



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Carlos Eduardo da Silva Filomeno

**O intestino como sítio de estudo da interação entre esquistossomose mansoni,
síndrome metabólica e microbiota intestinal**

Rio de Janeiro

2023

Carlos Eduardo da Silva Filomeno

O intestino como sítio de estudo da interação entre esquistossomose mansoni, síndrome metabólica e microbiota intestinal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F488 Filomeno, Carlos Eduardo da Silva.

O intestino como sítio de estudo da interação entre esquistossomose mansoni, síndrome metabólica e microbiota intestinal / Carlos Eduardo da Silva Filomeno. - 2023.
90 f.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Esquistossomose mansoni – Diagnóstico. 2. Síndrome metabólica – Complicações – Teses. 3. Microbioma gastrointestinal – Teses. I. Silva, José Roberto Machado e. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.993.122

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Carlos Eduardo da Silva Filomeno

O intestino como sítio de estudo da interação entre esquistossomose mansoni, síndrome metabólica e microbiota intestinal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 14 de dezembro de 2023.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Alba Cristina Miranda de Barros Alencar
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Flávia Márcia de Castro e Silva
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof. Dr. Julio Beltrame Daleprane
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que lutaram por políticas públicas de inclusão social para a redução das desigualdades e se doaram para construção de uma sociedade justa, com equidade, respeito e paz.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa uma conquista de todos que pavimentaram esta estrada para eu passar. Por isso, inicio meus agradecimentos aos meus ancestrais de gerações que eu desconheço, pois através deles, hoje estou aqui escrevendo mais uma história e pavimentando outras estradas;

Minha gratidão eterna à minha família, que sempre acreditou, me incentivou e investiu na minha formação, em especial minha mãe, Cleia Maria, meu pai, Eduardo Antônio Filomeno (*in memoriam*), minha irmã Vivian, meus sobrinhos e aos meus avós maternos Carmem (*in memoriam*) e João Batista (*in memoriam*);

A minha esposa Stéphaney Medeiros e ao meu filho, Antônio que deram mais cor à minha vida;

A todos os meus professores, pois foram instrumento fundamentais na minha formação e decisão pela minha profissão, da alfabetização à graduação. Em especial a professora Dra. Débora Lage e ao Dr. José Roberto Machado e Silva que me orientaram na graduação e na pós-graduação, respectivamente, com zelo, paciência e muita atenção. A professora Renata Heisler Neves pelos diálogos e dúvidas tiradas em longas conversas pelo Whatsapp e todos os técnicos do laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto da UERJ, em especial aos Kaio. Toda a equipe técnica da Disciplina de Parasitologia contribuiu muito durante o processo deste trabalho. Minha grande gratidão.

A pós-graduação foi muito mais leve, pois tive um grande presente: os amigos. A Thainá, Joana, Aline, Bruno, Karine, Ingrid, Juliana, e ao melhor aluno de iniciação científica do mundo, Luiz Roberto, meu muito obrigado.

Aos meus amigos da Igreja Católica e do pré-vestibular social e a todos os meus alunos da educação básica e da graduação do EAD do IBRAG UERJ, obrigado pela perseverança e incentivo.

Minha maior gratidão a Deus, pois me concedeu saúde, força, fé e sabedoria durante todo o processo acadêmico. Me sustentou e guiou para que eu cuidasse de mim, e principalmente dos meus dependentes e todos que eu amo. Toda honra e toda Glória a Deus!

Este estudo foi possibilitado pelo fomento fornecido à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Muito obrigado.

Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.

Rubem Alves

RESUMO

FILOMENO, Carlos Eduardo da Silva. **O intestino como sítio de estudo da interação entre esquistossomose mansoni, síndrome metabólica e microbiota intestinal**. 2023. 90 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A esquistossomose é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Sabe-se que a esquistossomose mansônica e a síndrome metabólica (SM) concomitantes intensificam as lesões no tecido hepático, mas a interação dessas duas doenças no intestino e o papel da microbiota em conjunto permanece indefinida. Portanto, utilizando um modelo de obesidade induzida por dieta, buscamos abordar essa lacuna. Camundongos machos C57BL/6 alimentados com uma dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) ou uma dieta padrão (10% de lipídeos) por 13 semanas foram infectados com 100 cercarias de *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Os camundongos foram então alocados em quatro grupos: CDP (controle alimentado com dieta padrão), CDH (controle alimentado com dieta hiperlipídica, IDP (infectado alimentado com dieta padrão) e IDH (infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Uma semana antes da eutanásia, as fezes de cada animal foram coletadas para a coprocultura e análise de microbiota por MALDI-TOF. Posteriormente os animais foram submetidos ao teste oral de tolerância à glicose. A eutanásia ocorreu 21 semanas após o início da administração da dieta e com 9 semanas de infecção. Amostras de sangue foram coletadas para análise bioquímica lipídica. Avaliamos a atividade das citocinas dos macrófagos residentes do peritônio (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ e TNF). Os depósitos de gordura foram retirados para o cálculo do índice de adiposidade. Seções do intestino foram usadas para oograma de digestão em KOH e esmagamento, os helmintos adultos recuperados foram fixados e corados para análise morfométrica. Seções histológicas do jejuno foram retirados e submetidos a processamento histológico de rotina, análises morfométricas do segmento jejuno foram realizadas, pontos de inflamação, frequência de células caliciformes e hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). Nossos resultados mostraram que IDH apresentou redução do perfil lipídico e melhor tolerância oral à glicose, bem como redução da massa corporal. IDP apresentou ligeiramente mais casais de vermes que IDH, conseqüentemente, eliminou mais ovos, contudo, sem diferença estatística entre os grupos. Os helmintos machos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior área dos lobos testiculares e as fêmeas com área e perímetro dos ovários maiores que seu controle. A infecção foi o fator mais determinante para a expressão de citocinas dos macrófagos residentes que a SM. Bactérias Firmicutes e Proteobactérias foram os filos identificados. A espécie *Klebsiella variicola* foi identificada apenas em IDH. O FISH revelou uma distribuição de bactérias nas camadas mucosa, sobretudo nas criptas de Lieberkühn, na submucosa e muscular, sugerindo uma possível translocação de bactérias em IDH que também apresentou hiperplasia de vilosidades, hipertrofia de células de Paneth, perda de mucosa epitelial, alterações da submucosa e integridade muscular externa. A esquistossomose também induz profundos efeitos sobre a homeostase intestinal durante a transmigração de ovos através da parede gastrointestinal, resultando em tecido intestinal inflamado e permeável. Em conjunto, nossos dados sugerem que a SM concomitante e a esquistossomose aguda têm um impacto significativo na arquitetura do jejuno em camundongos C57BL/6.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; camundongo; dieta hiperlipídica; bactérias; intestino.

ABSTRACT

FILOMENO, Carlos Eduardo da Silva. *The gut as a site to study the interaction between schistosomiasis mansoni, metabolic syndrome and microbiota*. 2023. 90 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Schistosomiasis is a neglected disease that affects millions of people worldwide. It is known that concomitant schistosomiasis mansoni and metabolic syndrome (MS) intensify lesions in liver tissue, but the interaction of these two diseases in the gut and the role of the microbiota together remains undefined. Therefore, using a model of diet-induced obesity, we sought to address this gap. Male C57BL/6 mice fed a high-fat diet (60% lipids) or a standard diet (10% lipids) for 13 weeks were infected with 100 *Schistosoma mansoni* cercariae (strain BH). The mice were then allocated into four groups: CDP (control fed a standard diet), CDH (control fed a high-fat diet), IDP (infected fed a standard diet) and IDH (infected fed a high-fat diet). One week before euthanasia, the feces of each animal was collected for co-culture and microbiota analysis by MALDI-TOF. The animals then underwent an oral glucose tolerance test. Euthanasia took place 21 weeks after the start of the diet and at 9 weeks of infection. Blood samples were collected for biochemical lipid analysis. We assessed the activity of the cytokines of the resident macrophages of the peritoneum (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ and TNF). Fat deposits were removed to calculate the adiposity indices. Sections of the intestine were used for KOH digestion and crushing, and the adult helminths recovered were fixed and stained for morphometric analysis. Histological sections of the jejunum were removed and subjected to routine histological processing, morphometric analyses of the jejunum segment were performed, inflammation points, goblet cell frequency and fluorescence in situ hybridization (FISH). Our results showed that IDH had a reduced lipid profile and better oral glucose tolerance, as well as a reduced body mass. IDP had slightly more worm couples than IDH, and consequently eliminated more eggs, although there was no statistical difference between the groups. The male helminths fed the high-fat diet had larger testicular lobes and the females had larger ovarian areas and perimeters than the control. Infection was a greater determinant of the expression of cytokines in resident macrophages than MS. Firmicutes and Proteobacteria were the phyla identified. The *Klebsiella variicola* species was identified only in IDH. FISH revealed a distribution of bacteria in the mucosal layers, especially in the Lieberkühn crypts, in the submucosa and muscle, suggesting a possible translocation of bacteria in IDH, which also showed villous hyperplasia, Paneth cell hypertrophy, loss of epithelial mucosa, submucosal alterations and external muscle integrity. Schistosomiasis also induces profound effects on intestinal homeostasis during egg transmigration through the gastrointestinal wall, resulting in inflamed and permeable intestinal tissue. Taken together, our data suggest that concomitant MS and acute schistosomiasis have a significant impact on the architecture of the jejunum in C57BL/6 mice.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; mice; high-fat diet; bacteria; intestine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição mundial das esquistossomoses.....	16
Figura 2 –	Caramujo do gênero <i>Biomphalaria sp</i>	17
Figura 3 –	Mapa de distribuição da esquistossomose no Brasil – 2010/2015.....	18
Figura 4 –	Esporocistos, cercaria e helminto adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	19
Figura 5 –	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	20
Figura 6 –	Localização dos helmintos adultos (setas) de <i>Schistosoma mansoni</i> no interior dos vasos mesentéricos de camundongo.....	21
Figura 7 –	Visão macroscópica de granulomas hepáticos em modelo murino.....	23
Figura 8 –	Processo proposto de quatro estágios de excreção intestinal de ovos de <i>S. mansoni</i>	24
Figura 9 –	A migração de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 10 –	Granuloma esquistossomótico hepático e suas diferentes regiões.....	27
Figura 11 –	Composição do granuloma hepático e intestinal.....	28
Figura 12 -	Estrutura do intestino delgado	33
Figura 13 -	Microbioma intestinal, nichos de bactérias.....	35
Figura 14 -	A inter-relação entre microbiota intestinal, inflamação, resistência à insulina, adiposidade e doenças metabólicas.....	37
Figura 15 -	Protocolo experimental dos intestinos	47
Quadro 1 -	Etapas da preparação histológica.....	48
Quadro 2 –	Protocolo para coloração em Ácido Periódico de Schiff (PAS) em intestino.....	49
Quadro 3 -	Protocolo para coloração em Hematoxilina & Eosina (H&E).....	50
Figura 16 -	Modelo usado para a morfometria do intestino delgado	51
Quadro 4 -	Protocolo para coloração de helmintos em Carmin clorídrico.....	52
Figura 17 -	Teste oral de tolerância à glicose.....	56
Figura 18 -	Correlação entre número de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> eliminados nas fezes e o número de casais recuperados de camundongos C57BL/6	

	alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.....	57
Figura 19 -	Quantificação das citocinas dos macrófagos peritoneais residentes.	60
Figura 20 -	Unidades formadoras de colônias em diferentes meios de cultura.....	61
Figura 21 -	Microscopia por fluorescência usando hibridização in situ (FISH).....	63
Figura 22 -	Morfometria do segmento jejunal do intestino	65
Figura 23 -	Pontos de inflamação do segmento jejunal do intestino.....	66
Figura 24 -	Área e frequência das células caliciformes do intestino delgado (jejuno) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.....	66
Figura 25 -	Seções de intestino delgado de camundongos C57BL/6 coradas com PAS para verificação de células caliciformes.....	67
Figura 26 -	Histologia do segmento jejuno de camundongos C57BL/6.....	69
Figura 27 -	Histologia do segmento jejuno de camundongos C57BL/6 não infectados alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.....	70
Figura 28 -	Histologia do segmento jejuno de camundongos C57BL/6 infectados com <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição da dieta experimental	44
Tabela 2 –	Parâmetros biométricos e bioquímicos de camundongos infectados ou não infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> alimentados com dietas padrão ou hiperlipídica	55
Tabela 3 –	Parâmetros parasitológicos: e oograma intestinal e desenvolvimento dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos infectados ou não infectados alimentados com dietas padrão ou hiperlipídica	56
Tabela 4 –	Análise morfométrica de <i>Schistosoma mansoni</i> machos recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com deita padrão ou hiperlipídica	58
Tabela 5 –	Análise morfométrica de <i>Schistosoma mansoni</i> fêmeas recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com deita padrão ou hiperlipídica	59
Tabela 6 –	Identificação microbiológica das fezes de camundongos C57BL/6 por espectrometria de massa (MALDI-TOF)	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CDH	Controle alimentado com dieta hiperlipídica
CDP	Controle alimentado com dieta padrão
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FIAF	Fator Adiposo Induzido pelo Jejum
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	Infectado alimentado com dieta hiperlipídica
IDP	Infectado alimentado com dieta padrão
ISO	<i>International Standards Organization</i>
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
SM	Síndrome Metabólica
MI	Microbiota Intestinal
NAFLD	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
SCFAS	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
TRL-4	Receptor Toll-like 4

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa
μ	Micro
≥	Maior ou igual

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	JUSTIFICATIVA	40
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Desenho experimental	42
3.2	Modelo experimental	43
3.3	Dieta	43
3.4	Grupos experimentais e infecção	44
3.5	Coprocultura - Isolamento da microbiota intestinal	44
3.6	Análises bioquímicas e eutanásia	46
3.7	Atividade dos macrófagos peritoneais residentes	46
3.8	Análises biométricas	47
3.9	Quantificação de ovos no tecido – Oograma	47
3.10	Histologia e morfometria	48
3.11	Recuperação, processamento e morfometria dos helmintos	51
3.12	Hibridização in situ por fluorescência (FISH)	52
3.13	Análise estatística	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Parâmetros biométricos e bioquímicos	54
4.2	Parâmetros parasitológicos	56
4.3	Análise morfométrica e morfológica de <i>Schistosoma mansoni</i> adultos recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica	57
4.4	Atividade dos macrófagos peritoneais residentes	59
4.5	Estudo da microbiota de camundongos C57BL/6 infectados por <i>S. mansoni</i> alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica	60
4.6	MALDI-TOF – Composição microbiana presente nas fezes	61
4.7	Análise da hibridização in situ por fluorescência (FISH)	62
4.8	Intestino delgado: morfometria e histologia	64

5	DISCUSSÃO	73
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
	REFERÊNCIAS	80

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada causada por helmintos classe Trematoda, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma* (Weinland, 1858) que se alojam e residem nos vasos mesentéricos ou da bexiga dos seres humanos e de outros vertebrados, dependendo da espécie de parasito (COLLEY et al., 2014).

Dentro do gênero *Schistosoma*, cinco espécies parasitam o homem: *Schistosoma japonicum*, Katsurada, 1904, encontrado na China e no Sudeste Asiático; *Schistosoma haematobium*, Bilhartz, 1852, que ocorre na África e no Oriente Médio; *Schistosoma mekongi*, Vogé; Brickner; Bruce, 1978, encontrado apenas no Delta do Rio Mekongi; *Schistosoma intercalatum*, Fisher, 1934, encontrado na África Ocidental e Central, *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907, endêmico na África, Antilhas e América do Sul. Dentre as espécies citadas, o *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* são as que apresentam significativa importância médica, sendo responsável por grande morbidade. O *S. haematobium* é o causador da esquistossomose urinária e os *S. mansoni* e *S. japonicum* são responsáveis pela esquistossomose intestinal e hepatoesplênica (REY, 2001; NEVES et al., 2005; GRYSEELS et al., 2006; HOTEZ et al., 2008; GRYSEELS, 2012).

Os primeiros registros de esquistossomose humana foram feitos nas bacias dos rios Nilo, na África, e Yangtze, na Ásia (RUFFER, 1910; ARIADNA et al., 2001). Em múmias egípcias foram encontradas lesões características da esquistossomose urinária, causadas por *S. haematobium*. Estudos indicam que destes pontos de origem, a doença se dispersou para outros continentes, seguindo os fluxos migratórios (NEVES et al., 2005; ELBAZ; ESMAT, 2013).

