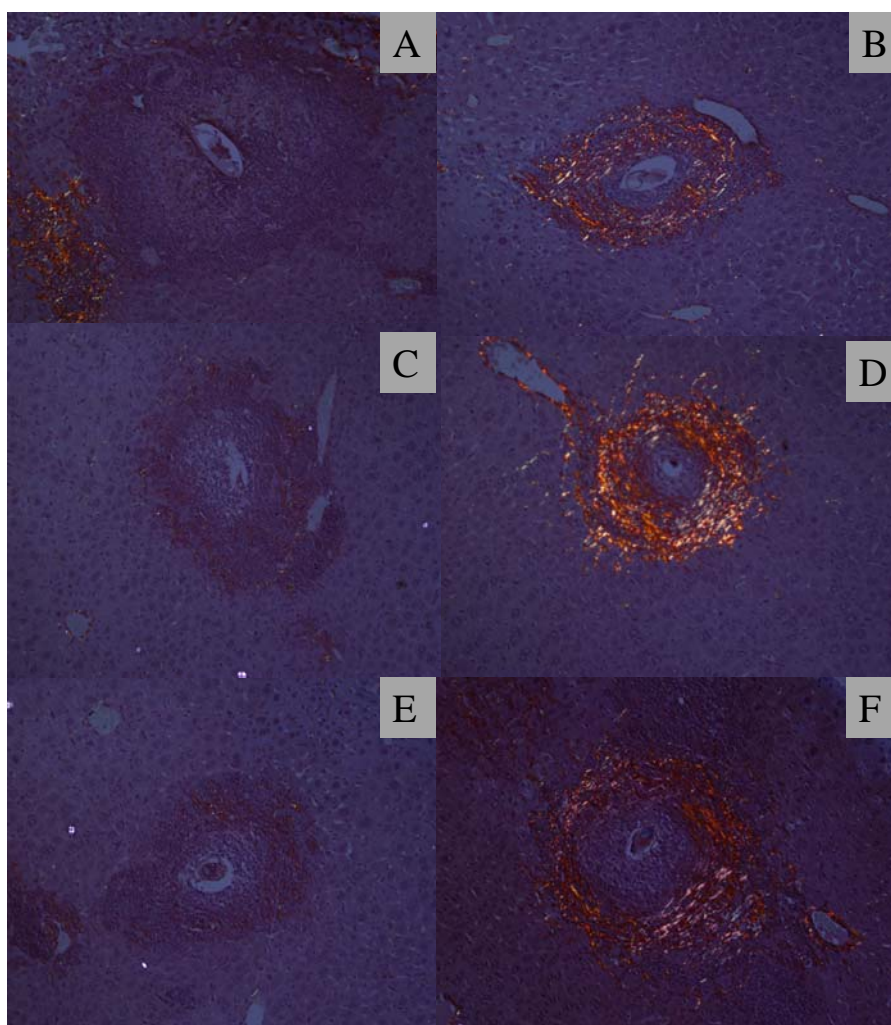


**Figura 32:** Área de granulomas por campo microscópico (A) e concentração de colágeno dos granulomas (B) encontrados no fígado dos camundongos dos grupos controle (C), restrição calórica (RC) e restrição protéica (RP) na fase aguda da infecção. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ . ANOVA seguida de pós-teste de Newman-Keuls (# vs C e & vs RC). LEGENDA: E - Exsudativo e EP - Exsudativo-Produtivo.



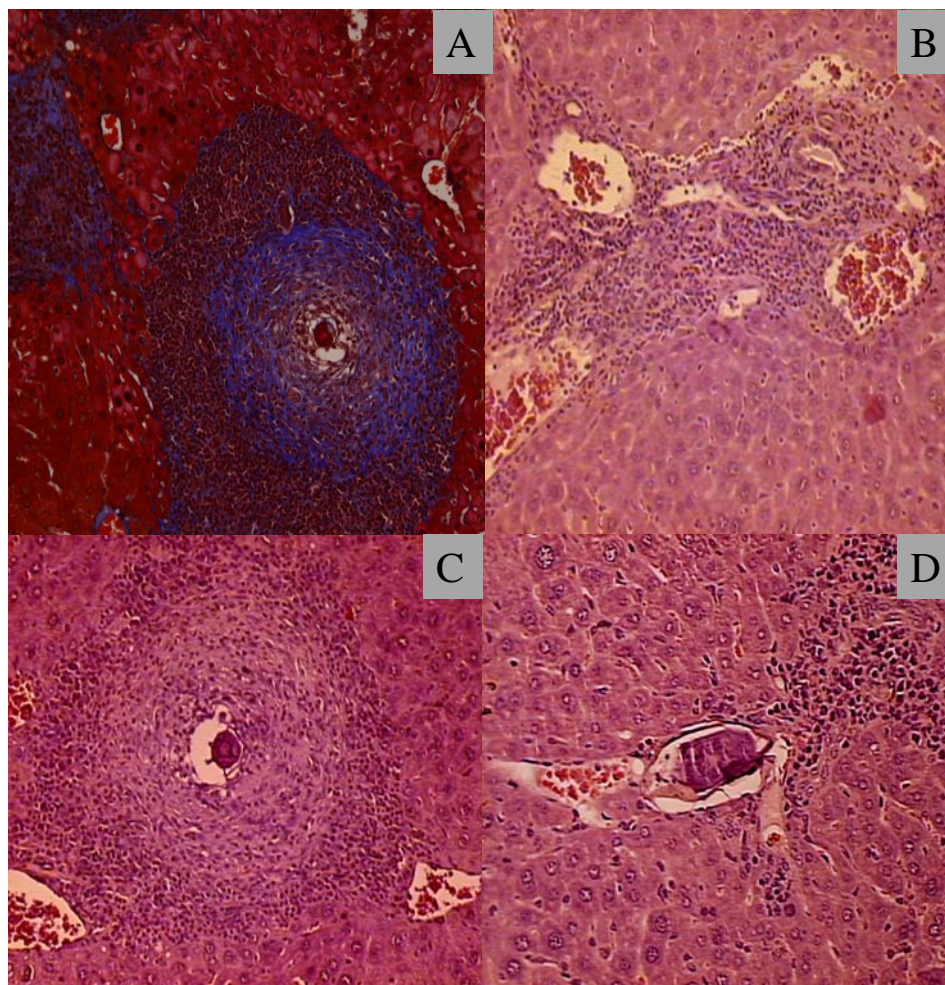
Na figura 33 são apresentados os granulomas em microscopia de luz polarizada para verificação da presença de colágeno. Lesões peri-ovulares na fase pré-granulomatosa, caracterizada por exsudativa (A, C e E) e fase granulomatosa exsudativo-produtiva (B, D e F) nos diferentes grupos (A e B grupo controle, C e D restrição calórica e E e F restrição protéica).

Os granulomas exsudativo-produtivos apresentam uma estrutura neocolagênica bem destacada formando uma malha com concentricidade das fibras (B, D e F).



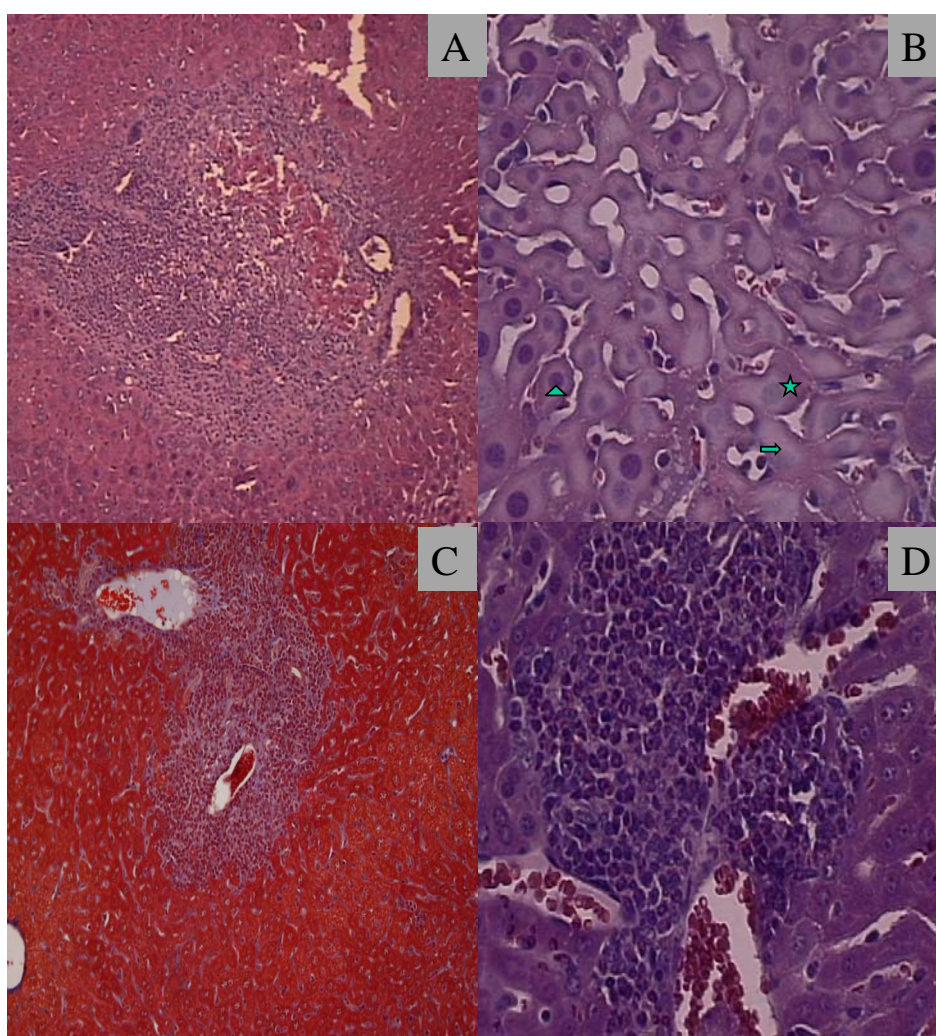
**Figura 33:** Fotomicrografia do fígado de animais programados infectados com *Schistosoma mansoni*, granulomas hepáticos são mostrados corados por Picrosirius e observados em microscópio de luz polarizada. A- granuloma exsudativo com células em torno do ovo no grupo controle (C) (10X), B- granuloma exsudativo-produtivo no grupo C (10X), C- granuloma exsudativo no grupo restrição calórica (RC) (10X), D- granuloma exsudativo-produtivo no grupo RC (10X), E- granuloma exsudativo no grupo restrição protéica (RP) (10X), F- granuloma exsudativo-produtivo no grupo (RP) (10X).

Na figura 34, a análise histopatológica hepática no grupo Controle mostrou presença de um conjunto solto e desordenado de células na região mais externa do granuloma, dano tecidual local e neoformação colagênica (A). Migração leucocitária de poli e mononucleares foram observadas (B). O granuloma esquistossomótico do grupo controle, frequentemente apresentou uma localização nos espaços porta ou em porções perilobulares (C). Foi observada a presença de ovo intravascular (D).



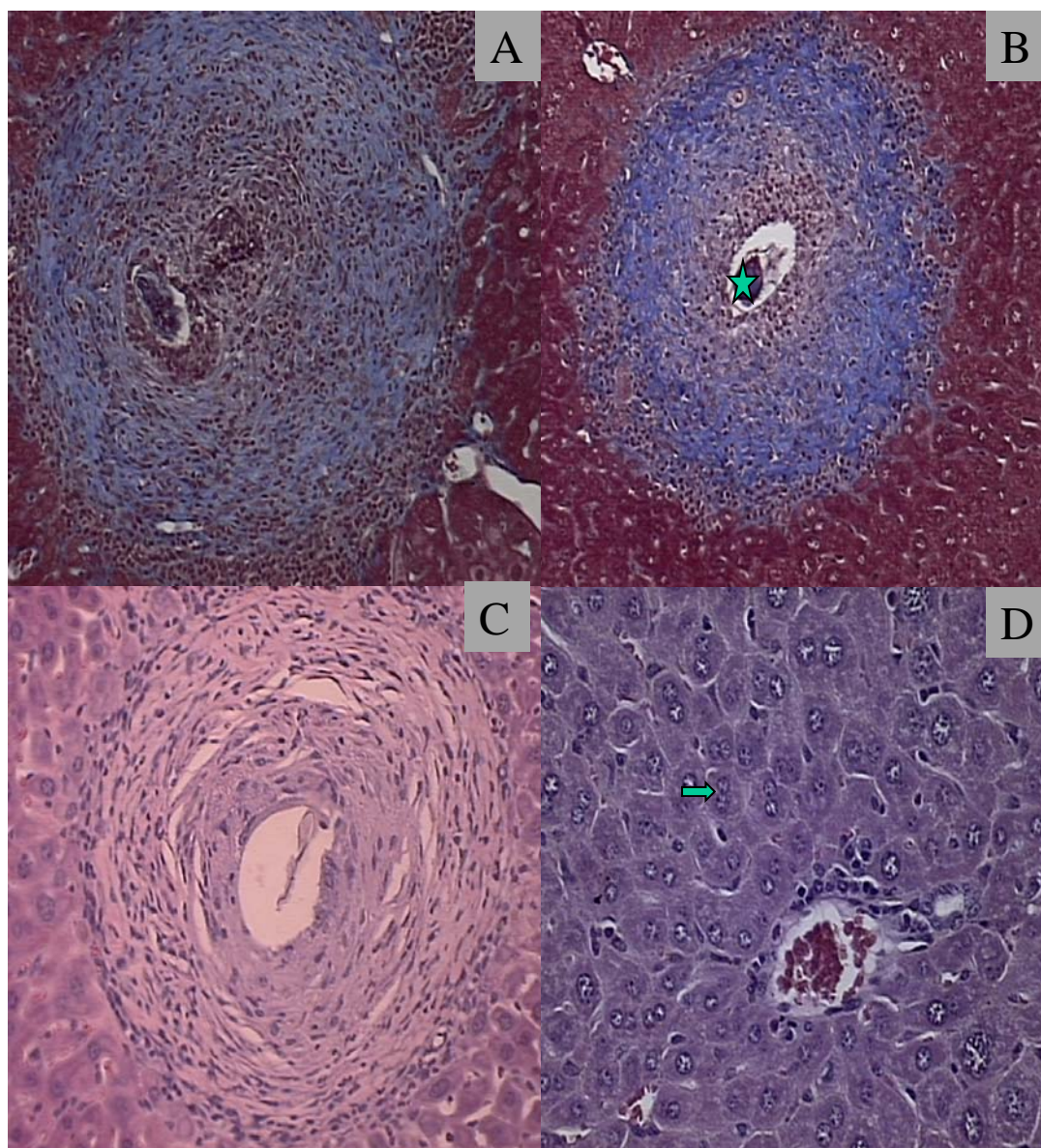
**Figura 34:** Fotomicrografia dos fígados do grupo Controle (C). A- granuloma EEP com conjunto solto e desordenado de células na região mais externa do granuloma, corado com Tricrômico de Masson(10X), B- migração leucocitária de poli e mononucleares, corado com H&E(40X), C- granuloma EXS, localizado no espaço porta, corado com H&E (10X), D- presença de ovo retido no espaço intravascular, corado com H&E (40X).

Na figura 35 é apresentada a análise histopatológica hepática do grupo RP. Mostra que este grupo apresentou várias áreas no estágio pré-granulomatoso de reação inicial (A) e no estágio pré-granulomatoso exsudativo, apresentando diversas áreas com desordem na morfologia do parênquima com focos de tecido necrosado com picnose, cariorrexe e cariólise (B). Pode-se observar intenso infiltrado leucocitário predominantemente de eosinófilos, monócitos e neutrófilos, formando um tecido frouxo de células inflamatórias ao redor do ovo (C). Destacamos um processo inflamatório focal intra e extralobular independentemente de granulomas, que alcançou espaço porta e veias centrais (D).



**Figura 35:** Fotomicrografia dos fígados do grupo de restrição protéica (RP). A- estágio pré-granulomatoso de reação inicial corado com H&E (10X), B- estágio pré-granulomatoso exsudativo, apresentando área de tecido necrosado com picnose ▲, cariorrexe ★ e cariólise → corado com H&E (10X), C- migração leucocitária pela presença do ovo corado com Tricrômico de Masson (10X), D- infiltrado leucocitário independente de granuloma corado com H&E (40X).