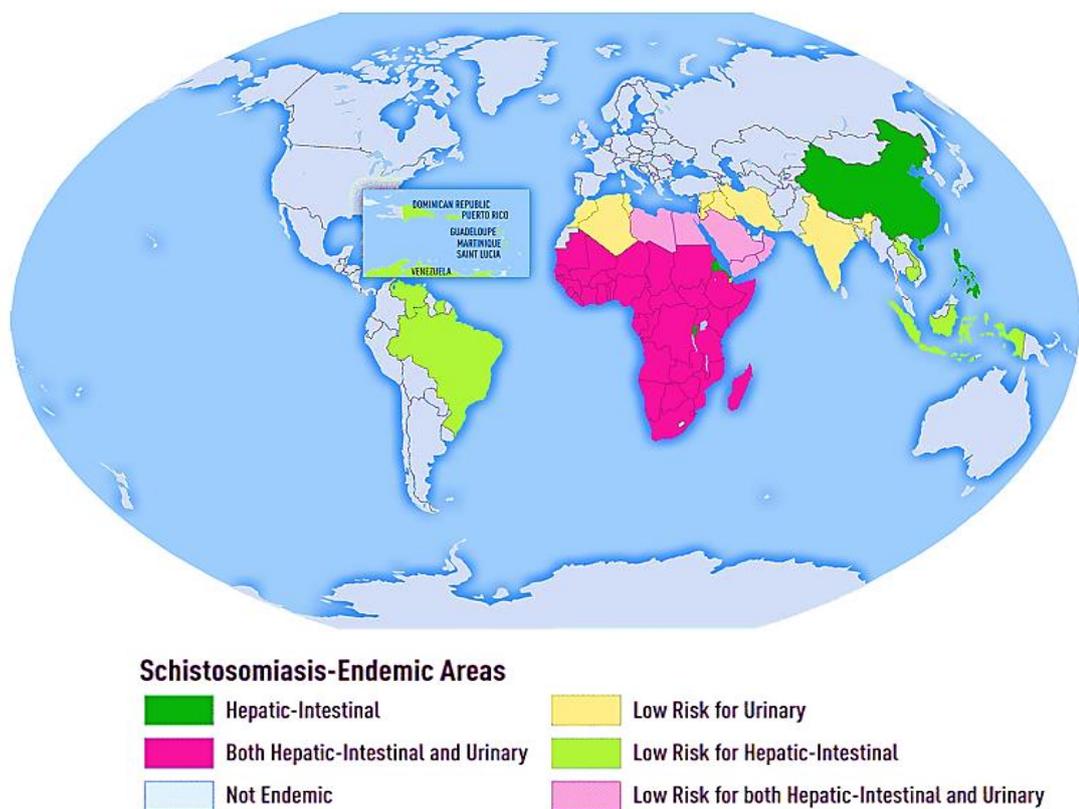
No Brasil, a esquistossomose foi introduzida por meio do tráfico dos escravos, oriundos da África, entre o século XVI e o XVIII. Parte das pessoas escravizadas trazidas do continente africano para o Brasil estava infectada pelo *S. mansoni* e *S. haematobium*. Entretanto, apenas a primeira espécie estabeleceu-se devido à presença do hospedeiro intermediário susceptível, caramujos do gênero *Biomphalaria*, e condições favoráveis para manter seu ciclo biológico (KATZ, 2018).

A transmissão da esquistossomose está condicionada a fatores como a presença de hospedeiros intermediários, isto é, moluscos gastrópodes do gênero *Biomphalaria*, *Oncomelania* e *Bulinus* de acordo com a espécie de *Schistosoma*, e com a presença de indivíduos portadores da doença que eliminam ovos em coleções de água doce (REY, 2001). Sendo assim, a esquistossomose está intimamente associada às condições socioeconômicas precárias das regiões endêmicas, principalmente em locais sem acesso a água potável e a

saneamento básico deficiente (RASO et al., 2007; WHO, 2014). Casos de infecções por *Schistosoma sp.* também são relatados associados à turismo de aventura (RÖSER et al., 2018), à imigração, aos viajantes e refugiados que se infectaram em regiões endêmicas (MARCHESE et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 251,4 milhões de pessoas estão infectadas em uma escala global, distribuída em 78 países, e mais de 700 milhões de pessoas residem em regiões endêmicas com alto risco de desenvolver esta parasitose (WHO, 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição mundial das esquistossomoses



Fonte: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016.

Epidemiologia da esquistossomose mansoni

Das espécies de *Schistosoma sp.* que parasitam o homem, apenas a *Schistosoma mansoni* existe nas Américas do Sul e Central (BRASIL, 2014). Outras espécies não são encontradas nas Américas devido à inexistência de hospedeiros intermediários suscetíveis à infecção, o caramujo de água doce do gênero *Biomphalaria* (Figura 2). O *S. mansoni* está bem

adaptado para infectar cronicamente seres humanos como resultado de aproximadamente 200.000 anos de coevolução com seres humanos modernos (SCHWARTZ; FALLON, 2018). São três as espécies de *Biomphalaria* encontrada naturalmente nas Américas, a saber: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. straminea* (Dunker, 1848) e *B. tenagophila* (Orbigny, 1835).

Figura 2 – Caramujo do gênero *Biomphalaria* sp.

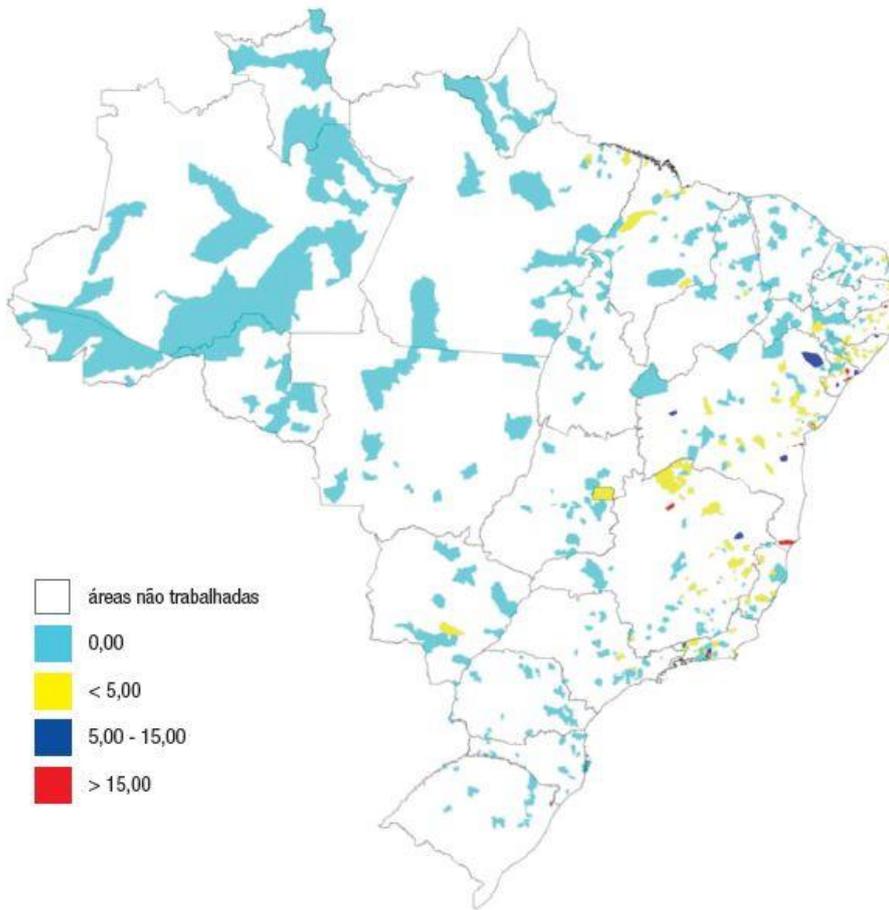


Fonte: DUVAL et al., 2015

No Brasil, a esquistossomose mansoni ainda é considerada uma doença negligenciada de elevada prevalência, apresentando áreas endêmicas e focais com complicações, gravidades e promoção de pobreza (STEINMANN et al., 2006; RASO et al., 2007; VITORINO et al., 2012). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2019) a doença é endêmica nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe com relatos de focos de transmissão no Pará, Ceará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás e Rio Grande do Sul (Figura 3).

Estima-se que no Brasil 1,5 milhão de pessoas estejam infectadas pelo *Schistosoma mansoni*. A doença possui baixa letalidade e as principais causas de óbito estão relacionadas às formas clínicas graves. Entre 2006 e 2015, registraram-se, em média, cerca de 508 óbitos anuais pela doença no Brasil. A morbidade da esquistossomose mansoni representa um grande problema à saúde pública, à qualidade de vida e ao desenvolvimento econômico da população (BRASIL, 2019).

Figura 3 - Mapa de distribuição da esquistossomose no Brasil – 2010/2015



Fonte: KATZ, 2018.

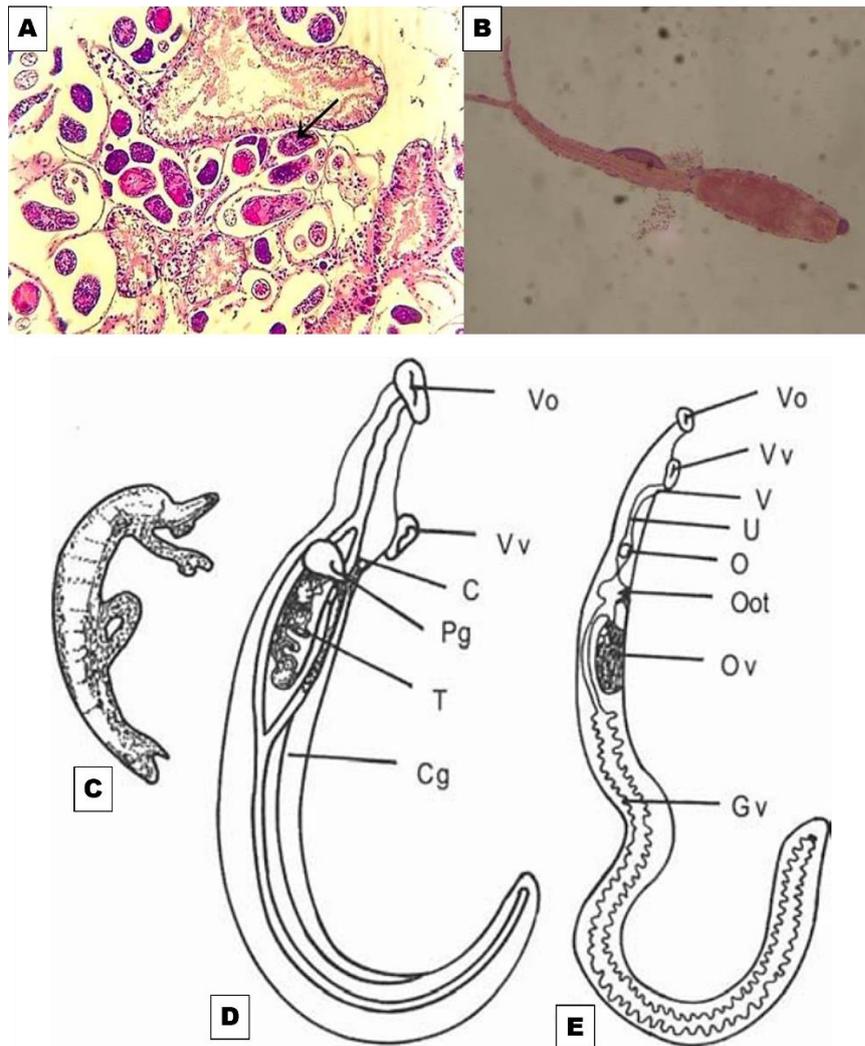
O agente etiológico e o ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907), agente causador da esquistossomose mansoni, é um Platelmino, da classe dos Trematoda, família Schistosomatidae, que apresenta como característica a existência de sexos separados, com nítido dimorfismo sexual. A etimologia do gênero *Schistosoma* refere-se à fenda (schisto) no corpo (soma) do macho, chamada de canal ginecóforo.

O ciclo de vida do *S. mansoni* é complexo, envolvendo mamíferos (hospedeiros definitivos) e moluscos (hospedeiros intermediários) (REY, 2001). O hospedeiro vertebrado infectado defeca próximo a coleções de água doce e, juntamente, com as fezes são liberados ovos do parasito, contendo uma larva ciliada denominada miracídio. Por conta de estímulos luminosos e térmicos, o miracídio eclode na água e se desloca com o auxílio de seus cílios até encontrar o molusco suscetível, *Biomphalaria spp.* O miracídio penetra no tegumento do

caramujo, perde os cílios, e por um processo de multiplicação assexuada são formadas gerações de esporocistos inicialmente primários (Figura 4A), depois esporocistos secundários, que dão origem a milhares de cercarias bifurcadas, formas infectantes para o hospedeiro definitivo (Figura 4B). Em geral, o ciclo completa-se em torno de 30 dias (Figura 4C, D e E).

Figura 4 – Esporocistos, cercaria e helminto adulto de *Schistosoma mansoni*.



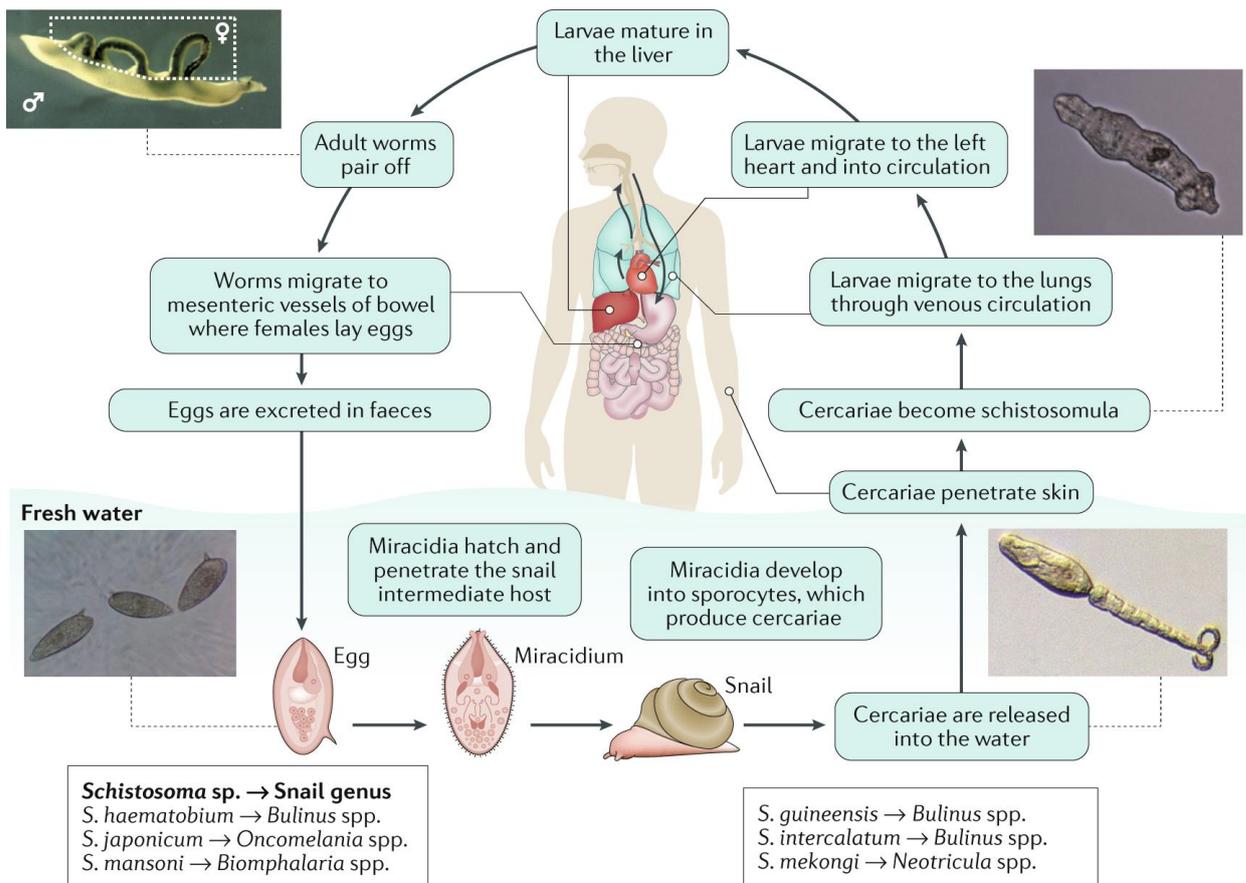
Legenda: A- Esporocisto de *Schistosoma mansoni* no caramujo *Biomphalaria* sp.(seta). Coloração HE, 200x. B- Cercaria de *Schistosoma mansoni*. Helminto. C - casal em cópula. D - macho; E - fêmea. Vo, ventosa oral; Vv, ventosa ventral; C, ceco ramificado; Pg, poro genital; T, testículo; Cg, canal ginecóforo; V, vulva; U, útero; O, ovo; Oot, oótipo; O, ovário; Gv, glândulas vitelinas.

Fonte: O autor, 2023.

Fatores ambientais como temperatura e luminosidade estimulam a liberação das cercarias, que no meio aquático permanecem infectantes por cerca de 24 horas. O ciclo no hospedeiro definitivo se estabelece quando as cercarias penetram de forma ativa a pele, por meio de secreções proteolíticas (Figura 5). No local de penetração, as cercarias perdem a

cauda bifurcada, sofrem reorganização no tegumento, para adaptação ao novo ambiente, e passam para a forma evolutiva denominada esquistossômulo. Os esquistossômulos migram na derme, passam para a corrente sanguínea e são levados ao coração e pulmões (REY, 2001; GRYSSELS et al., 2006).

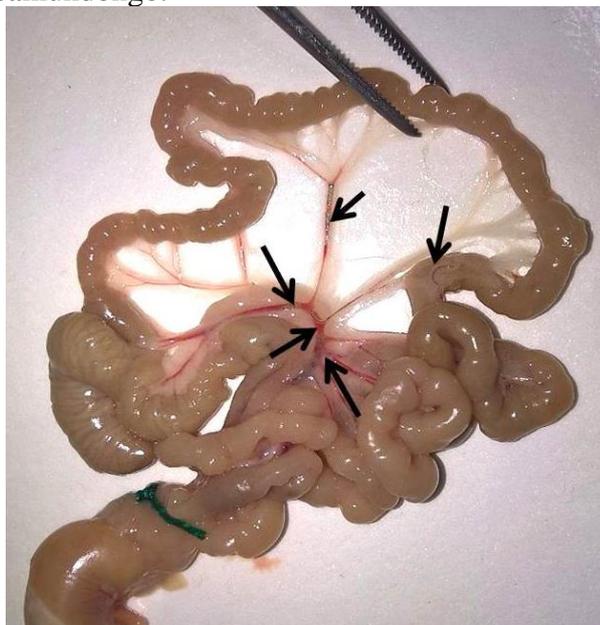
Figura 5 – Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: McMANUS et al., 2018.