Na figura 36, a análise histopatológica hepática no grupo RC mostrou maior presença de neoformação colagênica e menor intensidade na manifestação do infiltrado leucocitário (A), somando-se a isto menor presença de ovos. Os tipos celulares mais representativos foram os macrófagos e suas variações em células epitelióides e células gigantes e os fibroblastos (B). As fibras de colágeno apresentaram forma concêntrica em torno do ovo (C). O grupo RC apresentou vários hepatócitos binucleados (D).



**Figura 36:** Fotomicrografia dos fígados do grupo de restrição calórica (RC). A- neoformação colagênica e menor intensidade na manifestação do infiltrado leucocitário corado com Tricrômico de Masson (10X), B- granuloma exsudativo-produtivo, apresentando célula gigante ★ corado com Tricrômico de Masson (10X), C- fibras de colágeno apresentaram forma concêntrica em torno do ovo corado com H&E (10X), D- hepatócitos binucleados → corado com H&E (40X).

## 6 DISCUSSÃO

A lactação é um período crítico para o desenvolvimento dos mamíferos, sendo importante para o estabelecimento do fenômeno da programação (Moura & Passos, 2005; Moura *et al.*, 2008). Devido a isto, fatores nutricionais, como a desnutrição protéica e calórica quando impostos à mãe nesta fase podem influenciar o crescimento da prole.

### **Considerações sobre os achados dos camundongos programados não infectados**

Corroborando com os dados anteriores do nosso laboratório obtidos em ratos lactentes (Passos *et al.*, 2000; De Moura *et al.*, 2007), os camundongos cujas mães receberam dieta hipoprotéica e hipocalórica na lactação apresentaram menor peso corporal durante a lactação. Este resultado já era esperado, pois nesta fase, a mãe ainda se encontra em restrição nutricional. É sabido que as ratas lactantes RP apresentam hipofagia, causada pela combinação da hiperleptinemia e hipoprolactinemia (Lisboa *et al.*, 2006) e conseqüentemente, transferem um leite deficiente em proteína e em volume (Passos *et al.*, 2000).

Após o desmame, a oferta de uma dieta comercial (23% de proteína) até os 120 dias de idade, programou a prole RP para menor ganho de peso e a prole RC para sobrepeso. No presente estudo, estes resultados podem ser explicados pela hipofagia observada no grupo RP e pela hiperfagia do grupo RC. Já foi observado menor expressão hipofisária de RNAm para GH em ratos adultos programados pela RP, assim como maior expressão de GH em ratos RC adultos (De Moura *et al.*, 2007). Como não medimos o comprimento naso-anal dos nossos camundongos programados, não podemos descartar a possibilidade da alteração de massa corporal total estar também diretamente relacionado ao tamanho do animal, ou seja, o grupo RP cresceu menos e o RC cresceu mais.

Quanto a adiposidade, verificamos que a prole RC adulta exibiu maior gordura central e total. Isto corrobora diversos estudos que mostram que a desnutrição precoce programa um indivíduo para desenvolver um fenótipo poupador (Ozanne & Hales, 1999; Petry *et al.*, 2000; Plagemann, 2006). Interessantemente, detectamos maior

gordura corporal total nos camundongos adultos do grupo RP. Este resultado diverge do encontrado anteriormente em ratos no mesmo modelo de programação (Fagundes *et al.*, 2007; 2009). Como os nossos camundongos RP tem menor peso (falso magro?), é possível que este seja devido a perda de massa muscular. O fato deste animal ser um “falso magro” pode ser decorrente de um hipometabolismo, além de sinalizar para o futuro desenvolvimento de síndrome metabólica. Por outro lado, como não detectamos alteração da gordura visceral e sim aumento da total, é possível crer que os mesmos tenham maior adiposidade subcutânea, que não está relacionada com doenças metabólicas. O conteúdo de proteínas totais não foi afetado pela programação em camundongos, corroborando o estudo anterior do nosso grupo em ratos (Fagundes *et al.*, 2007; 2009).

Não verificamos modificações dos pesos de fígado, baço, rim e intestinos das proles adultas RC e RP não infectadas comparadas aos controles, como seria esperado em uma situação de carência nutricional. Provavelmente, a recuperação dietética pós-desmame foi eficaz para normalizar estes parâmetros.

Quanto ao perfil hormonal, observamos que a programação não foi capaz de alterar significativamente a corticosterona sérica dos camundongos programados pela desnutrição neonatal. Este dado é oposto ao detectado em ratos programados pela RP, que mostraram hipercorticosteronemia na vida adulta (Fagundes *et al.*, 2007; 2009).

A prole RC apresentou aumento dos níveis séricos de leptina, que pode ser resultante da maior adiposidade, uma vez que este hormônio é produzido principalmente pelo tecido adiposo (Ahima *et al.*, 2005). A hiperleptinemia e o aumento do consumo de ração observados nos camundongos RC quando adultos sugerem que estes animais tenham desenvolvido um quadro de resistência central à leptina. De fato, anteriormente demonstramos em ratos programados pela RC materna na lactação, uma resistência ao efeito anorexigênico da leptina (Passos *et al.*, 2004).

Já os camundongos do grupo RP, embora tenham maior adiposidade corporal total, não mostraram alterações significativas da leptinemia. Sabemos que existem diferenças regionais na expressão e secreção de leptina por adipócitos subcutâneos comparados com adipócitos do omento. Foi demonstrado que a leptina é produzida principalmente pelos adipócitos subcutâneos (Dusserre *et al.*, 2000, Schoof *et al.*, 2004, Martinez-Abundis *et al.*, 2007, Carmina *et al.*, 2007) e que os adipócitos viscerais apresentam menos mRNA para leptina (Gottschling-Zeller *et al.*, 1999, Dusserre *et al.*,

2000, Schoof *et al.*, 2004). Como já comentado, a gordura visceral não foi alterada na prole RP, sendo assim possível que os mesmos tenham maior adiposidade subcutânea. Se isto for verdadeiro, então estes adipócitos subcutâneos devem secretar menos leptina. Uma vez que a prole RP apresentou menor ingestão alimentar, é possível que estes camundongos tenham maior sensibilidade à leptina.

A avaliação histopatológica hepática de camundongos não infectados programados revelou que a RP apresentou estruturas com aspectos normais mantendo preservada a arquitetura trabecular. Todavia, a prole RC apresentou esteatose hepática microvesicular. Provavelmente, isto está correlacionado com o aumento da concentração de gordura central.

### **Efeitos da infecção com *s. mansoni* em animais adultos programados pela desnutrição materna na lactação**

Neste projeto estamos avaliando pela primeira vez, os efeitos da infecção por *Schistosoma mansoni* em animais adultos programados pela desnutrição materna durante o período de lactação.

Neste estudo, os camundongos de 60 dias de vida foram inoculados com aproximadamente 50 cercárias e sacrificados com 120 dias de idade. O grupo de Restrição Calórica (RC) infectado mostrou menor peso corporal, menor ingestão, além de menor gordura visceral e total em comparação ao camundongo RC não infectado. Isso sugere que a infecção influencia a regulação da adiposidade corporal no grupo obeso. Já foi mostrado que esquistossomas estão intimamente associados com a modulação do metabolismo lipídico (El Ridi *et al.*, 2004, Tallima & El Ridi 2005; Alencar *et al.*, 2009). A infecção levou a redução apenas na gordura total no camundongo adulto do grupo Restrição Protéica (RP). Provavelmente estes achados estão relacionados ao aumento da lipólise decorrente do processo inflamatório, face a maior necessidade da demanda energética no combate a presença de um agente agressor. Sabe-se que os resultados do impacto do processo infeccioso (parasitário) sobre o estado nutricional do hospedeiro, compreendem efeitos catabólicos generalizados. Síndromes secundárias de má-absorção e alterações hematológicas do tipo das anemias, também podem ocorrer, por mecanismos diversos (Coutinho, 1980).

Contudo, a infecção não alterou o efeito da programação em causar baixo peso no RP e sobrepeso no RC.

Quanto ao peso dos órgãos retirados durante a necropsia, pode-se observar que todos os animais infectados apresentaram aumento de fígado e baço. Isto já foi demonstrado em trabalhos anteriores (Magalhães *et al.*, 1986; Coutinho, 2003, 2004), sendo este aumento significativo dado pela manifestação da resposta inflamatória nos principais focos de permanência do ovo do *S. mansoni* em seus hospedeiros (Mota, 1984; Sleight *et al.*, 1986).