Em torno do 15º dia de infecção, os esquistossômulos (com sexo determinado desde a fase de miracídio) deixam os pulmões e são carregados para a circulação porta hepática. Em torno de 30 dias de infecção, as formas imaturas desenvolvem o sistema reprodutor e se tornam helmintos adultos. Após o acasalamento nos vasos intra-hepáticos os espécimes adultos migram acasalados para as veias mesentéricas onde ocorre a oviposição e eliminação de ovos nas fezes (Figura 6).

Figura 6 - Localização dos helmintos adultos (setas) de *Schistosoma mansoni* no interior dos vasos mesentéricos de camundongo.



Fonte: ACERVO DO LABORATÓRIO DE HELMINTOLOGIA ROMERO LASCASAS PORTO DA UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Manifestações clínicas da esquistossomose mansoni

As manifestações clínicas correspondem ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro. A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção. Clinicamente, a esquistossomose pode ser classificada em fase aguda (inicial) e fase crônica (tardia).

As manifestações clínicas iniciais, agudas, são decorrentes da penetração da cercaria na pele do hospedeiro definitivo com quadro de alergia e alterações dermatológicas, conhecida como dermatite cercariana, mais comum em pessoas hipersensíveis e em reinfecções (REY, 2001; NEVES, 2005). Entre 3 e 7 semanas após a infecção pode ocorrer febre Katayama, que se caracteriza por febre, cefaleia, anorexia, linfadenopatia, dor abdominal e, com menor frequência, o paciente pode referir diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca (LAMBERTUCCI, 1993; ROCHA et al., 1995; COURA; AMARAL, 2004; BOTTIEAU et al., 2006). Estes sintomas geralmente são apresentados na fase aguda da doença, porém há muitos casos assintomáticos.

Cada par de verme adulto produz ~300 ovos por dia, que saem dos vasos mesentéricos, atravessam a parede intestinal e entram no lúmen (REY, 2001). Em virtude do sentido da circulação sanguínea em direção ao fígado, uma grande parte dos ovos produzidos retorna a esse órgão e fica retida nos vasos pré-sinusoidais ou são disseminados para outros

órgãos ou translocados pelo epitélio intestinal para a luz do intestino (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Nos casos sintomáticos, as manifestações clínicas irão depender de múltiplos fatores, como carga parasitária, número de infecções e características do hospedeiro tais como, o estado nutricional, a constituição genética, a idade e, principalmente o perfil imunitário (REY, 2001; COURA; AMARAL, 2004).

Em modelo murino a fase aguda é considerada aguda até a 6^a-9^a semana de infecção (ANDRADE, 1987; WYNN et al., 1993; COSTA- SILVA et al., 2002), intermediária 10^a a 11^a e crônica a partir da 12^a (FALLON, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002).

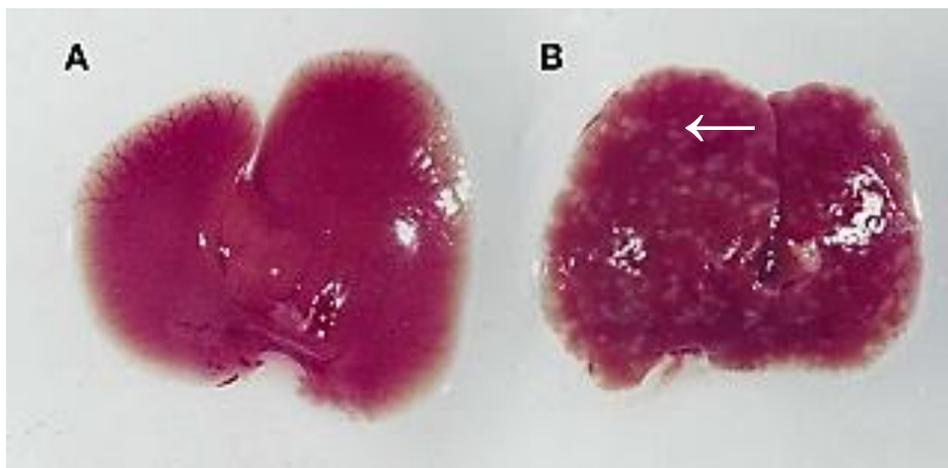
A fase crônica pode ser dividida em três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica sendo esta última subdividida em compensada e descompensada (REY, 2001; BRASIL, 2014). A forma intestinal é muito comum em áreas endêmicas e caracteriza-se por lesões hepáticas moderadas com sintomatologia como astenia, desconforto abdominal, perda de apetite, disenteria e cólicas intestinais. Estes sintomas dificultam o diagnóstico visto que são similares a outros tipos de doenças (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; COURA; AMARAL, 2004).

Na forma hepatointestinal, a sintomatologia é semelhante à intestinal, entretanto as lesões hepáticas são mais intensas principalmente no baço e no fígado (REY, 2001). Na forma hepatoesplênica as manifestações clínicas são mais severas tais como: circulação colateral, ascite e formação de varizes gastroesofágicas em decorrência da hipertensão portal causada pela fibrose de Symmers (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

Patologia geral e patogênese da esquistossomose mansoni

Os ovos do parasito que não conseguiram atravessar as camadas do intestino para eliminação pelas fezes ficam retidos nos tecidos intestinais ou são embolizados para o fígado, em virtude do sentido da circulação sanguínea, ficando presos nos capilares pré-sinusoidais. A principal patologia associada à infecção por *S. mansoni* é o desenvolvimento de inflamação granulomatosa em torno dos ovos retidos nos tecidos (Figura 7).

Figura 7 – Visão macroscópica de granulomas hepáticos em modelo murino.



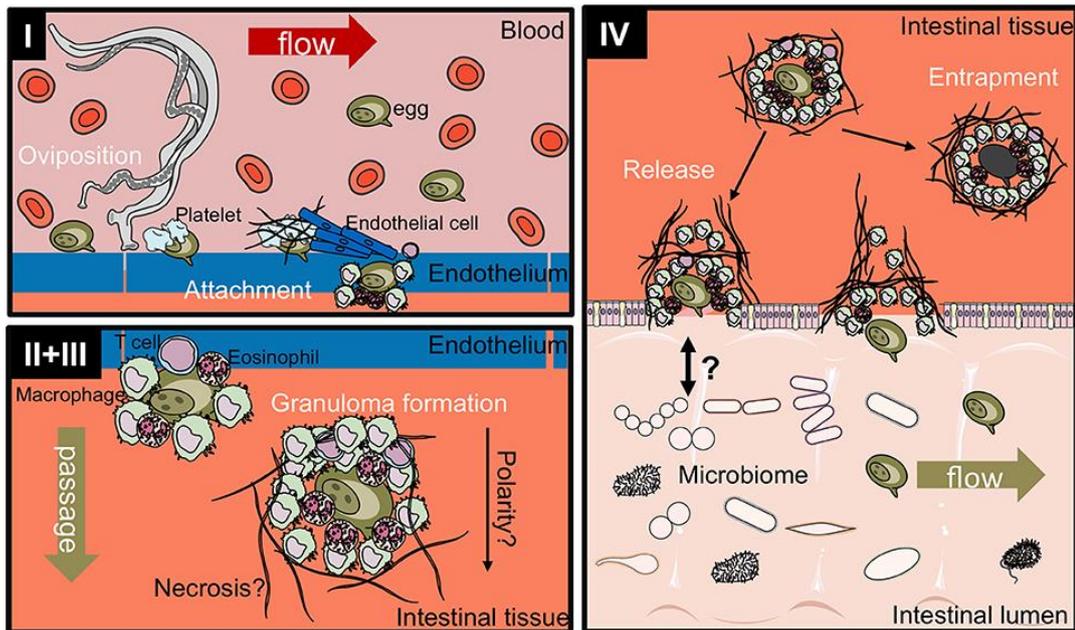
Legenda: A - Imagem de fígado de animal não infectado. B - Fígado de animal infectado com *Schistosoma mansoni* com a presença de granulomas periovais. Representações de modelos experimentais murinos.

Fonte: HAMS et al., 2013. Adaptado.

As secreções provenientes do miracídio, denominadas Antígeno Ovular Solúvel (SEA), têm como composição enzimas e complexas frações de glicoproteínas que geram uma resposta inflamatória capaz de ativar o sistema imune celular do hospedeiro (STADECKER et al., 2004; ANDRADE, 2009). Sendo a reação inflamatória granulomatosa gerada em torno dos ovos depositados pelos parasitos nos tecidos a alteração mais importante na imunopatologia da esquistossomose no fígado, intestino e baço (HAMS et al., 2013; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Os ovos de *S. mansoni* são metabolicamente ativos e altamente antigênicos, evocando uma inflamação que leva à formação de granuloma em torno do ovo nos sítios, com perfis diferentes (HANS, et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Os ovos do parasito liberados nos vasos mesentéricos são eliminados nas fezes para continuidade do ciclo. Segundo Schwartz e Fallon (2018), o processo de liberação dos ovos de *S. mansoni* pode ser dividido em quatro estágios: (i) liberação do ovo na corrente sanguínea e ligação ao endotélio; (ii) formação de granuloma imune-dependente; (iii) transição entre endotélio e epitélio e (iv) liberação no lúmen intestinal (Figura 8).

Figura 8 - Processo proposto de quatro estágios de excreção intestinal de ovos de *S. mansoni*.

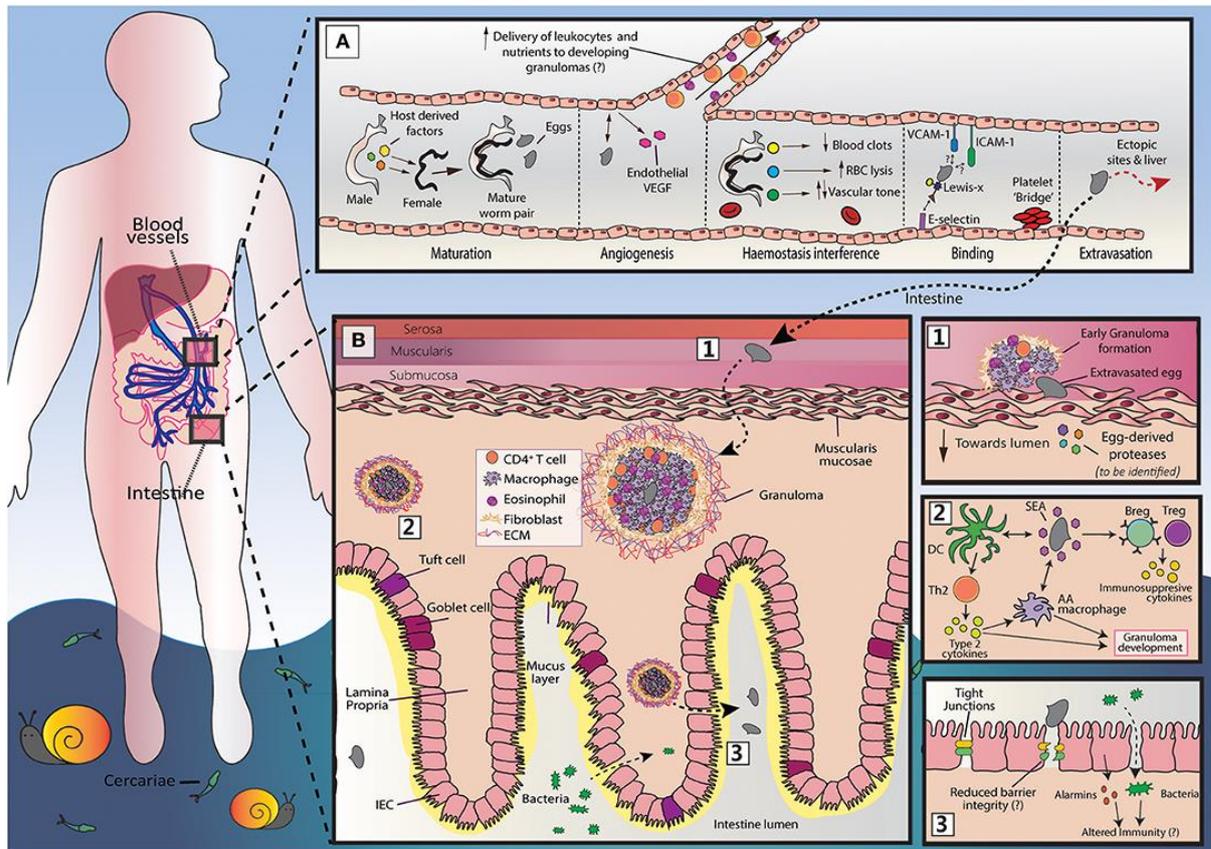


Legenda: **I** - Os vermes adultos depositam seus ovos nos vasos próximos à lâmina própria. Plaquetas e fibrinogênio aderem aos ovos e ativam o endotélio. As células endoteliais crescem ativamente sobre o ovo, suportando seu extravasamento. Os ovos que não cruzam a borda endotelial são disseminados pelo fluxo sanguíneo e ficam presos principalmente no sistema porta do fígado. **II + III** - células imunes, como macrófagos, células T e eosinófilos, começam a encapsular o ovo. A formação de granuloma ocorre ao redor do ovo e, juntamente com outros processos, como fibrinólise e necrose, leva à passagem do ovo em direção ao lúmen intestinal. **IV** - Os ovos presos ficam fibróticos e calcificados. A interação com o microbioma intestinal, a morte e a remodelação das células epiteliais podem levar à liberação ativa de ovos, que são então liberados no ambiente pelas fezes do hospedeiro. Ilustrações modificadas da Servier Medical Art.

Fonte: SCHWARTZ; FALLON, 2018.

Os esquistossomos desenvolveram ao longo da evolução estratégias que favorecem a passagem dos ovos através dos seus sítios até a liberação no lúmen intestinal (Figura 9). Os vermes adultos sexualmente maduros produzem ovos na veia porta (~ 5-6 semanas após a infecção). A produção de ovos é um evento marcante no ciclo de vida do *S. mansoni* e é caracterizada pela indução de uma resposta Th2 e angiogênese marcados pela promoção e recrutamento de células imunes e nutrientes para o desenvolvimento de granulomas (COSTAIN et al., 2018).

Figura 9 – A migração de ovos de *Schistosoma mansoni*.



Legenda: **A** – A produção, maturação e liberação de ovos de *S. mansoni* na veia porta são marcados por diversos eventos imunológicos. O processo que envolve a passagem do ovo pelo endotélio pode envolver interações com E-selectinas, Lewis-x, plaquetas, ICAM-1 e VCAM-1. **B** - Após a passagem dos ovos pelo endotélio do hospedeiro, eles precisam atravessar as camadas da parede intestinal. O sistema imunológico do hospedeiro responde à transição dos ovos através da resposta inflamatória granulomatosa, na qual os ovos são encapsulados por células imunológicas como macrófagos ativados alternativamente (AA), células Th2, eosinófilos e componentes de matriz extracelular (ECM), que protege os tecidos hospedeiros dos antígenos solúveis do ovo, mas ao final leva à formação de lesões fibróticas. Com o rompimento das junções de oclusão entre os enterócitos, a função da barreira intestinal é prejudicada, permitindo a maior permeabilidade de substâncias no lúmen como bactérias, antígenos, toxinas e metabólitos, bem como nos tecidos da mucosa e na circulação sistêmica.

Fonte: COSTAIN et al., 2018

A formação do granuloma está associada principalmente à proteção do hospedeiro contra substâncias agressoras como os antígenos solúveis liberados pelo ovo. Dessa forma, impedindo sua difusão para o meio vascular (WILLIAMS; WILLIAMS, 1983; LENZI et al., 1991; ANDRADE, 2009).

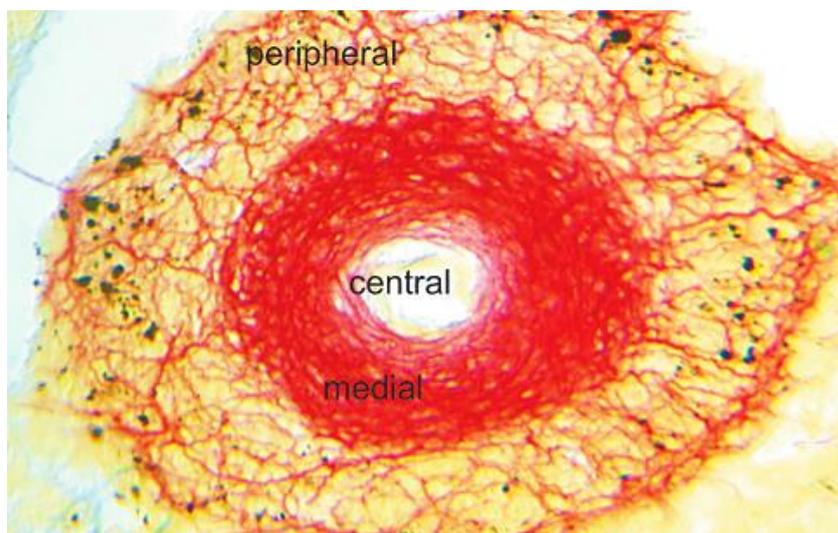
O granuloma esquistossomótico é uma coleção compacta, dinâmica e organizada de células migrantes, em sua maior parte componentes do sistema fagocitário mononuclear, que juntamente com as células do tecido afetado, dispõem-se em meio a componentes de matriz extracelular, formando uma estrutura com semelhança esférica que circunda o ovo (LENZI et al., 1991).

Adicionalmente, estudos *in vitro* revelaram que SEA induzem a proliferação de células endoteliais e regulam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a angiogênese (FATTAH; AHMED, 2011). A proliferação de células endoteliais também está associada à ativação de pericitos, células que apresentam actina e alta plasticidade e capacidade de se transformar em miofibroblastos, estas últimas são importantes células de matriz envolvida no remodelamento vascular (FREEDMAN; OTTESEN, 1988; LOEFFLER et al., 2002; BAPTISTA; ANDRADE, 2005).

Com base na classificação de Li-Hsu et al. (1972), Lenzi et al (1998) classificou a reação granulomatosa em dois estágios: pré-granulomatoso, (fase reativa inicial e fase exsudativa) e exsudativo (fase exsudativa-produtiva, fase produtiva e fase involutiva). A reação granulomatosa inicial caracteriza-se pelo acúmulo de células do sistema mononuclear fagocitário como macrófagos, leucócitos, neutrófilos e eosinófilos. Estes últimos, juntamente com linfócitos, se organizam ao redor do ovo levando a formação de um infiltrado celular, assim caracterizando a fase exsudativa. Nesta fase pode ocorrer presença de células gigantes ao redor do ovo, degeneração e necrose de leucócitos remanescentes.

Na fase exsudativa-produtiva, observa-se células migrantes, fibroblastos e miofibroblastos que começam a sintetizar componentes de matriz extracelular como: colágenos intersticiais I e III, fibronectina, laminina, tenascina, vitronectina e proteoglicanos. Nesta fase é possível verificar no granuloma três zonas diferentes: uma zona central com células de Kupffer, histiócitos, e células gigantes em alguns casos; uma zona medial ou paracentral, com fibroblastos e fibrócitos e uma zona periférica com plasmócitos, histiócitos e linfócitos com frequente eosinopoeise, neutropoeise e monocitopoeise (COSTA-SILVA et al., 2002; LENZI et al., 2006) (Figura 10).

Figura 10 - Granuloma esquistossomótico hepático e suas diferentes regiões.



Fonte: LENZI et al., 2006.

No fígado, células estreladas (HSCs), também chamadas de células de Ito, rica em gordura e vitamina A têm papel importante no estímulo de citocinas fibrogênicas. Elas são responsáveis pela produção de colágeno e pela fibrogênese no sítio granulomatoso (ANTHONY; RAMM; McMANUS, 2012). Acredita-se que as HSCs sejam a principal fonte de deposição de colágeno no fígado, com um papel importante no remodelamento da matriz extracelular na esquistossomose (BOOTH et al., 2004) e na fibrose induzida pelos antígenos do ovo. Ao final desta fase, com a morte do miracídio no interior do ovo, a quimiotaxia começa a cessar. As fibras de colágeno se aproximam uma das outras conferindo um grau de compactação, assim se caracterizando a fase produtiva. Essa fase é seguida da diminuição significativa da camada interna e desintegração total do ovo, segundo Lenzi et al. (1998), essa fase é denominada fase involutiva.

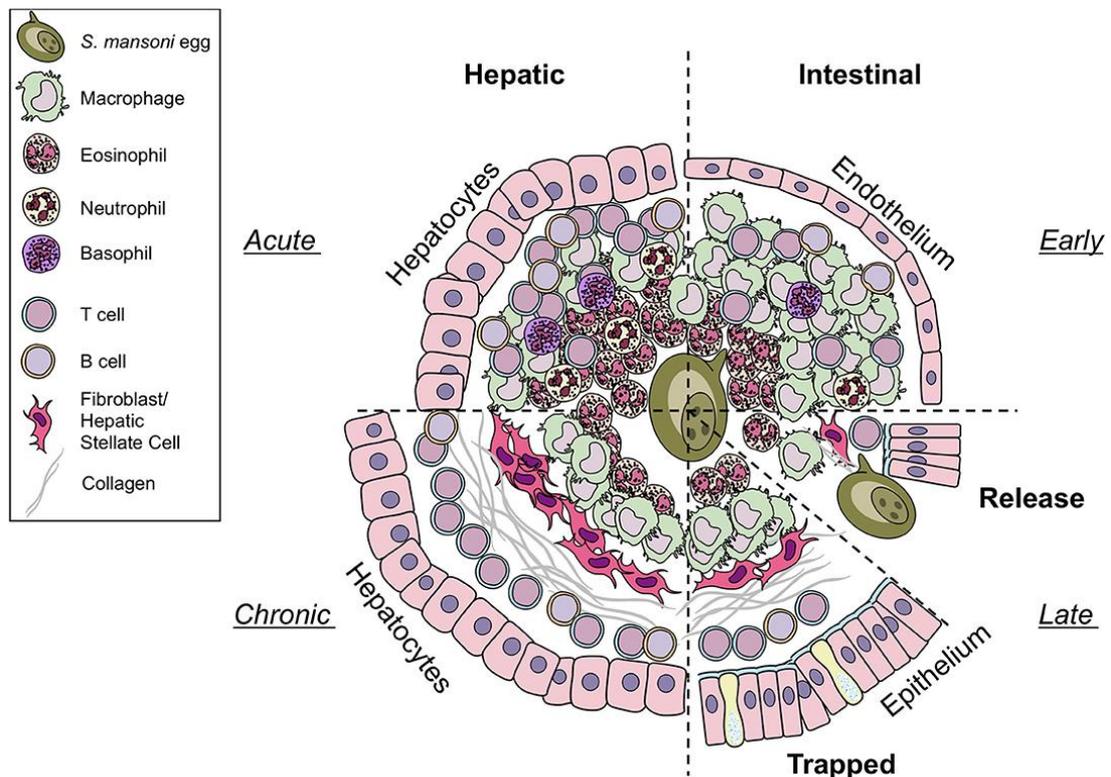
Em lesões agudas as alterações são passageiras, pois, as células lesionadas são substituídas por células regeneradas. A pouca matriz fibrosa produzida é degradada e o fígado restaura sua composição normal (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011).

No intestino os granulomas apresentam menos eosinófilos, células T e células B do que os granulomas hepáticos, entretanto há mais macrófagos. Apenas alguns neutrófilos e basófilos podem ser observados nos dois tecidos (Figura 11). Os ovos depositados no intestino podem ser liberados para o lúmen intestinal através de mecanismos que envolvem moléculas que rompem as junções de oclusão e a integração célula-célula. No entanto, os ovos, também podem ficar presos e se assemelhar a granulomas hepáticos de fase crônica com colágeno. As mucinas desempenham um papel funcional na migração dos ovos no intestino e

na modulação imunológica local, porém esse mecanismo precisa ser mais detalhado e explorado (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A resposta imune protetora do tipo 2 é caracterizada pela proliferação das células Th2, eosinófilos e basófilos, aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-13, IgG1 e IgE, bem como polarização de macrófagos em direção ao fenótipo M2 (PEARCE et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2014; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Durante a fase crônica da infecção (> 3 meses), a magnitude da resposta Th2 diminui, coincidindo com uma redução da inflamação granulomatosa ao redor dos ovos, e as células reguladoras T e B emergem, levando a um estado de hiporresponsividade imune.

Figura 11 - Composição do granuloma hepático e intestinal.



Fonte: SCHWARTZ; FALLON, 2018.

O uso de modelos experimentais animais tem facilitado o avanço no entendimento da imunopatologia da esquistossomose mansoni. Sabe-se que nas primeiras semanas de infecção (3-5), o sistema imune induz a ativação de uma resposta imune tipo 1, com o aumento de células Th1, liberação de interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ) (PEARCE; MACDONALD, 2002). A resposta imunológica do tipo 1 tem seus componentes diminuídos, enquanto concomitantemente emerge uma potente resposta imune tipo 2 após 5-6 semanas da

produção dos ovos (VELLA et al., 1992; ANDRADE, 2009). Os antígenos solúveis secretados pelo ovo estimulam uma resposta tipo 2 desencadeando uma expansão de células Th2, produção de IL-4, IL-5 e IL-13, acompanhada por uma regulação nos níveis de IgE e eosinófilos circulantes (HAMS et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A resposta granulomatosa aos ovos é primeiramente orquestrada por linfócitos T CD4⁺. Contudo, linfócitos TCD8⁺, linfócitos B e macrófagos M2 também têm demonstrado importante papel na regulação e formação do granuloma (FALLON et al., 1998; RUTITZKY, MIRKIN; STADECKER, 2003; HERBERT et al., 2004).

Muitos fatores podem influenciar na formação e modulação granulomatosa. Através de análises morfométricas, estudos confirmam que o processo de desenvolvimento do granuloma esquistossomótico hepático é influenciado pela cepa do parasito (COELHO et al., 1989), pela fase da doença (aguda ou crônica) (RASO et al., 1978, CHEEVER et al., 2002), pelo hospedeiro (COSTA-SILVA et al., 2002) e seu tipo de dieta (NEVES et al., 2007b, da SILVA FILOMENO et al., 2020). Alencar e colaboradores (2012) observaram alterações no granuloma intestinal e na morfologia do intestino delgado de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e esquistossomóticos.

O estado nutricional na esquistossomose mansoni

O estado nutricional do hospedeiro definitivo na esquistossomose mansoni tem sido relatados em muitas publicações (PARRAGA et al., 1996; CHEEVER et al., 2002; COUTINHO et al., 2003; COUTINHO, 2004; NEVES et al., 2007 a, b; 2009; da SILVA FILOMENO et al., 2020; da SILVA FILOMENO et al., 2022) e permite relacioná-lo ao desenvolvimento da patologia e suas complicações.

É visto experimentalmente que o estado nutricional pode contribuir para alterar o quadro da fibrose hepática periportal na esquistossomose (COUTINHO et al., 2003; 2007). Acredita-se que o fator desnutrição comprometa os mecanismos imunológicos do hospedeiro causando reações imunológicas deficientes, assim inibindo o desenvolvimento de fibrose em camundongos desnutridos (CHANDRA, 1991; MEIRA, 1995; COUTINHO et al., 2003; BARROS et al., 2009).

O metabolismo lipídico e as doenças causadas por helmintos tem sido temáticos de muitos estudos com modelos experimentais (BANSAL et al., 2005; GUIGAS; MOLOFSKY, 2015; da SILVA FILOMENO et al., 2020). Sabe-se que parasitos que habitam vasos sanguíneos, como *S. mansoni* incorporam lipídios, entre eles o colesterol, como nutriente do

hospedeiro porque não são capazes de sintetizar ácidos graxos de cadeia longa ou colesterol 'de novo' (MEYER; MEYER; BUEDING, 1970).

Estudos em modelos experimentais (NEVES et al., 2007a, b) e em humanos portadores de esquistossomose mansoni na forma hepatoesplênica demonstram a ocorrência de alterações no metabolismo lipídico associadas à patologia, na qual há diminuição nas concentrações plasmáticas de colesterol total, bem como nos níveis de fosfolípidios e triglicerídeos (DIMENSTEIN et al., 1992).

Os lipídios são componentes fundamentais na manutenção da infecção esquistossomótica no hospedeiro vertebrado, pois atuam na defesa do parasito à resposta imunológica do hospedeiro, no estímulo à oviposição do parasito e conseqüentemente no curso da infecção e nas alterações histopatológicas (MEYER; MEYER; BUEDING, 1970; WUHRER et al., 2000; NEVES et al., 2007b; GUIGAS; MOLOFSKY, 2015). Sabe-se que o colesterol e os ácidos graxos de cadeia longa são biomoléculas fundamentais para a manutenção da integridade do tegumento e da superfície da membrana que estabelece a interface entre o parasito e seu hospedeiro definitivo (MACGREGOR et al., 1989; ROGERS, 1991).

Doenças associadas às mudanças no padrão nutricional

Sabe-se que a maior disponibilidade de alimentos de alta densidade energética bem como hábitos de vida sedentários inseriu uma nova ameaça à sobrevivência do homem moderno: a obesidade e suas comorbidades (GRUNDY, 2008).

A obesidade é definida como adiposidade corporal excessiva acima dos níveis ideais para a saúde. Ela estabelece-se a partir de um balanço energético positivo crônico sob a influência de diversos fatores de origem social, comportamental e ambiental (SWINBURN et al., 2011).

O excessivo armazenamento de gordura na região abdominal encontra-se diretamente relacionado ao acúmulo ectópico de gordura em órgãos chave do metabolismo, tais como fígado e pâncreas. A resistência à insulina age em sinergismo com o excesso de tecido adiposo provocando a desregulação do eixo adipoinsular, predispondo ao desenvolvimento de outros distúrbios metabólicos, como a síndrome metabólica (SM), cuja prevalência é crescente em todo o mundo (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; DESPRES; LEMIEUX, 2006; TAKAHASHI et al., 2012; RIZZO et al., 2013; GOLABI et al., 2016).

A síndrome metabólica (SM) é definida como um grupo de anormalidades metabólicas onde incluem a obesidade, com ênfase no excesso de gordura abdominal, hipertensão arterial, dislipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica e resistência à insulina ou diabetes tipo 2 (ZIMMET et al., 2007; JOVICIC et al., 2015). Os critérios para o diagnóstico da síndrome metabólica estão resumidos com base em trabalhos da Organização Mundial da Saúde, da National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, European Group for the Study of Insulin Resistance e International Diabetes Foundation (HUANG, 2009)

A resistência à insulina parece ser a base fisiopatológica da SM e a hiperinsulinemia é considerada um precursor. O ganho de peso é um preditor independente para o desenvolvimento da SM, embora não seja observado em todos os indivíduos com obesidade (ZIMMET et al., 2007; RIZZO et al., 2013).

Outra doença associada à alteração ao perfil nutricional, no que diz respeito ao alto consumo de lipídios é a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD). A doença hepática gordurosa não alcoólica é a condição em que a gordura excessiva se acumula no paciente sem histórico de abuso de álcool (MARCHESINI et al., 2003; ABDELMALEK; DIEHL, 2007). Ela vem sendo indicada como o componente hepático da SM e de demais distúrbios lipídicos e é apontada como a principal causa de doenças hepáticas crônicas em países desenvolvidos.

Modelo experimental murino na esquistossomose e dislipidemias

A comunidade científica tem buscado modelos experimentais que mimetizem o fenótipo humano e sejam adequados para o conhecimento de patologias, drogas e afins (GADJA et al., 2007). Nesse sentido, uma variedade de modelos murinos tem sido usado em estudos sobre obesidade e dislipidemias. No que diz respeito ao modelo experimental, o C57BL/6 tem sido comumente apresentado como um dos que melhor desenvolve distúrbios metabólicos como dislipidemias (STEWART et al., 2002; JOVICIC et al., 2015).

A interação entre lipídeos e esquistossomose mansoni em modelos experimentais já foram verificados por LIMA et al., 1998; RAMOS et al., 2004; NEVES et al., 2007a, b; 2006; ALENCAR 2009; ALENCAR et al., 2012; da SILVA FILOMENO et al., 2020. Reduções nos níveis séricos de colesterol em camundongos esquistossomóticos submetidos à dieta hiperlipídica também foram observadas por ALENCAR et al., (2009), (ALENCAR et al. 2012) e NEVES et al. (2006; 2007b,).

Camundongos da linhagem C57BL/6 representam um bom modelo para dislipidemias e síndrome metabólica, podendo desenvolver hiperglicemia de leve a moderada e

hiperinsulinemia. Cada linhagem de camundongo desenvolve uma patologia de intensidade específica, por exemplo, no caso da esquistossomose, o C57BL/6 desenvolve pouca patologia, enquanto modelos como CBA e C3H podem desenvolver uma patologia mais intensa para a doença (RUTITZKY, MIRKIN; STADECKER, 2003). Entretanto, estes últimos não são modelos de excelência quando objetiva estudar obesidade, dislipidemias e síndrome metabólica.

Intestino e a microbiota

O intestino é um importante órgão do sistema digestório que permite a quebra e a absorção de nutrientes fundamentais ao corpo, bem como a eliminação dos componentes indesejáveis (COLLINS; BADIREDDY, 2019). Para Madi, Zalrman e Takiya (2001) “O intestino não é simplesmente um tubo onde os alimentos entram e o que é soluto absorvido e o sólido eliminado. Ele é a nossa mais profunda vinculação com o meio ambiente. Dessa intimidade decorre nossa própria sobrevivência.” (MADI, ZALRMAN; TAKIYA, cap. 2, pág. 11). Sua mucosa está adaptada a colonização por bactérias comensais que desempenham diversos papéis nos processos digestivos e influenciam de forma decisiva no desenvolvimento e função do sistema imunológico intestinal, na resposta a fármacos e na homeostase do indivíduo (RESCIGNO, 2011; CARICILLI; CASTOLDI; CÁMARA, 2014).