Foi verificado que a infecção causou aumento do peso dos rins na prole RC programada. Estudos realizados com biópsia renal e imunofluorescência em camundongos infectados com *S. mansoni*, evidenciaram presença de glomerulonefrite proliferativa, sugerindo que a lesão renal na esquistossomose é uma doença mediada por imunocomplexos (Hoshino-Shimizu *et al.*, 1976). Assim, o aumento do peso renal observado no camundongo RC infectado pode sugerir lesão renal.

A infecção não modificou o peso dos intestinos dos animais programados. Já foi demonstrado que a liberação de ovos de *S. mansoni* para o lúmen intestinal de camundongos albinos Swiss Webster é dependente de dois mecanismos. Primeiro, as moléculas secretadas pelos ovos (Ashton *et al.*, 2001) induzem a produção de citocinas (Brindley, 2005) e a inflamação granulomatosa local, onde as células inflamatórias periovulares, principalmente eosinófilos, ajudam na passagem do ovo (Lenzi *et al.*, 1987). Em seguida, este processo provoca a corrosão da membrana basal, proporcionando um ambiente facilitado para a passagem dos ovos de *S. mansoni* para luz intestinal, permitindo que eles sejam expulsos passivamente pelo peristaltismo intestinal (Lenzi *et al.*, 1987). Este processo contribui para que o intestino se configure num órgão de passagem da maioria dos ovos, portanto não modificando significativamente o seu peso.

Detectamos que a infecção com *S. mansoni* causou hipercorticosteronemia e hipoleptinemia nos camundongos programados apenas do grupo RC. Estudos sugerem uma relação entre glicocorticóides e leptina, mas a interação entre esses dois hormônios ainda não é bem compreendida, pois os dados frequentemente são divergentes, mostrando relação ora positiva, ora inversa. De fato, em relação a prole RC, nosso trabalho corrobora os achados de relação inversa. Em seres humanos, o cortisol sérico no período pós-cirúrgico aumenta e a leptinemia é reduzida quase à metade (Kain *et al.*, 1999). Em animais, a leptina inibe a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) via inibição do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) (Heiman *et al.*,



1997; Oates *et al.*, 2000). A leptina suprime diretamente a produção e secreção de glicocorticóides no córtex de adrenais de porcos (Malendowicz *et al.*, 2007).

Anteriormente, foi demonstrado aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona em ratos infectados com *Trypanosoma cruzi* (Caldeira & Franci, 2000). Quanto ao *S. mansoni*, sabe-se que o cortisol afeta o seu crescimento, desde o estágio de larva até o estágio de verme adulto, aparentemente com o rompimento das vias metabólicas essenciais para o parasito (Morales-Montor *et al.*, 2001).

O fato da infecção ter reduzido o acúmulo de adiposidade do grupo RC pode ser o responsável pela redução das concentrações séricas de leptina. Estudos em camundongos ob/ob sugerem que a deficiência de leptina reduz o desenvolvimento de fibrose hepática após 12 semanas de infecção com *S. mansoni* (Potter & Mezey, 2002). Assim, é possível que os nossos camundongos infectados do grupo RC, por serem hipoleptinêmicos, apresentem um retardo no desenvolvimento da fibrose hepática, apesar da nossa avaliação ter sido realizada com apenas 9 semanas de infecção (fase aguda). Entretanto para confirmar este idéia, outros estudos envolvendo uma fase mais avançada da infecção serão necessários.

Nas avaliações parasitológicas observamos que nas proles adultas programadas pela desnutrição pós-natal, o período pré-patente foi mais longo, de 45 dias. Este resultado corrobora estudos realizados com camundongos desnutridos, que mostraram um período pré-patente de 43 dias (Simões *et al.*, 2002). Aos 55 dias de infecção com *S. mansoni*, o grupo RP apresentou maior número de ovos nas fezes. Estudos sugerem que a deficiência de proteína na lactação leva a deficiência nas barreiras mecânicas teciduais e na concentração de colágeno, facilitando a reação inflamatória provocada pelo *S. mansoni* na mucosa intestinal no animal desnutrido, necessária para a eliminação dos ovos pelas fezes (Costa & Katz, 1982; Costa *et al.*, 1984; Machado-Silva *et al.*, 1994; Lenzi *et al.*, 1987). Portanto, é possível que o camundongo programado pela RP, embora seja eutrófico, também apresente estas características, favorecendo a maior eliminação de ovos nas fezes como uma estratégia adaptativa de propagação. Estudos histopatológicos do intestino destes animais serão posteriormente analisados.

Observamos em todas as proles maior quantidade de ovos imaturos na porção distal do intestino delgado, em acordo com outros trabalhos (Costa & Katz 1982; Machado-Silva *et al.*, 1991; Martinez *et al.*, 2003). A prole adulta do grupo RP apresentou maior número de ovos totais nas porções intestinais e fezes, assim como

aumento de ovos em todos os estágios evolutivos. Estes resultados estão de acordo com trabalhos já realizados em animais desnutridos protéico-calórica (Simões *et al.*, 2002).

Em relação à infectividade, todos os vermes adultos recuperados nos camundongos C, RC e RP estavam localizados na veia porta hepática e mesentéricas. Este resultado apresentou similaridade com outros estudos em animais desnutridos (Akpom, 1982; Rocha, 1982; Ferreira & Coutinho 1999).

Nas análises morfológicas dos vermes adultos recuperados, observamos que os vermes machos e fêmeas obtidos das proles RC e RP apresentaram alterações no sistema reprodutor e na estrutura do tegumento. De fato diversos trabalhos já descreveram que o microambiente do hospedeiro provoca alterações estruturais no *Schistosoma* (Ferreira & Coutinho, 1999; Neves *et al.*, 2001, 2003, 2004; Hulstijn *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003). Portanto, sugerimos que as alterações de sistema reprodutor e estrutura do tegumento dos vermes coletados em ambas as proles programadas podem influenciar na eliminação e viabilidade dos ovos, assim como na evolução da infecção. Provavelmente, as alterações no tegumento influenciaram o deslocamento do parasito pelos vasos sanguíneos, dificultando a chegada nas veias mesentéricas para eliminação dos ovos pelas fezes e, as alterações no sistema reprodutor, influenciaram na formação de ovos viáveis.

Trabalhos realizados por Lenzi e colaboradores (2006), descrevem o granuloma esquistossomótico como uma complexa estrutura espacial, formado por diferentes componentes (células e moléculas sinalizadoras) que interagem de forma complexa. Sendo o comportamento global entendido como a soma integral de diversos componentes de eventos dinâmicos e cooperativos (Lenzi *et al.*, 1998, Lenzi & Romanha, 2003). Na avaliação quantitativa dos granulomas hepáticos nos grupos programados, observamos que a prole RP apresentou aumento no número total dos granulomas. Na análise qualitativa destes granulomas hepáticos, verificamos que a prole RP apresentou aumento dos granulomas no estágio pré-granulomatoso, classificado por exsudativo, enquanto a prole RC apresentou aumento de granulomas do tipo exsudativo-productivo. Anteriormente, foi mostrado que camundongos desnutridos e infectados com *S. mansoni*, foram incapazes de produzir fibrose periportal nos granulomas hepáticos. Ainda, foi sugerido que o estado nutricional do hospedeiro contribui para a remodelação de granulomas periovulares da esquistossomose hepática (Coutinho *et al.*, 2004).

O grupo RP infectado, que mostrou menor ingestão e massa corporal, apresentou maior grau de lesão hepática provocada pelo número aumentado de áreas alteradas pelo estágio pré-granulomatoso classificado por exsudativo, redução na capacidade de produção de colágeno e maior manifestação inflamatória, caracterizando uma deficiência na modulação do processo inflamatório.

Já o grupo RC infectado, que apresentou maior ingestão, maior adiposidade, maior corticosterona e menor leptina, exibiu menor número de granulomas hepáticos, maior produção de colágeno e vários hepatócitos binucleados, portanto, apresentando melhores condições para modular a resposta inflamatória e melhor capacidade de regeneração hepática diante da presença de lesão, apresentando uma relação parasito-hospedeiro mais equilibrada.

Resumindo, podemos sugerir que a desnutrição neonatal programou o estado endócrino-metabólico do hospedeiro repercutindo na evolução da esquistossomose, onde o grupo de restrição calórica apresentou maior habilidade na modulação da resposta inflamatória e o grupo de restrição protéica exibiu fragilidades nesta complexa e fascinante, relação parasito-hospedeiro.

## 7 CONCLUSÕES

- A infecção com *S. mansoni* não alterou o efeito da programação sobre a massa corporal e a ingestão alimentar das proles;
- A esquistossomose modificou o perfil hormonal somente na prole RC;
- O ambiente interno do hospedeiro adulto programado pela desnutrição materna na lactação influenciou o desenvolvimento do *S. mansoni*;
- Os camundongos programados do grupo RC apresentaram melhores estratégias de adaptação às manifestações do processo inflamatório;
- O processo inflamatório nos camundongos programados do grupo RP apresentou reações variadas, gerando maiores necessidades de estratégias adaptativas, que não foram alcançadas nesta prole, provocando maior grau de lesão.

## REFERÊNCIAS

- Abath FGC, Werkhauser RP. 1996. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunol*, 18: 15-20.
- Adams DO. 1976. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol*, 84: 164-191.
- Ahima RS. 2005. Central actions of adipocytes hormones. *Trends Endocrinol.Metab*,16: 307-313.
- Alencar ACMB, Neves RH, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Gomes DC, Machado-Silva JR . 2009. High fat diet has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104:608-613.
- Almeida SS. 1987. Efeitos estruturais, bioquímicos e comportamentais da desnutrição protéica: reatividade de ratos desnutridos ao clordiazepóxido. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- Anguita RM, Sigulem DM, Sawaya AL. 1993. Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. *J Nutr*, 123: 1421-1428.
- Akpom CA. 1982. Schistosomiasis: nutritional implications. *Rev Infect Dis*, 4: 776-782.
- Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA. 2001. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology*, 122: 329-338.
- Barbosa FS & Coelho MV. 1956. Alguns aspectos epidemiológicos relacionados com a transmissão da esquistossomose em Perambuco, Brasil. *Publ. Av. do Serv. Nac. de Malária*, Vol. V.
- Barbosa CS, Domingues AL, Abath F, Montenegro SM, Guida U, Carneiro J, Tabosa B, Moraes CN, Spinelli V. 2001. An outbreak of acute schistosomiasis at Porto de Galinhas beach, Pernambuco, Brazil. *Cad Saude Publica*, 17: 725-728.
- Barbosa CS, Pieri OS, da Silva CB, Barbosa FS. 2000. Ecoepidemiology of urban schistosomiasis in Itamaraca Island, Pernambuco, Brazil. *Rev Saude Publica*, 34: 337-341.
- Barker DJ. 2003. The developmental origins of adult disease. *Eur J Epidemiol*, 18 (8): 733-736.
- Barker DJ. 1995. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest*, 25: 457-463.
- Bayne K. 1996. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *Am Phys Soc Physio*, 39: 208-211.
- Barker DJP & Clark PM. 1997. Fetal undernutrition and disease n later life. *Rev Reprod* , 2(2):105-112.
- Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. 1993. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ*, 307:1524–1527.

Barros LA; Costa-Silva M; Biolchini CL; Neves RH; Machado-Silva JR. 2009. Effect of praziquantel administration on hepatic stereology of mice infected with *Schistosoma mansoni* and fed a low-protein diet. *Brazilian journal of medical and biological research*, 42(9):812-5.

Basch PF. 1990. Why do schistosomes have separated sexes? *Parasitology Today*, 6: 160-163.

Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. 2004. Post-natal diet determines insulin resistance in fetally malnourished, low birth weight rats (F1) but diet does not modify the insulin resistance of their offspring (F2). *Life Science*, 30(74): 3033-3041.

Bertin E, Gangnerau MN, Bailbe D, Portha B. 1999. Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. *Am J Physiol*, 277: E11-17.

Bica I, Hamer DH, Stadecker MJ. 2000. Hepatic schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 14: 583-604.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MCF, Alves SB, Reis AM, Moura EG. 2008. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. *J Endocrinol*, 198: 331-337.

Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. 2007. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol*, 192(2):339-344.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MCF, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. 2005. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Met Res*, 37:1-6.

Boros DL. 1989. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 250-269.

Braschi S, Curwen RS, Ashton PD, Verjovski-Almeida S, Wilson A. 2006. The tegument surface membranes of the human blood parasite *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis after differential extraction. *Proteomics*, 5: 1471-1482.

Breant B, Gesina E, Blondeau B. 2006. Nutrition, glucocorticoids and pancreas development. *Horm Res*, 65(3): 98-104.

Brener Z. 1965. Observações sobre a infecção do camundongo pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Malariol e Doenças Tropicais*, 8: 565-575.

Brindley PJ. 2005. The molecular biology of schistosomes. *Trends Parasitol*, 21: 533-536.

Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, Going TC, Bailey RA. 1997. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest*, 100(7):1768-1774.

Caldeira Filho JS, Moura AS. 2000. Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 108: 213-226.

Caldeira JC, Franci CR. 2000. Prolactin and Corticosterone secretion in response to acute stress after paraventricular nucleus lesion by ibotenic acid. *Brain Research Bulletin*, 52:483-489.

Cambraia RPB, Vannucchi H, De Oliveira LM. 1997. Foods intake and weight of lactating rats maintained on different protein-calorie diets, and pup growth. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 30: 985-988.

Carmina E, Chu MC, Moran C, Tortoriello D, Vardhana P, Tena G, Preciado R, Lobo R. 2007. Subcutaneous and omental fat expression of adiponectin and leptin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 89(3):642-8.

Carson FI, Martin JH, Lynn JA. 1973. Formalin fixation for electron microscopy. Are evaluation. *Am J Clin Pathol*, 59: 365-373.

Cheever AW. 1968. Conditions affecting accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull WHO*, 39: 328-331.

Cheever AW, Lenzi JA, Lenzi HL, Andrade ZA. 2002. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 917-940.

Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop*, 77: 41-51.

Coelho PM, Raso P, de Mello RT, Toppa NH. 1989. Size of hepatic granuloma produced by eggs of 2 geographic strains of *Schistosoma mansoni*, in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84: 213-217.

Colley DG. 1987. Dynamics of immune to Schistosomes Balieri's. *Clin Trop Med Commun Dis*, 2: 315-332.

Costa MFFL, Katz N. 1982. Comparative studies of *Schistosoma mansoni* strains isolated from pacientes with toxemic or intestinal forms of Schistossomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31: 499-504.

Costa MFFL, Rocha RS, Katz N. 1984. Comparative study of *Schistosoma mansoni* isolated from patients with hepatosplenic and intestinal clinical forms of schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33: 918-923.

Costa-Silva M, Rodrigues-Silva R, Hulstijn M, Neves RH, de Souza Panasco M, Lenzi HL, Machado-Silva JR 2002. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97 Suppl 1: 129-142.

Coura JR, Amaral RS. 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 13-19.

Coutinho EM. 2004. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 85-92.

Coutinho EM, Barros AF, Barbosa JRA, Oliveira SA, Silva LM, Araújo RE, Andrade ZA. 2003. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 919-925.

Coutinho EM, Ferreira HS, Freitas LPCG, Silva MR, Cavalcanti CL, Samico MJA. 1992. Nutrition and acute schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87: 297-301.

Coutinho EM, Abath FGC, Freitas LPCG, Salzano AC, Lapa MA, Campos FS, Melo EB. 1991. Liver and serum soluble protein changes and pathomorphology in undernourished mice with acute schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*, 24: 235-243.

Coutinho EM. 1980. Estado nutricional e esquistossomose. *Rev Soc Bras Med Trop*, 8:91-96.

Cravo CO, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, Moura EG, Ramos C. 2002. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm Metab Res*, 34: 400-405.

Crompton DW & Nesheim MC. 2002. Nutricional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Ann Rev Nutr*, 22: 35-59.

Cunha AS, Pedrosa RC. 1986. Double-blind therapeutical evaluation based on the quantitative oogram technique, comparing praziquantel and oxaminiquine in human schistosomiasis mansoni. *Revr Inst Med Trop São Paulo*, 28: 337-351.