O intestino apresenta uma camada de células epiteliais voltada para o lúmen capaz de proteger o corpo contra micro-organismos e antígenos provenientes da alimentação (Figura 12). Sua estrutura inclui vilosidades digitiformes, onde residem os enterócitos absorptivos, células secretoras enteroendócrinas e células caliciformes, e criptas, contendo células proliferativas, que são as células-tronco intestinais e células de Paneth (ANTFOLK; JENSEN, 2020).

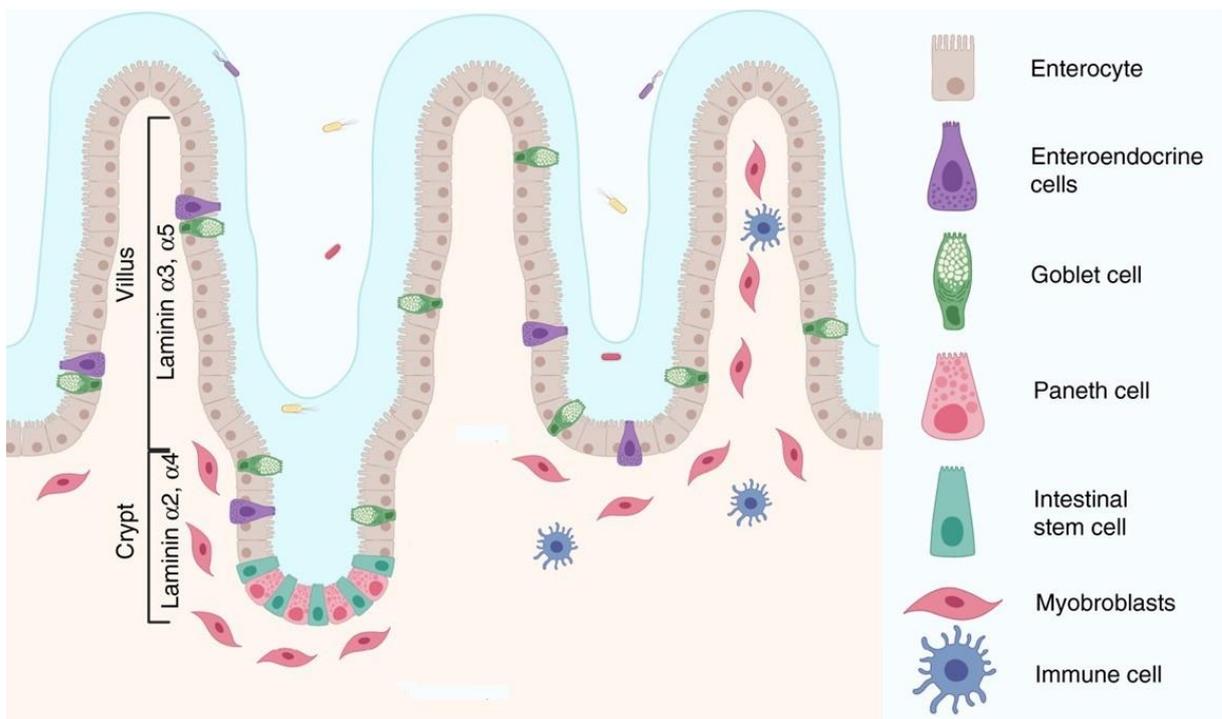
O intestino delgado começa no piloro e termina na válvula ileocecal e compreende três partes: duodeno, jejuno e íleo que juntos apresentam comprimento médio de $690,1 \pm 93,7$ cm, formando o órgão mais longo do corpo (TACCHINO, 2015).

Para facilitar a absorção de nutrientes, o intestino delgado evoluiu desenvolvendo modificações arquitetônicas refinadas da camada mucosa e submucosa de modo a aumentar a sua superfície de absorção de nutrientes através de suas dobras *plicae circularis*, em torno do lúmen, vilosidades e microvilosidades, estes últimos vão diminuindo em quantidade e espessura em direção ao íleo (DELBAERE et al, 2023). Segundo Van Der Flier e Clevers (2009), 80% do epitélio intestinal é formado por enterócitos que apresenta borda em escova

contendo proteínas transportados e enzimas digestivas. Além disso, essas células participam da formação de barreiras bioquímicas, de modo a evitar a difusão de patógenos, alérgenos e toxinas do lúmen intestinal para a mucosa. A presença de células calciformes no intestino confere a produção de uma importante barreira química: o muco, constituído por mucinas, fornece proteção, hidratação e lubrificação aos tecidos epiteliais. Somado a isso, Liévin-Le Moal e Servin (2006) reforçam que as mucinas oferecem também suporte nutricional para as bactérias aderentes à superfície, de modo a promover sua colonização na parte externa da camada mucosa.

A arquitetura do intestino delgado está evolutivamente adaptada à dinâmica e atividade ambiental que ocorre neste tecido. Invaginações da base das vilosidades até a lâmina própria são chamadas de criptas de Lieberkühn atuam como glândulas que secretam agentes antimicrobianos e hormônios com o auxílio de células secretoras altamente especializadas, as células de Paneth. Nelas há presença de grânulos eosinofílicos composto por peptídeos antimicrobianos e proteínas imunomoduladoras capaz de regular a composição e abundância da microbiota intestinal e proteger contra patógenos (LUESCHOW; MCELROY, 2020).

Figura 12 - Estrutura do intestino delgado



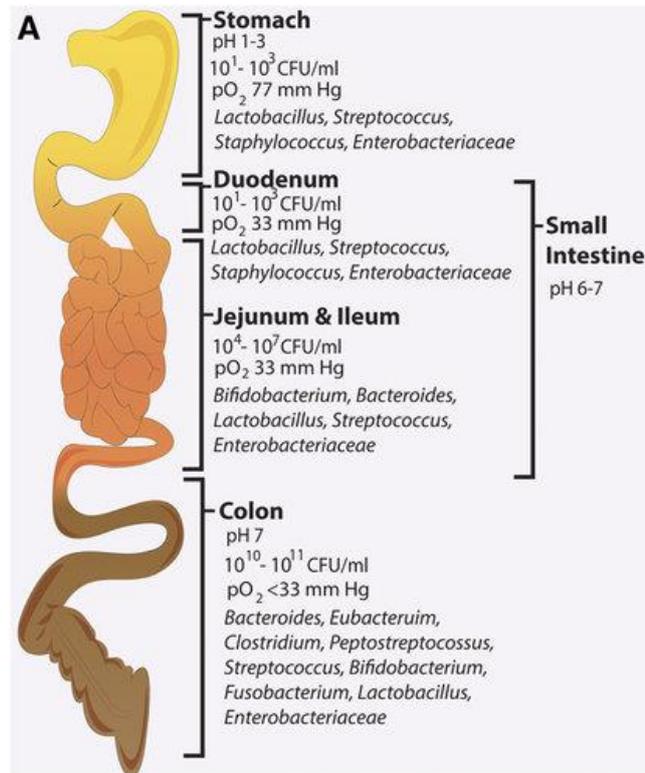
Fonte: ANTFOLK; JENSEN, 2020. Adaptado.

O complexo ecossistema de microrganismos, como bactérias comensais residentes no intestino, chamamos microbiota intestinal (MI). Em humanos, ela consiste em cerca de 10 – 100 trilhões de microrganismos. Esse número supera o total de células somáticas e germinativas humanas significativamente (JILL; ARTIS, 2010). Segundo Rajilić-Stojanović e De Vos (2014) há um total de 1057 espécies de microrganismos intestinais descritas pertencentes aos domínios Eukarya (92), Archaea (8) e Bacteria (957). Neste último domínio, os filos Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria são os microrganismos mais diversos e abundantes no trato gastrointestinal adulto (LEY et al., 2005; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; DE VOS, 2014; YANG et al., 2017, LIM et al., 2020).

A organização espacial e a localização da microbiota intestinal ao longo do tratogastrointestinal não são uniformes. A maior densidade de bactérias está presente no intestino grosso, com estimativas recentes de 10^{13} bactérias. As pressões parciais de oxigênio ao longo do trato gastrointestinal contribuem para formação de nichos distintos (CLARKE et al., 2019).

A distribuição de microrganismos varia ao longo do trato gastrointestinal e é determinada pelo pH, disponibilidade de oxigênio e nutrientes, tipo de enzimas secretadas, entre outras. A concentração de bactérias no estômago é relativamente baixa, cerca de 10 UFC/g, enquanto na região do íleo são 10^7 UFC/g e no cólon 10^{12} UFC/g (RINNINELLA et al., 2019).

Figura 13 – Microbioma intestinal, nichos de bactérias.



Fonte: CLARKE et al., 2019.

Na região proximal do trato gastrointestinal os grupos bacterianos dominantes são *Lactobacillus* (Firmicutes), *Veillonella* (Firmicutes) e *Helicobacter* (Proteobacteria). Na porção do duodeno, jejuno e íleo, os grupos mais numerosos são *Bacilli* (Firmicutes), *Streptococcaceae* (Firmicutes) e *Actinomycinaeae*, e no cólon, é observado um número maior de *Lachnospiraceae* (Firmicutes) e *Bacteroidetes* (DIETERICH et al., 2018; MOSZAL et al., 2020).

A microbiota intestinal coevoluiu com os humanos, provocando efeitos profundos em vários processos fisiológicos, como na produção de vitaminas, no metabolismo de nutrientes e na imunidade do hospedeiro (CRYAN; DINAN, 2012; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, 2013). Nohr e colaboradores (2013) viram que em dietas ricas em fibras, cujo hospedeiro humano não consegue digerir, são metabolizadas pela microbiota intestinal em ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como butirato, acetato e propionato.

A MI também produz moléculas de sinalização farmacologicamente ativas que interagem com o metabolismo do hospedeiro (BIBBÒ et al., 2016; BOULANGÉ et al., 2016; ISOLAURI, 2017). Ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) são produzidos na fermentação de fibras alimentares por bactérias intestinais.

A microbiota também está envolvida na patogênese de diversas doenças, tais como síndrome metabólica, doenças cardiovasculares, doença celíaca, doença inflamatória intestinal e distúrbios neurológicos. São múltiplos os fatores que podem compor a microbiota modulá-la, entretanto, um dos principais fatores pode auxiliar nessa modulação é a dieta (MOSZAL et al., 2020).

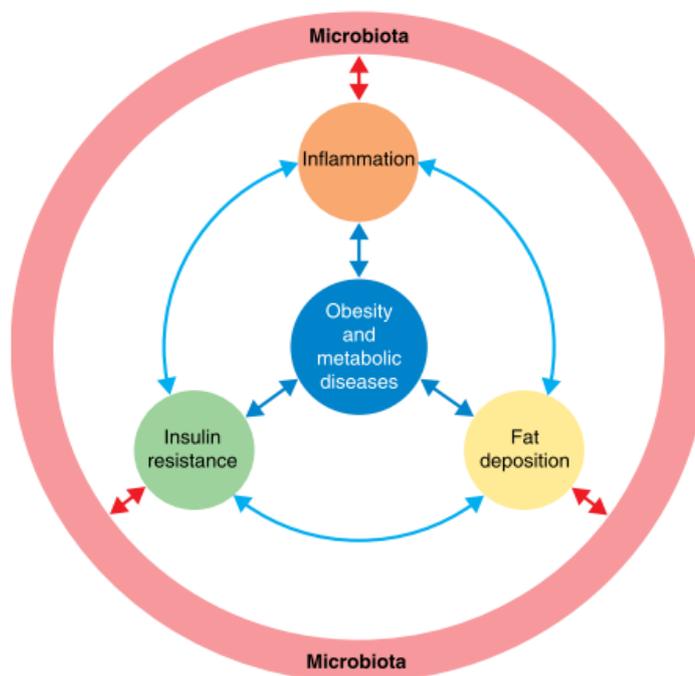
A relação entre microbiota e a síndrome metabólica

A microbiota intestinal (MI) tem tido papel relevante na obesidade e na síndrome metabólica (SM). Sua interação com os receptores acoplados à proteína G (GPCR) afeta a sensibilidade à insulina em adipócitos e órgãos periféricos, regulando assim o metabolismo energético (BACKHED et al., 2004; BOULANGÉ et al., 2016). Sabe-se que alterações na microbiota intestinal, conhecidas como disbiose, exercem efeitos prejudiciais à saúde do hospedeiro, influenciando bastante as vias metabólicas e a suscetibilidade a doenças crônicas não transmissíveis (LIM et al., 2017, GILBERT et al., 2018; SANTOS-MARCOS et al., 2019; FLOUDAS et al., 2019).

Estudos tem demonstrado que a alteração na microbiota intestinal pode estar relacionada ao desenvolvimento de obesidade e diabetes. Em modelos murinos C57BL/6 *germ-free* alimentados com dieta rica em gordura observa-se proteção contra a intolerância à glicose devido à expressão reprimida do fator adiposo induzido pelo jejum (FIAF) no epitélio intestinal. Este fator ativa a quebra do triacilglicerol contido em lipoproteínas em ácidos graxos livres para serem usados pelos tecidos musculares e adiposos. A inibição de FIAF promove a deposição de triglicerídeos nos adipócitos (BACKHED et al., 2004; BÄCKHED et al., 2007; SAMUEL et al.; 2008 YANG et al., 2017). Resultados como este sugerem um papel crucial da MI na homeostase de nutrientes e um possível papel etiológico no desenvolvimento da síndrome metabólica.

Muitos fatores podem contribuir para a composição e alteração da microbiota intestinal, de modo a promover o desenvolvimento de doenças metabólicas. É visto que a MI também pode somar ao desenvolvimento da resistência à insulina, da inflamação de baixo grau e do aumento da adiposidade através de uma série moléculas e, portanto, pode participar indiretamente no aparecimento de obesidade e doenças metabólicas (BOULANGÉ et al., 2016; MARCHESI et al., 2016) (Figura 14).

Figura 14 – A inter-relação entre microbiota intestinal, inflamação, resistência à insulina, adiposidade e doenças metabólicas.



Fonte: BOULANGE et al., 2016.

A influência da composição da microbiota intestinal em doenças metabólicas foi evidenciada no estudo de Turnbaugh et al (2005) onde revelou que a microbiota intestinal de camundongos e humanos com obesidade, quando comparados aos grupos eutróficos, está associada à maior abundância de bactérias dos filos Bacteroidetes e os Firmicutes nos grupos com obesidade e este microbioma tem maior capacidade de captar energia e aumentar o depósito de gordura no hospedeiro.

Em um estudo experimental, Caesar et al (2015) comparou a microbiota intestinal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica à base de banha ou óleo de peixe por 11 semanas e verificou maior diversidade de *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Nos animais que consumiram óleo de peixe e nos consumiram banha de porco, observaram aumento da inflamação no tecido adiposo branco decorrente da ativação do receptor Toll-like 4 (TRL-4).

Um dos mecanismos realizados pelas bactérias intestinais na regulação do metabolismo energético é a desregulação da expressão intestinal do fator adiposo induzido pelo jejum (FIAF), que inibindo a lipase da lipoproteína nos tecidos adiposos promove o depósito de gorduras (BACKHED et al., 2004; BOULANGÉ et al., 2016).

Em um estudo apresentado por Musso e colaboradores (2011) revelou que também ocorre maior absorção de calorias em virtude de a microbiota intestinal ter um papel no desenvolvimento do epitélio intestinal, assim, aumentando a densidade dos capilares das vilosidades do intestino delgado e influenciando a fisiologia e a motilidade intestinal.

O papel da microbiota é fundamental para o metabolismo lipídico no intestino visto que uma fração de sais biliares é submetida a modificações químicas pela microbiota intestinal, gerando ácidos biliares secundários. Os lipídios sofrem emulsão pela bile para facilitar a sua solubilização e serem absorvidos pelo intestino. A microbiota é capaz de desconjugar e destruir sais biliares por meio da hidrolase bacteriana, e regular o hormônio colecistocinina (CCK), crucial para a digestão de lipídeos (MARTINEZ-GURYN et al., 2018).

Sabe-se que fatores externos como dieta, estresse, idade, genética, histórico de doenças, ingestão de drogas e ciclos circadianos afetam a composição microbiana do intestino e a eficácia das funções microbianas em roedores e humanos por mecanismos complexos (YATSUNENKO et al., 2012; BOULANGÉ et al., 2016). Nos últimos anos estudos tem se atentado a investigar um outro fator: infecções parasitárias e suas implicações na constituição da microbiota intestinal e na homeostase do hospedeiro (HOLZSCHEITER et al., 2014; JENKINS et al., 2018).

A microbiota na infecção por *Schistosoma mansoni*

A capacidade dos parasitos alterar comunidades microbianas levando mudanças nos processos inflamatórios e metabólicos é relatada em muitos trabalhos, entretanto, como esses processos ocorrem e os mecanismos envolvidos ainda são pouco discutidos (GLENDINNING et al., 2014; HOLZSCHEITER et al., 2014; CORTÉS et al., 2018; JENKINS et al., 2018).

Sabe-se que em infecções esquistossomóticas a microbiota pode ser alterada (JENKINS et al., 2018). Estudos recentes têm sustentado o papel da MI de mamíferos na esquistossomose hepato-intestinal e abrem caminhos para compreender as complexas relações entre helmintos, microbiota intestinal, imunidade do hospedeiro e a fisiopatologia da infecção nas fases aguda e crônica (HOLZSCHEITER et al., 2014; JENKINS et al., 2018).

Zaiss e Harris (2016) destacam que certas espécies de bactérias podem ser determinantes na infecção por helmintos em humanos e camundongos. No caso da esquistossomose mansoni, os ovos de *S. mansoni* são liberados por vermes fêmeas e

atravessam a parede intestinal desencadeando um processo inflamatório, e potencialmente alterando as respostas imunológicas (BHATTACHARJEE et al., 2017).