Cunha AS, Oliveira CA, Paulini E, Barbosa FS, Leite Sobrinho GB, Chaia G, Neves J, Alves JBR, Cañado JR, Barros J, Ratton JLA, Santiago JM, Pellegrino J, Bogliolo L, Coelho MV, Katz N, Almeida JRN, Raso P, Dani R, Paraense WL, Andrade ZA. 1970. *Esquistossomose Mansonii*. São Paulo, Universidade de São Paulo e Associação Médica de Minas Gerais, 436p.

D'Andrea PS, Maroja LS, Gentile R, Cerqueira R, Maldonado Junior A, Rey L. 2000. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology*, 120(6): 573-582.

De Moura EG, Lisboa PC, Passos MCF. 2008. Neonatal programming of neuroimmunomodulation - role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*, 15: 176-188.

De Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT; Souza KP, Passos MCF. 2007. Malnutrition During Lactation Changes Growth Hormone mRNA Expression Inthe Offspring At Weaning And At Adulthood. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18:134-139.

Desai M, Crowther N, Ozanne SE, Lucas A, Hales CN. 1995. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans*, 23: 331-335.

Doenhoff MJ, Stanley RG, Griffiths K, Jackson CL. 2002. An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology*, 125: 415-421.

Dorner G, Plagemann A. 1994. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res*, 26: 216-221.



Dunne DW & Cooke A. 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*, 5: 420-426.

Dusserre E, Moulin P, Vidal H. 2000. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1500(1):88-96.

Dutra SCP, Passos MCF, Lisboa PC, Santos R, Cabanelas AP, Pazos-Moura CC, Moura EG. 2003. Liver deiodinase activity is increased in adult rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *Horm Metab Res*, 35: 268-270.

El-Marzouki ZM, Amin AM. 1997. Changes in serum lipids of mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *J Egypt Soc Parasitol*, 27: 419-429.

El Ridi R, Tallima H, Mohamed SH, Montash M. 2004. Depletion of *Schistosoma mansoni* lung-stage schistosomula cholesterol by methyl-beta-cyclodextrin dramatically increases specific antibody binding to surface membrane antigens. *J Parasitol*, 90: 727-732.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop*, 82: 139-146.

Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC, Morales-Montor J. 2005. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends in Parasitology*, 21: 588-593.

Fagundes ATS, Moura EG, Passos MCF, Santos-Silva AP, Oliveira E, Trevenzoli IH, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF, Lisboa PC. 2009. Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Hormone Metabolic Research*. [Epub ahead of print].

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trevenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. 2007. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr*, 98(5): 922-928.

Fernandez-Twinn DS, Ekizoglou S, Wayman A, Petry CJ, Ozanne SE. 2006. Maternal low-protein diet programs cardiac beta-adrenergic response and signaling in 3-mo-old male offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291(2): R429-436.

Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B & Hales CN. 2003. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *British Journal of Nutrition*, 90 815-822.

Ferrari MLA, Coelho PMZ, Antunes CMF, Tavares CPA, Cunha AS. 2003. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bull WHO*, 81: 190-196.

Ferreira HS, Florencio TM, Fragoso MAC, Melo FP, Silva TG. 2005. Hipertensão, obesidade abdominal e baixa estatura: aspectos da transição nutricional em uma população favelada. *Rev Nutr*, 18(2): 209-218.

Ferreira HS, Coutinho EM. 1999. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomal control? *Ann Trop Med Parasitol*, 93: 437-447.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Silva JO, Claudio-Neto S, Pereira-Toste F, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. 2009a. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioural traits of adult male rats. *Behavioural Brain Research*, 5;206(1):147-50.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Claudio-Neto S, Trevenzoli IH, Toste FP, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. 2009b. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Hormones and Behavior*, 55: 272-279.

Gravena C, Andreazzi AE, Mecabo FT, Grassioli S, Scantamburlo VM, Mathias PC. 2007. Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats. *Nutr Neurosci*, 10(1-2):79-87.

Godfrey KM, Barker DJ. 2000. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*, 71(5): 1344-1352.

Godfrey KM, Robinson S. 1998. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proc Nutr Soc*, 57: 105-111.

Gottschling-Zeller H, Birgel M, Scriba D, Blum WF, Hauner H. 1999. Depot-specific release of leptin from subcutaneous and omental adipocytes in suspension culture: effect of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1. *Eur J Endocrinol*, 141(4):436-42.

Graeff-Teixeira C, Valar C, Moraes CK, Salvany AM, Brum CO, Maurer RL, Ben R, Mardini LB, Jobim MB, Amaral RS. 2004. The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state, 1997 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 73-78.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. 1991. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, 303:1019-1022.

Halton DW. 1997. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes. *International Journal for Parasitology*, 27: 693-704.

Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology*, 138(9): 3859-63.

Hoffman DJ, Roberts SB, Verreschi I, Martins PA, De Nascimento C, Tucker KL, Sawaya AL. 2000a. Regulation of energy intake may be impaired in nutritionally stunted children from the shantytowns of Sao Paulo, *Brazil J Nutr*, 130: 2265-2270.

Hoffman DJ, Sawaya AL, Verreschi I, Tucker KL, Roberts SB. 2000b. Why are nutritionally stunted children at increased risk of obesity? Studies of metabolic rate and fat oxidation in shantytown children from Sao Paulo, Brazil. *Am J Clin Nutr*, 72: 702-707.

Holemans K, Verhaeghe J, Dequeker J, Van Assche FA. 1996. Insulin sensitivity in adult female rats subjected to malnutrition during the perinatal period. *J Soc Gynecol Invest*, 3: 71-77.

Hoppe CC, Evans RG, Moritz KM, Cullen-McEwen LA, Fitzgerald SM, Doweling J, Bertram JF. 2007. Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: 462-469.

- Hoshino-Shimizu S, Brito T, Kanamura HY, Canto AL, Silva AO, Campos R, Pennado O, Silva LC. 1976. Human Schistosomiasis; *Schistosoma Mansoni* Antigen Detection In Renal Glomeruli. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 70: 492-496.
- Hulstijn M, Barros LA, Neves RH, Moura EG, Machado-Silva JR. 2003. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. *Parasitology*, 126: 53-61.
- Hulstijn M, Oliveira RM, Moura EG, Machado-Silva JR. 2001. Lower fecal egg excretion in chemically-induced diabetic mice infected with *Schistosoma mansoni* due to impaired egg maturation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 393-6.
- Ingelfinger JR, Woods LL. 2002. Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens*, 15: 46-49.
- Jacobs W, Bogers J, Deelder A, Wery M, Van Marck. 1999. Adult *Schistosoma mansoni* Worms Posively Modulate Soluble Egg Antigen-Induced Hepatic Granuloma Formation In Vivo: Stereological Analysis And Immunophenotyping Of Extra-Cellular Matrix Proteins, Adhesion Molecules And Chemokines. *Am J Pathol*, 150: 2033-2045.
- Jones AP, Simson EL, Friedman MI. 1984. Gestational undernutrition and the development of obesity in rats. *J Nutr*, 114: 1484-1492.
- Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, Mattos AC, Pascarellin BM, de Manso PP, Ribeiro-Alves M, Pelajo-Machado M, Peralta JM, Coelho PM and Lenzi HL. 2009. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. *Dev Genes Evol*, 219: 219-234.
- Kain ZN, Zimolo Z, Heninger G. 1999. Leptin and the perioperative neuroendocrinological stress response. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(7): 2438-42.
- Kastner MRQ, Kohn A, Teixeira ED, Pitanga LC. 1975. Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 encontrado na espécie humana. *Rev Soc Bras Med Trop*, 9: 247-261.
- Katz N, Peixoto SV. 2000. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 33: 303-308.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 14: 397-400.
- Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. 2000. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278: E941-E948.
- La Flamme AC, Harvie M, Kenwright D, Cameron K, Rawlence N, Low YS, McKenzie S. 2007. Chronic exposure to *schistosome* eggs reduces serum cholesterol but has no effect on atherosclerotic lesion development. *Parasite Immunol*, 29: 259-266.
- Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. 1996. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil*, 106: 307-312.

Lenzi HL, Romanha WS, Santos RM, Zorzenon, Rosas A, Mota EM, Manso PPA, Caputo LFG, Pelajo-Machado M. 2006. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(1): 219-31.

Lenzi HL, Romanha WS. 2003. Schistosomal granuloma is like a mall multicellular organism that operates as a complex system. In R Mondaini. *Proceedings of the Second Brazilian Symposium on Mathematical and Computational Biology*. Rio de Janeiro, 257-282.

Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Vale BS, Panasco MS, Lenzi JA. 1999. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Braz J Med Biol Res*, 32: 639-643.

Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, Mariano M, Lenzi JA. 1998. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(1): 141-151.

Lenzi HL, Lenzi JA, Kerr IB, Antunes SL, Mota EM, Oliveira DN. 1991. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86(3): 77-90.

Lenzi HL, Lenzi JA, Sobral AC. 1987. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res*, 20: 433-435.

Lima SF, Souza CTM, Vieira LQ, Coelho PMZ. 1998. Protein deficiency impairs the schistosomicidal action of Praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(1): 271-272.

Lins MC, Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MCF. 2005. Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept*, 127: 197-202.

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.

Lisboa PC, Fagundes AT, Denolato AT, Oliveira E, Bonomo IT, Alves SB, Curty FH, Passos MC, Moura EG. 2008. Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. *Exp Biol Med*, 233(1): 57-63.

Loverde PT, Chen L. 1991. Schistosome female reproductive development. *ParasitologyToday*, 7: 303-308.

Lucas A, Eds Zieger EE, Moro GE. 1999. Early nutrition and later outcome. Nutrition of the very low birthweight infant. In *Nestlé Nutrition Workshop Series*, 43:1-13.

Lutz A. 1919. *O Schistosoma mansoni e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 11: 121-155.

- Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC. 1998. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(1): 303-307.
- Machado-Silva JR, Galvão C, Presgrave OAF, Rey L, Gomes DC. 1994. Host-induced morphological changes of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 male worms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89: 411-414.
- Machado-Silva JR, Oliveira RMF, Rodrigues-Silva R, Maldonado JR A, Rey L. 1991. Roedores silvestres como modelos experimentais da esquistossomose mansônica: *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). *Rev. Inst. Med. Trop*, 33: 257-261.
- Magalhães, LA. 2001 *Schistosoma mansoni*: desenvolvimento do parasito no mamífero e no molusco. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 411-414.
- Magalhães LA, Guaraldo AMA, Magalhães EMZ, Carvalho JF, Sgarbieri VC, Alcântara FG. 1986. Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. *Rev Saúde Públ*, 20: 362-368.
- Malendowicz LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG. 2007. Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol*, 263:63-102.
- Malta J, Oliveira O, Távora MEG, Jucá M, Ribeiro L, Malta LBL, Malta LBL, Malta FBL. 2005. Esquistossomose mansônica. In: Hinrichsen SL. Doenças infecciosas e parasitárias. *Medsa*, 323-342.
- Marcelino AA, Moura AS, Barradas PC, Tenorio F. 2004. Hypothalamic nuclei nitric oxide synthase expression in rats malnourished during early lactation period. *Nutr Neurosci*, 7(3):177-184.
- Martinez-Abundis E, Molina-Villa CA, Gonzalez-Ortiz M, Robles-Cervantes JA, Saucedo-Ortiz JA. 2007. Effect of surgically removing subcutaneous fat by abdominoplasty on leptin concentrations and insulin sensitivity. *Ann Plast Surg*, 58(4):416-9.
- Martinez EM, Neves RH, Oliveira RMF, Machado-Silva JR, Rey L. 2003. Parasitological and morphological characteristics of Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* in *Mus musculus*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 557-564.
- Molendi-Coste O, Grumolato L, Laborie C, Lesage J, Maubert E, Ghzili H, Vaudry H, Anouar Y, Breton C, Vieau D. 2006. Maternal Perinatal Undernutrition Alters Neuronal and Neuroendocrine Differentiation in the Rat Adrenal Medulla at Weaning. *Endocrinology*, 147(6): 3050–3059.
- Morales-Montor, J., Mohamed, F., Ghaleb. 2001. *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol*, 87:1132-1139.
- Morand S & Muller-Graf CD. 2000. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology*, 120: 45-56.

Morgan JA, Dejong RJ, Adeoye GO, Ansa ED, Barbosa CS, Bremond P, Cesari IM, Charbonnel N, Correa LR, Coulibaly G, D'Andrea PS, De Souza CP, Doenhoff MJ, File S, Idris MA, Incani RN, Jarne P, Karanja DM, Kazibwe F, Kpikpi J, Lwambo NJ, Mabaye A, Magalhaes LA, Makundi A, Mone H, Mouahid G, Muchemi GM, Mungai BN, Sene M, Southgate V, Tchuente LA, Theron A, Yousif F, Zanotti-Magalhaes EM, Mkoji GM, Loker ES. 2005. Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecol*, 14: 3889-3902.

Mota E, Sleigh AC. 1984. Water-contact patterns and *Schistosoma mansoni* infection in a rural community in northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop*, 29: 230-235.

Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MCF, Lisboa PC. 2009. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *Journal of Physiology*, 587: 4919-4929.

Moura EG, Santos RS, 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, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, Souza KP, Passos MCF. 2007. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and adulthood. *J Nutr Biochem*, 18: 134-139.

Moura EG, Passos MCF. 2005. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep*, 25 (3/4): 251-269.

Moura AS, Franco de Sá CCN, Cruz HG, Costa CL. 2002. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res*, 35: 617-622.

Moura AS, Caldeira Filho JS, Mathias PC, Franco de Sá CCN. 1997. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 96: 180-192.

Muller E, Rosa Brunet L, Fried B, Sherma J. 2001. Effects on the neutral lipid contents of the liver, ileum and serum during experimental schistosomiasis. *Int J Parasitol*, 31: 285-287.

Muniz PT, Ferreira UM, Ferreira CS, Conde WL, Monteiro CA. 2002. Intestinal parasitic infections in young children in São Paulo, Brazil: prevalences, temporal trends and associations with physical growth. *Ann Trop Med Parasitol*, 96: 503-512.

Neves RH, Alencar ACMB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. 2007a. Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. *J Helminthol*, 81: 361-368.

Neves RH, Alencar ACMB, Costa-Silva M, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. 2007b. Long-term feeding a high-fat diet causes histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. *Exp Parasitol*, 115: 324-332.

Neves RH, De Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, Hulstijn M, Gomes DC. 2005. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitology Research*, 95: 43-49.

Neves RH, Costa-Silva M, Martinez EM, Branquinho TB, Oliveira RGF, Lenzi HL, Gomes DC, Machado-Silva JR. 2004. Phenotypic Plasticity in Adult Worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) Evidenced by Brightfield and Confocal Laser Scanning Microscopies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(2): 131-136.

Neves RH, Silva MC, Martinez EM, Biolchini CL, Lenzi HL, Gomes DC, Machado-Silva JR. 2003. Reproductive system abnormalities in *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from *Nectomys squamipes* (Muridae:Sigmondontinae): brightfield and confocal laser scanning microscopy analysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3): 361-365.

Neves RH, Oliveira AS, Machado-Silva JR, Coutinho EM, Lenzi HL, Gomes DC. 2002. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35: 405-407.

Neves RH, Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Oliveira SA, Coutinho EM, Lenzi HL, Gomes DC. 2001. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 1013-1016.

Neves RH, Pereira MJ, de Oliveira RMF, Gomes DC, Machado-Silva JR. 1998. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodent and human isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(1): 309-12.

Nwagwu, MO & Cook A. 2000. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nut*, 83(1): 79-85.

Oates M, Woodside B, Walker CD. 2000. Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. *Horm Behav*, 37(4): 366-76.

Oliveira G, Rodrigues NB, Romanha AJ & Bahia D. 2004. Genome and genomics of schistosomes, *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 82: 375-390.

Oliveira EJ, Kanamura HY, Dias LCS. 2003. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. *Cadernos de Saúde Pública*, 19(1): 255 - 261.

Oliveira AS, Barbosa AA, Gomes DC, Machado-Silva JR, Barros AF, Neves RH & Coutinho EM. 2003. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 623-627.

Ozanne SE & Hales N. 2002. Early programming of glucose-insulin metabolism. *Endocrinol Metab*, 13: 368-373.