Apesar da constante translocação dos ovos da vasculatura para o lúmen intestinal, os casos de sepse associada a *S. mansoni* são raros, reforçando o processo altamente adaptado de excreção de ovos (ONGURU et al., 2011).

Em camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni*, o uso de antibióticos resultou significativamente na redução do tamanho do granuloma intestinal (WANG et al., 2004; HOLZSCHEITER et al., 2014b). Vários metabólitos associados ao trato urinário e à microbiota são alterados no hospedeiro após a infecção com *S. mansoni*. Análises de metabólitos excretados na urina foram associadas a mudanças na microbiota intestinal e no metabolismo energético dos hospedeiros (BALOG et al., 2011).

Animais infectados por *S. mansoni* têm apresentado uma redução geral na diversidade na alfa microbiana intestinal e aumento na diversidade beta com significativo aumento de *Akkermansia muciniphila* (filo Verrucomicrobia) e lactobacilos quando comparados a animais controle não infectados (JENKINS et al., 2018a). Desta forma, sugerindo e reforçando o papel da microbiota intestinal de mamíferos na patogênese da esquistossomose hepato-intestinal servindo como base para a compreensão da complexa inter-relação helmintos microbiota intestinal e fisiopatologia da esquistossomose.

O distúrbio decorrente do desequilíbrio entre a microbiota residente e patógenos nocivos, presentes no intestino, interfere nas funções de digestão e de absorção intestinal dos alimentos com manifestações clínicas variadas (ALMEIDA et al., 2009; FRANK et al., 2011).

1 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o perfil nutricional da população ocidental mudou nas últimas décadas. Esta mudança tem influência significativa na patogenia e nas manifestações clínicas de muitas morbidades, como a esquistossomose mansoni. É visto na literatura que a microbiota intestinal, entre componentes ambientais e comportamentais, tem um papel na ocorrência de obesidade e outros distúrbios metabólicos. Somado a isso, trabalhos mais recentes mostram uma relação entre o grau inflamatório das lesões hepáticas, esplênicas e intestinais na infecção por *S. mansoni* na fase crônica e como algumas bactérias podem influenciar na patogenia em situações de coinfeções. Neste contexto, buscamos investigar a associação parasitológica da esquistossomose mansoni na fase aguda em camundongos com síndrome metabólica e o papel da microbiota intestinal de forma a assumir significativa relevância e base para investigações dessas comorbidades em populações humanas afetadas para estudos posteriores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

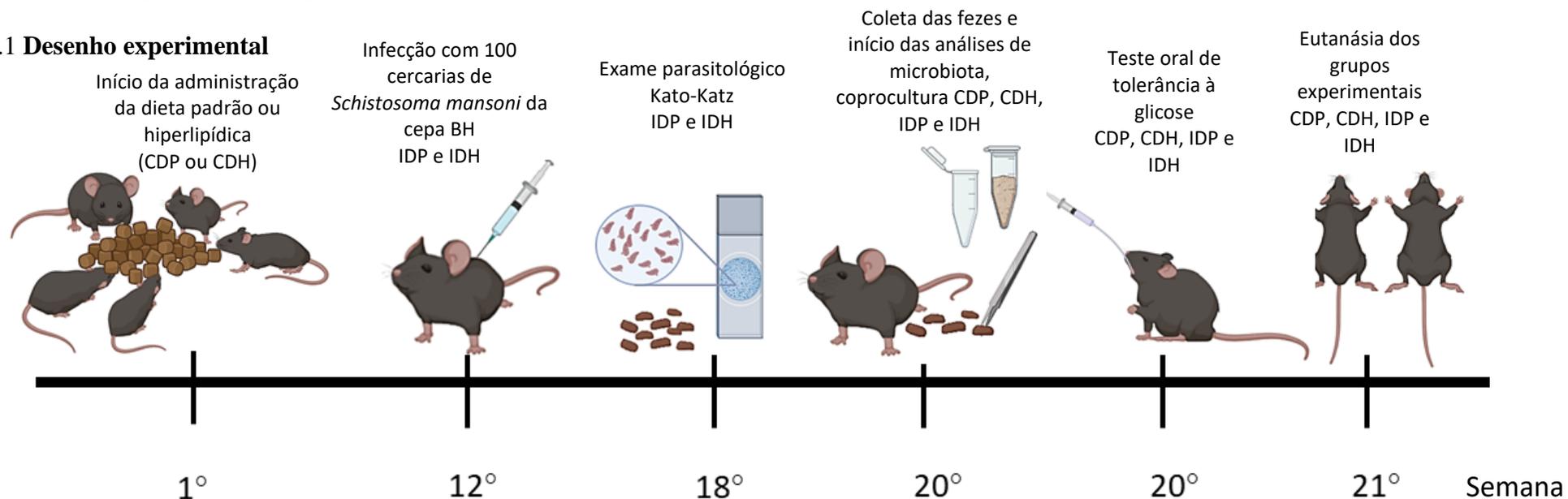
Caracterizar e detalhar a associação entre a esquistossomose mansoni na fase aguda, a síndrome metabólica e a microbiota intestinal de camundongos C57BL/6.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar se os animais apresentam diferenças nos parâmetros bioquímicos sanguíneos (colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos);
- b) Verificar se o tipo de dieta altera a massa corporal e a gordura visceral entre animais infectados e controles;
- c) Verificar se há relação entre parâmetros bioquímicos e a composição da microbiota;
- d) Caracterizar a formação do granuloma intestinal;
- e) Verificar se o tipo de dieta (hiperlipídica e padrão) interfere na composição da microbiota intestinal;
- f) Verificar se há diferenças entre a composição da microbiota intestinal entre animais infectados e controles;
- g) Verificar se há relação entre distribuição de ovos e a composição da microbiota por segmento intestinal;
- h) Analisar se a infecção promove a invasão bacteriana na submucosa intestinal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental



LEGENDA

- CDP – Animal não infectado alimentado com dieta padrão
- CDH - Animal não infectado alimentado com dieta hiperlipídica
- IDP - Animal infectado alimentado com dieta padrão
- IDH - Animal infectado alimentado com dieta hiperlipídica

Fonte: O autor, 2023.

ANÁLISES PÓS EUTANÁSIA

- Lavado peritoneal
- Biometria
- Bioquímica
- Morfologia
- Histologia
- Parasitológica

3.2 Modelo experimental

Com 3 semanas de idade, camundongos isogênicos machos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6, que representam bons modelos em estudos sobre distúrbios metabólicos, foram mantidos em caixas de polipropileno (40cm x 33cm) no Biotério da Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C), umidade ($60 \pm 10\%$), exposição a ciclos de luz artificial e escuro (12h:12h), exaustor para circulação do ar e livre acesso à comida e água. Os animais foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UERJ) sob a licença nº CEUA/063/2018.

3.3 Dieta

Os camundongos foram desmamados com 3 semanas de idade e alimentados com ração padronizada para roedores (Dieta Padrão - DP, 10% de gordura, 14% de proteína, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil) ou hiperlipídica (Dieta Hiperlipídica - DH, 60% de gordura, PragSoluções, Jaú, SP, Brasil). Os animais foram mantidos nessas dietas durante todo o período de experimento, isto é, até a 21ª semana. O conteúdo energético da dieta controle foi de 3,81 kcal/g, e da dieta hiperlipídica de 5,0 kcal/g. A composição da dieta está resumida na Tabela 1. O conteúdo de vitaminas e minerais seguiu as recomendações do Instituto Americano de Nutrição, AIN 93M (REEVES et al., 1993).

Tabela 1 – Composição da dieta experimental.

Conteúdo (g/kg)	Grupos	
	DP	DH
Caseína	140,0	190,0
L-cisteína	1,8	1,8
Amido de milho	620,7	250,69
Sacarose	100,0	100,0
Fibras	50,0	50,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Banha de porco	--	320,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,008	0,008
Proteína (%)	14	14
Lipídios (%) Kcal	10	60

Legenda : DP – dieta padrão, DH - dieta hiperlipídica.

Fonte : Adaptado de REEVES et al., 1993.

3.4 Grupos experimentais e infecção

Com 12 semanas de administração da dieta foram formados os seguintes grupos experimentais: Controle Dieta Padrão (CDP, n=8), Controle Dieta Hiperlipídica (CDH, n=8), Infectado Dieta Padrão (IDP, n=8) e Infectado Dieta Hiperlipídica (IDH, n=8). Nesta semana, os camundongos dos grupos IDP e IDH foram infectados com aproximadamente 100 cercarias de *Schistosoma mansoni* da cepa BH (Belo Horizonte), obtida no Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rio de Janeiro) (NEVES et al., 2007a). A infecção experimental foi realizada por via subcutânea. Após 42 dias de infecção, fase aguda, todos os animais foram submetidos a exame parasitológico (KATZ et al., 1972) para comprovar a eficácia da infecção experimental.

3.5 Coprocultura - Isolamento da microbiota intestinal

Caracterizamos a microbiota intestinal a partir de amostras de fezes coletadas de camundongos dos grupos CDP, CDH, IDP e IDH no início da nona semana de infecção por *S. mansoni*. Os animais foram colocados individualmente em caixas de polipropileno higienizadas com álcool absoluto. Em poucos minutos foram coletadas as fezes, com auxílio

de pinças esterilizadas individualmente para cada animal, e colocadas em microtubos previamente identificados e pesados. Após a coleta das fezes, os microtubos foram novamente pesados para o ajuste do peso das fezes. Foi então estabelecido 150mg de fezes para cada microtubo. As amostras foram encaminhadas para a capela de fluxo laminar onde foram adicionados 1,5mL de PBS em cada microtubo. Posteriormente, o material foi homogeneizado mecanicamente com um vórtex (Fisher Vortex Genie 2™) e submetido a repouso por 10 minutos para a sedimentação espontânea do material. Coletamos 300µL do sobrenadante de cada microtubo e dividimos em três amostra de 100 µL que foram empregadas nas diluições seriadas em cada um dos meios de cultura utilizados. As amostras foram cultivadas em placas contendo os meios CLED (Cystine Lactose Electrolyte Deficient, CLED, Kasvi, Brasil), usado para diferenciação de bactérias fermentadoras e não fermentadoras de lactose, sabe-se que a cistina favorece o crescimento de coliformes; Ágar MacConkey (Kasvi, Brasil), para o crescimento de bactérias Gram negativas, assim como para indicar a fermentação de lactose; e Ágar Eosina Azul Metileno (EMB, Kasvi, Brasil), meio seletivo e diferencial empregado no isolamento de bactérias Gram negativas.

Placas de 96 poços foram divididas em 3 áreas de acordo com o meio de cultura. Foi realizada diluição de 10^{-2} , sendo 80 µL de PBS e 20 µL da amostra, sendo assim, 100 µL da diluição foram semeados nas placas no meio de cultura empregado através da técnica de Spread Plate (SANDERS, 2012) e colocadas em estufa bacteriológica ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$) por um período de 24 a 32 h até obter uma densidade celular superior a 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC).

As colônias diferenciadas foram selecionadas coletadas com auxílio de alça bacteriológica e semeadas. As células bacterianas foram armazenadas a -80°C em meio LB (LB, Merck, S.A.) com 20% de glicerol antes de serem analisadas. Em seguida, as colônias selecionadas foram coletadas com auxílio de alça bacteriológica e semeadas em meio Ágar Nutriente (Kasvi, Brasil) e alocados em estufa bacteriológica ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$) por 24 horas para o crescimento microbiano. No dia seguinte, os isolados do material foram identificados usando espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS, Bruker, Bremen, Germany) (PROD'HOM et al., 2010) no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (IMMPPG, UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. Para a interpretação dos resultados levamos em consideração as recomendações da Bruker, o nível de semelhança entre uma amostra desconhecida testada e uma amostra de referência é indicado por um log(score), na qual um score $> 2,3$ indica uma "identificação altamente provável da espécie", score entre 2 e 2,299 indica uma "identificação

segura do gênero, identificação provável da espécie", score entre 1,7 e 1,999 indica uma "identificação provável do gênero" e score < 1,7 indica uma "identificação não confiável".

3.6 Análises bioquímicas e eutanásia

A glicemia e o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) dos animais foram medidos após jejum de 6h uma semana antes do sacrifício (DA SILVA FILOMENO et al., 2020). As concentrações de glicose no sangue foram medidas aos 0, 15, 30, 60 e 120 min após gavagem oral de glicose (1g/kg), usando um glicosímetro (Accu-Chek, Roche Diagnostic, Alemanha) e, em seguida, a área sob a curva (AUC) foi determinada pela regra do trapézio para avaliar a intolerância à glicose (GALLOU-KABANI et al., 2007). Os camundongos foram eutanasiados por asfixia com CO₂ na nona semana de infecção (fase aguda). As amostras de sangue foram obtidas rapidamente por punção cardíaca e centrifugadas (1200 g por 20 min) à temperatura ambiente e armazenadas a -20 °C. O colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e HDL-C foram avaliados por um ensaio cinético colorimétrico (Bioclin 100, Quibasa Química Básica, Belo Horizonte, MG, Brasil). O LDL-C e o VLDL-C foram estimados com a fórmula de Friedewald (FRIEDEWALD et al., 1972).

3.7 Atividade dos macrófagos peritoneais residentes

Cada camundongo foi injetado com 5 mL de meio RPMI (Sigma-Aldrich) na cavidade peritoneal (MIRANDA et al., 2013). O líquido de lavagem peritoneal foi coletado. Macrófagos peritoneais residentes foram semeados em meio RPMI a 2×10^6 /mL (0,4 mL/poço) em uma placa de 24 poços e incubados a 37 °C em CO₂ a 5% por 24h. O sobrenadante foi transferido para tubos de micro centrífuga e congelado a -80 °C até o uso. As análises de citocinas foram realizadas usando o Cytometric Bead Array (CBA), Mouse Inflammation Kit para medir quantitativamente a Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) em uma única amostra (BD BioScience, San Jose, CA, EUA). Realizamos a análise citométrica de fluxo utilizando um citômetro de fluxo FACS Canto II com os dados analisados no programa FCAP Array (BD BioScience, San Jose, CA, EUA).

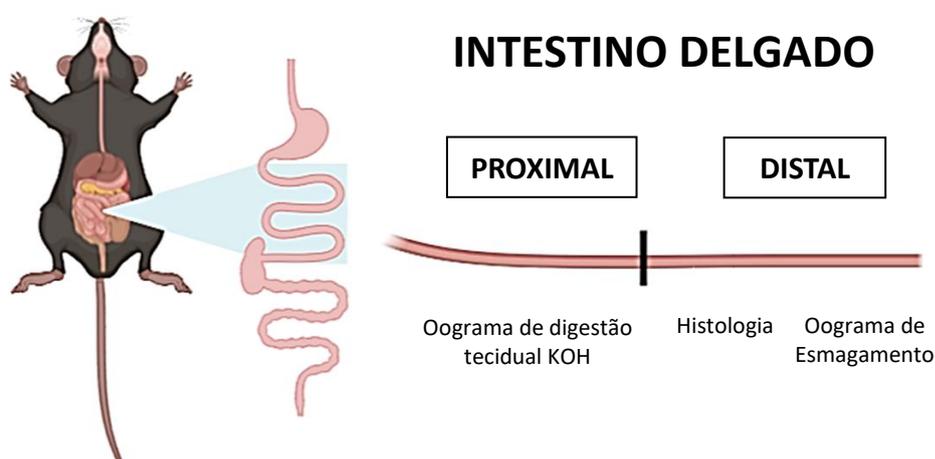
3.8 Análises biométricas

A massa corporal (MC) de todos os grupos foi avaliada semanalmente em balança de precisão (Ohaus Corporation, USA) durante todo o período de indução à dieta, no mesmo horário (quarta-feira, 16h) pelo mesmo observador. O índice de adiposidade foi determinado pela seguinte fórmula: índice de adiposidade = (gordura corporal/massa corporal × 100) (BERNARDIS E PATTERSON; NOVELI et al., 2007), onde a gordura corporal foi calculada através da soma do peso dos depósitos de gordura epididimal, gordura retroperitoneal, gordura visceral (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2012).

3.9 Quantificação de ovos no tecido - Oograma

O intestino delgado foi retirado, medido e dividido em duas seções iguais (proximal e distal) (Figura 15). A região proximal foi digerida em hidróxido de potássio (KOH) a 4% a 56°C (CHEEVER, 1968) e centrifugada (2000g por 5min). Foram colocadas em lâmina histológica cinco alíquotas de 50 µl do tecido digerido, cobriu-se com lamínula (24mm x 40mm) e os ovos visualizados por microscopia de luz (microscópio Olympus BX41, Melville, NY, EUA, equipado com câmera digital BEL Photonics, Piracicaba, SP, Brasil) foram contados (MARTINEZ et al., 2003). O primeiro centímetro da região distal, segmento do jejuno, foi separado e fixado para histologia e o centímetro seguinte foi seccionado e esmagado entre duas lâminas de vidro e analisados por microscopia de luz convencional, a fim de classificar o estágio de desenvolvimento da maturação do ovo de *S. mansoni* (MACHADO SILVA et al., 1991).

Figura 15 – Protocolo experimental dos intestinos.



3.10 Histologia e morfometria

O primeiro centímetro da região distal do intestino delgado, jejuno, foi retirado, fixado em formalina tamponada e processado para análise histopatológica, seguindo a rotina do grupo de pesquisa (Quadro 1). O tecido desidratado em série alcoólica, diafanizado em xilol e incluído em parafina, foi cortado em micrótomo (Leica, modelo RM2125RTS), onde obtivemos secções de 5µm de espessura, e corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina e Eosina (HE) (Quadro 2 e 3). Aspectos morfológicos e histopatológicos do tecido entérico foram observados no microscópio de luz (Olympus BX53, câmera Olympus SN 4M04717, U-TV0.35XC-2, Tokyo, Japan, Software: Olympus CellSens Entry, versão 1.18) onde foram levados em consideração possíveis alterações no parênquima intestinal dos grupos envolvidos na pesquisa. Foram selecionadas aleatoriamente dez vilosidades para que fossem medidas sua altura, espessura da camada mucosa, camada submucosa e muscular da mucosa. A altura das vilosidades foi medida desde o topo das vilosidades do epitélio até a junção com a cripta (Figura 16).

Quadro 1 – Etapas da preparação histológica.

ETAPAS	FINALIDADE	TEMPO
1. Fixação: Solução formol-Millonig tamponado	Preservar a morfologia e composição química dos tecidos.	Mínimo de 48 horas
2. Desidratação: Série alcoólica (4x) em etanol absoluto (100%)	Remover água dos tecidos	15 minutos em cada série
3. Diafanização: Xilol, iniciando por uma mistura de etanol absoluto + xilol 1:1, seguidos de dois banhos de xilol puro.	Embeber o material em xilol, substância miscível com parafina. Esta etapa clarifica levemente o tecido.	15 minutos em cada série
4. Impregnação: Parafina líquida derretida em estufa a 58°C.	Possibilitar a obtenção de cortes finos visto que a parafina penetra os espaços intercelulares e depois de solidificada da rigidez ao tecido.	2 séries de 30 minutos.
5. Inclusão: O material foi incluído em um molde contendo parafina e deixado fora da estufa para que se solidificasse.	Obter bloco de parafina com o material incluído para permitir os cortes histológicos.	Tempo necessário para que a parafina se solidificasse. Depende da temperatura ambiente.
6. Microtomia: Cortes realizados em micrótomo.	Obter cortes seriados de 5µm de espessura.	Etapa sem duração pré-determinada

7. Coloração: Realizada em 3 etapas - (i) eliminação da parafina; (ii) desidratação em álcool e (ii) coloração desejada.	Dar contraste aos componentes teciduais.	Tempo variável dependendo do tipo de coloração desejada.
8. Desidratação	Retirar água do tecido para permitir a difusão do corante e a perfeita visualização do tecido.	Tempo variável
9. Diafanização: Após a coloração	Tornar os cortes transparentes	Cerca de 5 minutos para cada série
10. Montagem.	Manter o material de estudo por muitos anos	Tempo de secagem do Bálsamo do Canadá.

Fonte: O autor, 2023.

Quadro 2 – Protocolo para coloração em Ácido Periódico de Schiff (PAS) em intestino.

COLORAÇÃO PAS (PROTOCOLO INTESTINO)	
ETAPAS	TEMPO
Estufa	1 h
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Álcool 100% I	5 min
Álcool 100% II	5 min
Álcool 90%	3 min
Álcool 70%	3 min
Água destilada	5 min
Ácido periódico	20 min
Água corrente	10 min
Água destilada	5 min
Reativo de Schiff	10 min
Água corrente	10 min
Água destilada	5 min
Hematoxilina (Mayer/Harris)	30 seg
Água corrente	10 min
Água destilada	5 min
Álcool 70%	3 min
Álcool 90%	3 min

Álcool 100%	10 min
Xilol III	5 min
Xilol IV	5 min

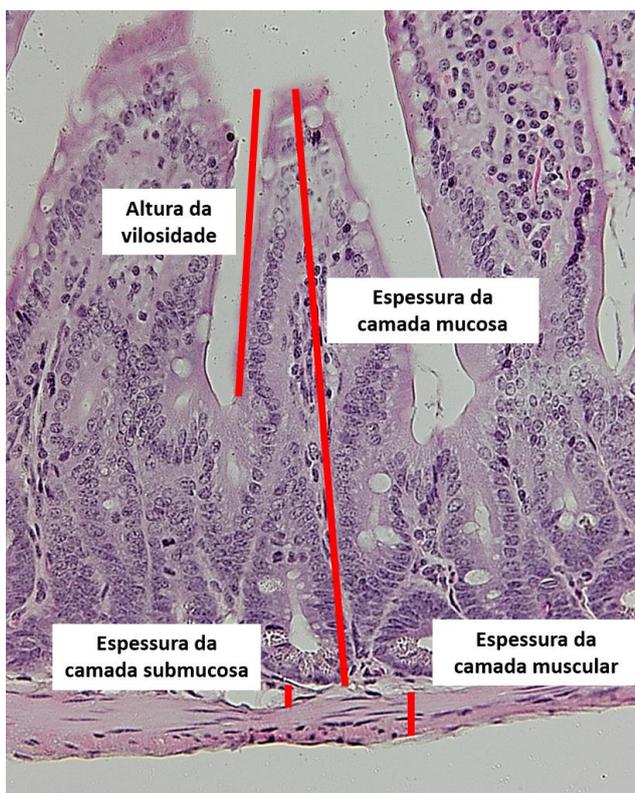
Fonte: o autor, 2023.

Quadro 3 – Protocolo para coloração em Hematoxilina & Eosina (H&E).

COLORAÇÃO H&E (PROTOCOLO INTESTINO)	
ETAPAS	TEMPO
Estufa (opcional)	1 h
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Álcool 100% I	3 min
Álcool 90%	1 min
Álcool 70%	1 min
Água destilada	1 min
Hematoxilina de Mayer	15 min
Água corrente	15 min
Água destilada	10 mergulhos
Álcool 80%	1 min
Eosina	2 min
Água destilada	2 mergulhos
Álcool 70%	1 min
Álcool 90%	1 min
Álcool 100%	1 min
Xilol III	2 min
Xilol IV	2 min

Fonte: o autor, 2023.

Figura 16 –Modelo usado para a morfometria do intestino delgado.



Legenda: Corte histológico das vilosidades corados com HE usados como parâmetro para análise morfométrica.

Fonte: o autor, 2023.

3.11 Recuperação, processamento e morfometria dos helmintos

Os helmintos adultos foram recuperados da veia porta e dos vasos mesentéricos manualmente com auxílio de pincel e estilete, contados utilizando estereomicroscópio, fixados em AFA (70% álcool, 2% formaldeído e 2% ácido acético glacial), corados com carmim clorídrico alcoólico (2,5%), desidratados na série alcoólica (70%, 90% e 100%), diafanizados e montados em bálsamo do Canadá (1:2) e salicilato (Quadro 4). Os espécimes foram montados com lâminas e lamínula. Um total de 58 espécimes foram analisados neste estudo, sendo, 38 do grupo IDP e 20 do grupo IDH. Para tal utilizamos microscópio de luz (Olympus BX53, câmera Olympus SN 4M04717, U-TV0.35XC-2, Tokyo, Japan, Software: Olympus CellSens Entry, versão 1.18). Utilizamos morfometria para avaliar o tamanho dos órgãos do sistema reprodutor (lóbulo testicular, vesícula seminal, ovário, oócitos, receptáculo seminal, glândulas vitelinas, oótipo e útero) e do tegumento (espessamento e alterações dos tubérculos) dos helmintos.

Quadro 4 – Protocolo para coloração de helmintos em Carmin clorídrico.

Coloração Carmin Clorídrico - Helmintos	
ETAPA	TEMPO
Mergulhar os vermes em solução corante (carmin)	Máx. 30 min Fêmea: 22 - 25 Macho: 27 - 30
Álcool 70%	Passagem rápida (até que fique com tom rosado) *3 mergulhos
Álcool clorídrico	Passagem rápida (até que fique com tom rosado) *3 mergulhos
Álcool 70%	3 min
Álcool 90%	3 min
Álcool 100%	3 min
Clarificar em salicilato de metila com bálsamo do Canadá (1:2)	24 horas

Fonte: o autor, 2023.

3.12 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica citoquímica que permite a detecção, identificação e localização genética por uma sonda de ácido nucleico marcada com fluorescência, que pode hibridizar com sequências de ácido nucleico alvo. Para tal, seções do jejuno dos camundongos foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10% por 48 horas. O material foi incubado em sacarose a 10% e 30% a 4°C durante 24 horas para a inclusão em gel OCT (Temperatura Ótima de Corte, marca Tissue-Tek) e submetido a congelamento rápido em nitrogênio líquido. Seções finas (5µm) foram recuperadas em lâminas previamente tratadas com L-poli-lisina (Sigma/Aldrich) em um criostato (Leica CM1850) a -25°C. As lâminas com os cortes foram banhadas em agarose a 0,1% para melhor adesão do material à lâmina. O material foi preservado no congelador a -20 °C para a hibridização *in situ* por fluorescência no Instituto de Microbiologia Paulo de Goes na Unidade de Microscopia Multiusuário (UniMicro, UFRJ). As lâminas foram submetidas às condições e aos tampões de hibridização e lavagem usando 30% de formamida e sondas para eubactérias

(PERNTHALER et al., 2001). Posteriormente as lâminas foram marcadas com DAPI em uma concentração de 10 μ l por 10 minutos, revestida com N-propil galato (Sigma/Aldrich) e observada com um microscópio Zeiss equipado com um microscópio AxioImager AxioCam RMC (Zeiss, Alemanha).

3.13 Análise estatística

Primeiramente foi verificado se os dados se ajustavam à curva normal de Gauss. Após verificação da normalidade ou não dos dados, foram aplicados testes paramétricos ou não paramétricos. Para a análise estatística dos dados usamos o programa GraphPad Prism 6 Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As comparações entre os grupos foram feitas usando a análise de variância de Brown-Forsythe e Welch (ANOVA) e o teste de comparação múltipla T2 de Tamhane e teste t de student. Um teste do qui-quadrado foi aplicado para examinar o número de ovos no intestino (oograma). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados serão apresentados em média \pm desvio padrão (DP).

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros biométricos e bioquímicos

A dieta hiperlipídica foi capaz de promover aumento de massa corporal nos grupos CDH e IDH, contudo, os animais infectados submetidos à essa dieta apresentaram menor ganho de massa, quando comparado ao não infectado (CDH), com diferença estatística $p=0,0085$. O alto teor calórico dos lipídios presentes nesta dieta levou os animais que foram submetidos a este tipo de alimentação à obesidade. Não houve diferença estatística entre CDP e IDP, entretanto, o IDP mostrou menos massa corporal (Tabela 2). Os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maiores índices de adiposidade, independente da infecção. Embora as diferenças entre CDH e IDH não sejam significativas, os camundongos infectados com *S. mansoni* alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram menor índice de adiposidade (Tabela 2).

As análises bioquímicas do sangue estão apresentadas na Tabela 2. A alimentação com ração hiperlipídica aumentou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol (CT, $p=0,0002$), triglicerídeos (TG, $p=0,0001$), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C, $p=0,029$) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C, $p=0,0074$) quando comparadas à ração controle, exceto os níveis de HDL-C ($p=0,0251$), que foram maiores na dieta controle. Nos grupos infectados submetidos à dieta hiperlipídica, verificamos redução significativa de todos os parâmetros lipídicos analisados, exceto HDL-C que teve um aumento, mas sem diferença estatística.

Tabela 2 - Parâmetros biométricos e bioquímicos de camundongos infectados ou não infectados por *Schistosoma mansoni* alimentados com dietas padrão ou hiperlipídica.

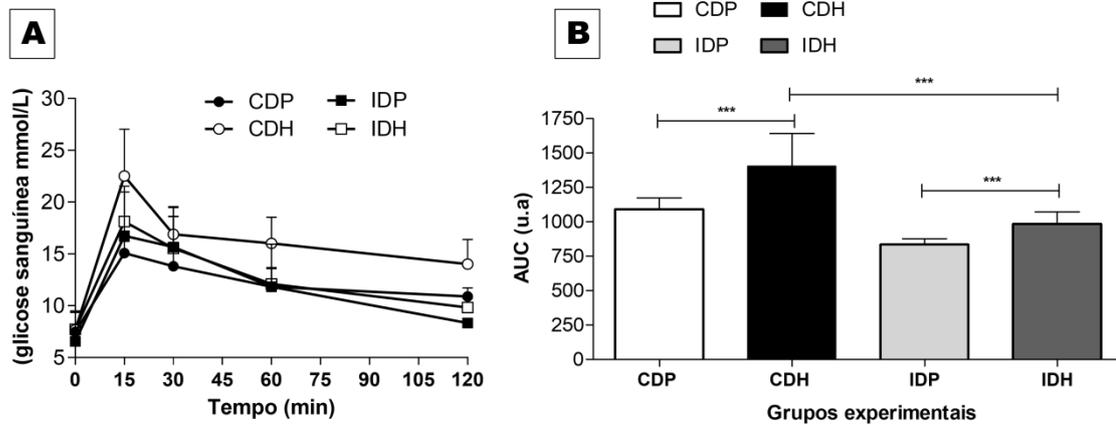
Parâmetros	Grupos			
	CDP	CDH	IDP	IDH
Biometria				
Massa corporal	29.56±2.09 ^a	42.30±5.92 ^{ab}	27.24±2.28 ^d	35.71±5.71 ^{bd}
Índice de adiposidade	2.65±1.58 ^{ac}	6.93±3.50 ^a	2.75±1.32 ^d	6.37±1.65 ^{cd}
Lipídeos plasmáticos (mg/dL)				
HDL-C	13.20±7.91	9.60±4.92 ^b	22.8±5.11 ^{bd}	12.4±6.98 ^d
LDL-C	70.71±41.54	121.13±32.70 ^b	58.34±19.53 ^b	97.17±29.59
VLDL-C	36.3±25.66	59.16±23.80 ^b	20±.008 ^b	18.18±0.84 ^b
TG	181.5±128.34	295.82±119.3 ^b	100.1±30.40 ^b	90.94±4.21 ^b
CT	132.32±35.00 ^a	203.1±32.89 ^{ab}	87.96±24.93 ^b	127.76±30.46 ^b

Legenda: CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). HDL-C, lipoproteína de alta densidade; LDL-C, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muita baixa densidade; TG, triglicerídeos; CT, colesterol total; Média ± DP. $p < 0.05$: ^aCDP vs. CDH; ^bCDH vs. IDH, IDP; ^cCDP vs. IDH; ^dIDP vs. IDH. Teste ANOVA.

Fonte: o autor, 2023.

Verificamos que o grupo CDH apresentou prejuízos quanto à tolerância oral à glicose em comparação ao grupo IDP (Fig. 17A). CDH também mostrou maior AUC total em comparação com IDP (+ 40,52%, $p < 0,001$) e IDP vs CDP (-30,69%, $p > 0,05$), enquanto valores mais baixos foram encontrados em IDH vs IDP (+ 15,19%, $p < 0,001$) e CDH vs IDH (+ 31,37%, $p < 0,001$) (Fig. 17B). Logo, IDH apresenta significativamente maior tolerância à glicose que o grupo não infectado para a mesma dieta.

Figura 17 - Teste oral de tolerância à glicose.



Legenda: A - curva; B – área sob a curva (AUC). Valores expressos em média \pm DP. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Teste ANOVA.

Fonte: o autor, 2023.

4.2 Parâmetros parasitológicos

Os camundongos infectados submetidos a dieta padrão (IDP) apresentaram maiores números de ovos retidos no jejuno do intestino e ovos maduros, imaturos e mortos do que o IDH, no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos para carga intestinal de ovos e seus estágios de desenvolvimento (Tabela 3). Recuperamos mais casais de vermes em IDP, com 37 casais, e 30 casais em IDH. Em uma relação de 12,59 ovos por casal contra 14,36, respectivamente.

Tabela 3 - Parâmetros parasitológicos: oograma intestinal e desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni* em camundongos infectados ou não infectados alimentados com dietas padrão ou hiperlipídica.

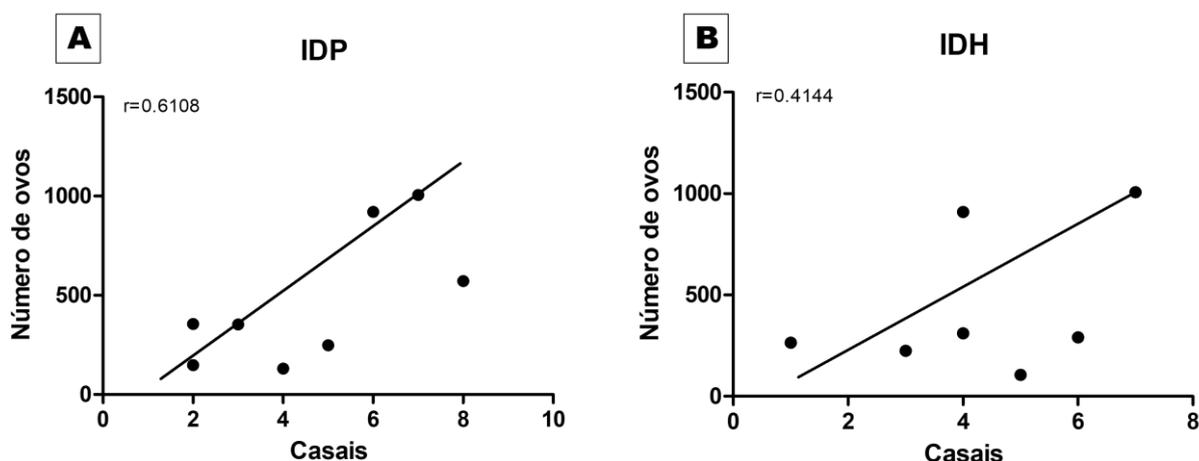
Parâmetros	GRUPOS	
	IDP	IDH
Ovos retidos no intestino	466.62 \pm 336.94 ^d	431.37 \pm 333.62
Desenvolvimento dos ovos		
Maduro	147.3 \pm 61.39	131.1 \pm 47.19
Imaturo	195.4 \pm 56.57	178.0 \pm 67.52
Morto	91.88 \pm 20.70	86.88 \pm 15.23

Legenda: IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Média \pm DP. Teste quia-quadrado.