Passos MCF, Toste FP, Dutra SCP, Trotta PA, Pereira-Toste F, Lisboa PC, Moura EG. 2009. Role of neonatal hyperleptinemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. *British Journal of Nutrition*, 101: 250-256.

- Passos MC, Lins MC, Lisboa PC, Toste FP, Bonomo IT, de Moura EG. 2007. Maternal leptin treatment during lactation programs the thyroid function of adult rats. *Life Sci*, 19: 1754-8.
- Passos MCF, Vicente LL, Lisboa PC, Moura EG. 2004. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult animals whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res*, 36: 625-629.
- Passos MC, Ramos CF, Dutra SC, Mouco T, Moura EG. 2002. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Hormones Met Res*, 34: 40-43.
- 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.
- Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. 2000. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body Weight of offspring. *Nutrition Research*, 20: 1603-1612.
- Pearce EJ & Simpson AJG. 1992. Schistosomiasis Immune Response: Just A Little Is Enough. *Embo Journal*, 10: 2741-2746.
- Pereira-Toste F, Toste FP, Oliveira E, Trotta, PA, Lisboa PC, Moura EG, Passos MCF. 2009. Early maternal hyperleptinaemia programs adipogenic phenotype in rats. *Hormone Metabolic Research*, Aug 14. [Epub ahead of print].
- Petry CJ, Dorling MW, Wang CL, Pawlak DB, Ozanne SE. 2000. Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabet Med*, 17(12): 848-853.
- Phillips DIW. 2002. Endocrine programming and fetal origins of adult disease. *Trends Endocrinol Metabol*, 13: 363-364.
- Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2008. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)*, 114(5): 381-392.
- Pires KM, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2006. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Science*, 79(22): 2128-2134.
- Plagemann A. 2006. Perinatal Nutrition and Hormone-Dependent Programming of Food Intake. *Horm Res*, 65 (3):83-89.
- Popiel I, Cioli D, Erasmus DA. 1984. The morphology and reproductive status of female *Schistosoma mansoni* following separation from male worms. *International Journal of Parasitology*, 14: 183-190.
- Potter JJ, Mezey E. 2002. Leptin deficiency reduces but does not eliminate the development of hepatic fibrosis in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Liver*, 22:173-177.
- Pracyck JB, Seidler FJ, Mccook EC, Slotkin TA. 1992. Pituitary-thyroid axis reactivity to hyper and hypothyroidism in the perinatal period: ontogeny of regulation and long term programming of responses. *J Develop Physiol*, 18: 105-109.
- Ramos TM, Vasconcelos AS, de Carvalho VC, Lima VL. 2004. Alterations in cholesterol, triglyceride and total phospholipid levels in plasma of *Callithrix jacchus* (sagui) reinfected by *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37: 37-40.



- Ravelli GP, Stein Z, Susser M. 1976. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*, 295: 349-53.
- Remoue F, Mani JC, Pugniere M, Schacht AM, Capron A, Riveau G. 2002. Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28- kilodalton glutathione S-transferase, *Infection and Immunity*, 70: 601-605.
- Rey L. 2001. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rocha H. 1982. Schistosomiasis and malnutrition. *Rev Infect Dis*, 4: 783-784.
- Rodrigues AL, Moura EG, Passos MCF, Dutra SCP, Lisboa PC. 2009. Postnatal early overnutrition changes the leptin signaling pathway in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *Journal of Physiology*, 587: 2647-2661.
- Sambon LW. 1907. Descriptions of some new species of animal parasites. *Proc zool Soc London*, 282-283.
- Sampaio de Freitas M, Garcia De Souza EP, Vargas da Silva S, da Rocha Kaezer A, da Silva Vieira R, Sanchez Moura A, Barja-Fidalgo C. 2003. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. *Biochim Biophys Acta*, 1639(1): 8-16.
- Sardinha FL, Telles MM, Albuquerque KT, Oyama LM, Guimaraes PA, Santos OF, Ribeiro EB. 2006. Gender difference in the effect of intrauterine malnutrition on the central anorexigenic action of insulin in adult rats. *Nutrition*, 22(11-12):1152-1161.
- Saule P, Vicogne J, Delacre M, Macia L, Tailleux A, Dissous C, Auriault C, Wolowczuk I 2005. Host glucose metabolism mediates T4 and IL-7 action on *Schistosoma mansoni* development. *J Parasitol*, 91: 737-744.
- Standen, OD. 1951. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 45:225-241.
- Sawaya AL. 2006. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estudos avançados*, 20(58): 147-158.
- Sawaya AL, Martins P, Hoffman D, Roberts SB. 2003. The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. *Nutr Ver*, 61: 168-175.
- Schoof E, Stuppy A, Harig F, Carbon R, Horbach T, Stoehr W, Rascher W and Dötsch J.2004. Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. *European Journal of Endocrinology*, 150: 579-584.
- Silva LM, Fernandes AL, Barbosa A, Jr., Oliveira IR, Andrade ZA 2000. Significance of schistosomal granuloma modulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 353-361.

- Silva RR, Machado-Silva JR, Faerstein NF, Rey L. 1992. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*. Parasitological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87(1): 271-276.
- Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. 2000a. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 614-618.
- Sichieri R, Siqueira KS, Pereira RA, Ascherio A. 2000b. Short stature and hypertension in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Public Health Nutr*, 3: 77-82.
- Simões C, Neves RH, Barros LA, Brito PD, Cravo CO, de Moura EG, Machado-Silva JR. 2002. Parasitological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in swiss mice with underlying malnutrition. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(1): 143-147.
- Skelly PJ & Wilson RA. 2006. Making sense of the schistosome surface. *Advances in Parasitology*, 63: 185-284.
- Smithers SR, Terry RJ. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worm. *Parasitology*, 55: 695-700.
- Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA. 2000. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology*, 121: S23-S38.
- Tallima H, El Ridi R. 2005. Methyl-beta-Cyclodextrin treatment and filipin staining reveal the role of cholesterol in surface membrane antigen sequestration of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* lung-stage larvae. *J Parasitol*, 91: 720-725.
- Teixeira CV, Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP, Moura EG. 2002. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem*, 13: 493-498.
- Tonkiss J, Trzcinska M, Galler JR, Ruiz-Opazo N. 1998. Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. *Hypertension*, 32: 108-114.
- Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MC. 2006a. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr*, 95(4): 830-837.
- Toste FP, Alves SB, Dutra SC, Bonomo IT, Lisboa PC, Moura EG, Passos MC. 2006b. Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm Metab Res*, 38(12): 827-831.
- Trevenzoli IH, Valle MM, Machado FB, Garcia RM, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. 2007. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol*, 580(2): 629-637.
- Unsworth DJ, Scott DL, Almond TJ, Beard HK, Holborow EJ, Walton KW. 1982. Studies on reticulin. I: Serological and immunohistological investigations of the occurrence of collagen type III, fibronectin and the non-collagenous glycoprotein of Pras and Glynn in reticulin. *Br J Exp Pathol*, 63: 154-166.

Vicente LL, Moura EG, Lisboa PC, Costa AMA, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MCF. 2004. Malnutrition during lactation is associated with higher expression of leptin receptor in pituitary of the adult offspring. *Nutritio*, 20: 924-928.

Vickers MH, Ikenasio BA, Breier BH. 2001a. IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming. *Endocrinol*, 142(9): 3964-3973.

Vickers MH, Reddy S, Ikenasio BA, Breier BH. 2001b. Dysregulation of the adipoinular axis a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. *J Endocrinol*, 170(2): 323-332.

Yura S & Fujii S. 2006. Obesity in offspring with maternal undernutrition during pregnancy. *Nippon Rinsho*, 64(4): 795-780.

Walker P, Courtin F. 1985. Transient neonatal hyperthyroidism results in hypothyroidism in the adult rat. *Endocrinol*, 116: 2246-2250.

Warren KS, Domingo EO. 1970. Granuloma formation around *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum* eggs. Size and rate of development, cellular composition, cross-sensitivity, and rate of egg destruction. *Am J Trop Med Hyg*, 19: 292-304.

Webster BL, Tchuem Tchuente LA, Jourdan J, Southgate VR. 2005. The interaction of *Schistosoma haematobium* and *S. guineensis* in Cameroon. *J. Helminthol*, 79: 193-197.

Woods LL, Weeks DA, Rasch R. 2004. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*, 65: 1339-1348.