Fonte: o autor, 2023.

O modelo de regressão linear buscou verificar a relação entre o número de ovos eliminados nas fezes e a carga parasitária em ambos os grupos (IDP e IDH). Verificamos que não houve correlação significativa (Fig. 18A) no grupo IDP ($r = 0,6108$, $p = 0,1150$) e no grupo IDH (Fig. 18B) entre o número de ovos e os pares de vermes de *S. mansoni* recuperados ($r = 0,4144$, $p = 0,3536$).

Figura 18 – Correlação entre número de ovos de *Schistosoma mansoni* eliminados nas fezes e o número de casais recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.



Legenda: Teste de correlação entre o número de ovos eliminados nas fezes e a carga parasitária em IDP (A) e IDH (B). IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Os dados foram analisados por testes de regressão e correlação linear. Teste t de student.

Fonte: o autor, 2023.

4.3 Análise morfométrica e morfológica de *Schistosoma mansoni* adultos recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.

Foram analisados 75 espécimes de *S. mansoni*, sendo, 25 machos e 25 fêmeas do grupo IDH e 13 machos e 13 fêmeas do grupo IDP. Não verificamos alterações morfométrica e morfológicas em relação ao número de lobos testiculares e a densidade de células testiculares entre as dietas (Tabela 4). A área dos lobos testiculares do grupo alimentado com dieta hiperlipídica foi significativamente maior que seu controle ($p=0,0313$). Ainda que o perímetro e o diâmetro dos lobos testiculares de IDH tenham sido maiores, não foi verificado diferença estatística para esses parâmetros. A área e o perímetro da vesícula seminal foram significativamente reduzidos em IDH ($p=0,0096$ e $0,0343$, respectivamente), assim como o diâmetro. Ambos os grupos apresentaram alta concentração de espermatozoides com aspecto normal, com destaque para IDH. Este grupo apresentou menor largura dos tubérculos

($p=0,04280$), menor altura e tegumento menos espesso, porém sem diferença estatística quando comparado com IDP para estes parâmetros. Para ambas as dietas observamos vermes com células dos lobos testiculares com aspecto normal, de forma arredondada e núcleo aparente, vesícula seminal com presença de espermatozoides, alta densidade em IDH. As camadas musculares do tegumento e os tubérculos dos vermes machos estavam organizados dentro da normalidade independentemente do tipo de dieta.

Tabela 4 - Análise morfométrica de *Schistosoma mansoni* machos recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.

Parâmetros Morfométricos	GRUPOS	
	Machos	IDP
Lobos testiculares		
Número de lobos testiculares	7,2±0,83	6,95±1,43
Densidade de células testiculares (%)	90%	100%
Área	21808,106±5098 ^a	24927,84±1013 ^a
Perímetro	673,118±97,39	763,023±27,38
Diâmetro	145,73±20,57	164,08±3,23
Vesícula seminal		
Área	2195,34±483,4 ^a	1328,08±163,3 ^a
Perímetro	190,17±21,67 ^a	139,77±7,15 ^a
Diâmetro	50±5,86	38,96±2,03
Concentração de espermatozoides (%)	Normal 85%	Normal 95%
Tubérculo		
Número de tubérculos	4,80±2,04	4,45±1,53
Altura	9,76±0,24	8,4±0,62
Largura	16,26±3,23 ^a	11,96±0,66 ^a
Espessura do tegumento	7,76±1,95	8,08±2,85

Legenda: IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Média ± Desvio padrão. $p<0,05$: a IDP vs. IDH. Teste t de student não paramétrico Área (μm^2), perímetro, diâmetro, altura e espessura (μm)

Fonte: o autor, 2023.

O ovário das fêmeas IDH apresentou menor área, perímetro e diâmetro em relação ao seu controle, contudo, sem apresentar diferença estatística. Os ovários para ambas as dietas apresentaram células ovarianas normais, bem como a estrutura do ovário (Tabela 5). Verificamos presença de espermatozoides no receptáculo seminal em alta densidade, bem como riqueza de glândulas vitelínicas. A espermateca de IDH apresentou menor perímetro ($p=0,0283$) e área, e maior diâmetro e espessura do tegumento, porém sem diferença estatística para estes últimos. Observamos desenvolvimento do oótipo das fêmeas em IDH

que significativamente apresentaram maior área ($p=0,045$); perímetro e diâmetro (não significativos).

Tabela 5 - Análise morfométrica de *Schistosoma mansoni* fêmeas recuperados de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.

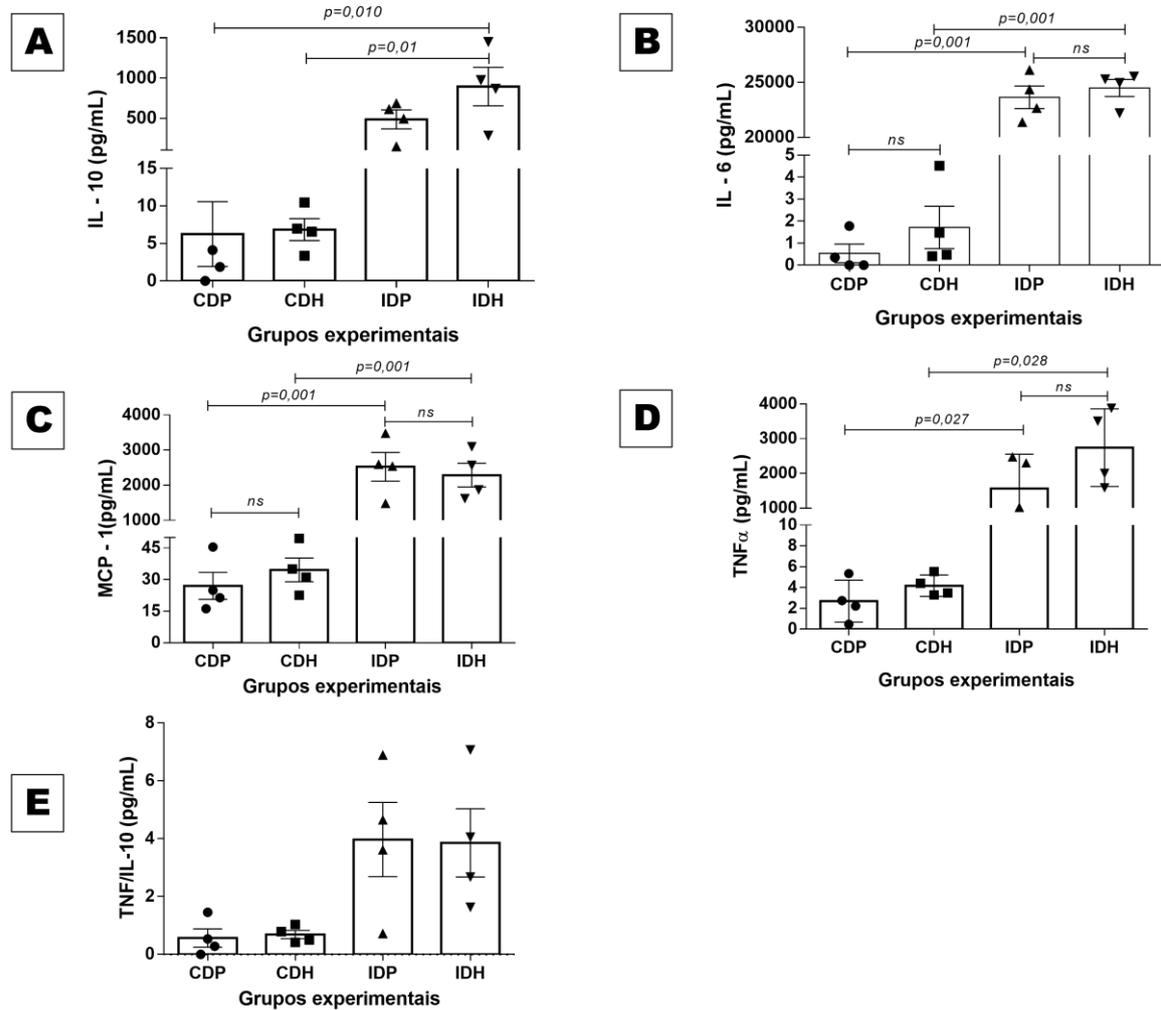
Parâmetros Morfométricos	GRUPOS	
	IDP	IDH
Fêmeas		
Ovário		
Área	17992,33±594,09	16727,16±8638,8
Perímetro	731,9±44,26	691,2976±229,44
Diâmetro	138,07±2,87	122,55±38,72
Densidade das glândulas vitelínicas (%)	100%	100%
Densidade de vitelo (%)	100%	100%
Espermateca		
Área	672,9±5,72 ^a	627,04±3,62 ^a
Perímetro	160,17±2,98 ^a	116,64±21,78 ^a
Diâmetro	23,62±3,76	26,2±4,86
Espessura do tegumento	2,88±0,78	3,31±0,71
Oótipo		
Área	2379,79±70,7 ^a	3409,96±126,86 ^a
Perímetro	236,11±0,78	267,14±67,25
Diâmetro	51,19±0,84	60,86±17,06

Legenda: IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Média ± Desvio padrão. $p<0.05$: a IDP vs. IDH. Área (μm^2), perímetro, diâmetro, altura e espessura (μm). Teste t de student não paramétrico
Fonte: o autor, 2023.

4.4 Atividade dos macrófagos peritoneais residentes

A atividade inflamatória dos macrófagos residentes do peritônio indicou maiores concentrações de IL-6, IL-10 e TNF- α no grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica (IDH) comparado com seu controle não infectado (CDH) com diferença estatística significativa. Não foi observado diferença significativa entre CDP vs CDH e IDP vs IDH nos parâmetros analisados (Fig. 19A-D). Indicando que apenas a dieta ou apenas a infecção não foi capaz de alterar a atividades dos macrófagos peritoneais. A razão TNF- α /IL-10 foi maior nos grupos infectados que nos não infectados, com diferença estatística ($p<0.05$) (Fig. 19E).

Figura 19 – Quantificação das citocinas de macrófagos peritoneais residentes.



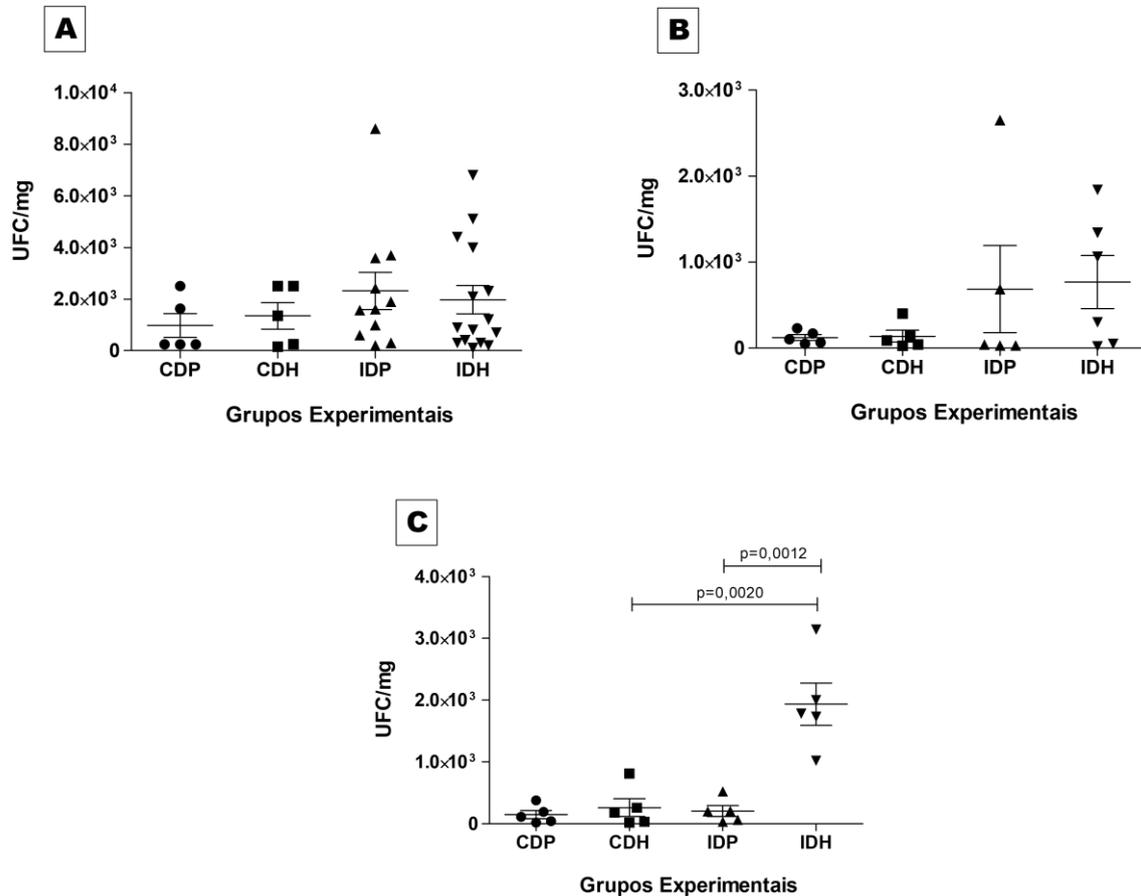
Legenda: Quantificação das citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α e TNF- α /IL-10) de macrófagos residentes do peritônio. **A** - (IL-10); **B** - (IL-6); **C** - (MCP-1); **D** - (TNF- α); **E** - (TNF- α /IL-10). Valores expressos em média \pm DP. n.s.: não significativo. Teste ANOVA. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica).
Fonte: o autor, 2023.

4.5 Estudo da microbiota de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica

A partir das amostras fecais dos grupos experimentais realizamos o cálculo de UFC/mg nos seguintes meios seletivos: ágar Médio Deficiente em Listeína de Cisteína (CLED), ágar MacConkey e ágar Eosina Azul Metileno (EMB) (Figura 20). Para ambos os meios a quantificação de bactérias variou bastante e nos três meios os animais infectados apresentaram maior crescimento bacteriano, entretanto, sem diferença significativa entre os grupos para os meios CLED ($p=0.5995$) e MacConkey ($p=0.2978$). As amostras inoculadas

no meio BEM apresentaram alto crescimento, sobretudo no grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica quando comparado com IDP ($p=0.0012$) e CDH ($p=0.0020$).

Figura 20 - Unidades formadoras de colônias em diferentes meios de cultura.



Legenda: Unidade formadoras de colônias oriundas de amostras fecais em diferentes meios de cultura. **A** - Ágar Médio Deficiente em Listeína de Cisteína (CLED); **B** - Ágar MacConkey; **C** - Ágar Eosina Azul Metileno (EMB). Valores expressos em média \pm DP. Teste ANOVA. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica).

Fonte: o autor, 2023.

4.6 MALDI-TOF – Composição microbiana presente nas fezes

A espectrometria de massa, MALDI-TOF, revelou a presença dos filos Proteobacteria e Firmicutes. As espécies dominantes nos grupos experimentais foram *Escherichia coli*, seguido de *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri*. *Bacillus megaterium* e *Klebsiella variicola* foram detectados apenas nos grupos infectados, IDP e IDH, respectivamente. *Klebsiella. variicola* foi encontrado apenas nos grupos infectados alimentado com dieta hiperlipídica (Tabela 6).

Tabela 6 - Identificação microbiológica das fezes de camundongos C57BL/6 por espectrometria de massa (MALDI-TOF).

Grupo	Amostra	Meio	Gram	Formato	Identificação MALDI-TOF	Score
CDP	1	MacC	negativo	bastonete	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.313
	2	MacC	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	2.291
	3	CLED	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	2.322
	4	EMB	negativo	bastonete	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.281
	5	MacC	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	2.231
CDH	1	MacC	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	2.322
	2	EMB	negativo	bastonete	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.281
	3	EMB	positivo	estafilococo	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2.369
	4	EMB	positivo	estafilococo	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2.82
	5	EMB	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	2.302
IDP	1	EMB	positivo	estafilococo	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2.051
	2	CLED	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	2.004
	3	EMB	positivo	bacilo	<i>Bacillus megaterium</i>	1.893
	4	MacC	positivo	diplococos	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1.723
	5	MacC	negativo	bastonete	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.048
IDH	1	MacC	negativo	bastonete	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.048
	2	EMB	negativo	bacilo	<i>Escherichia coli</i>	1.907
	3	EMB	negativa	bacilo	<i>Klebsiella variicola</i>	2.485
	4	MacC	positivo	estafilococo	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2.069
	5	MacC	positivo	diplococos	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1.728

Legenda: CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). Identificação a nível de espécie (score ≥ 2); nível de gênero (score 1.7 a 1.9).

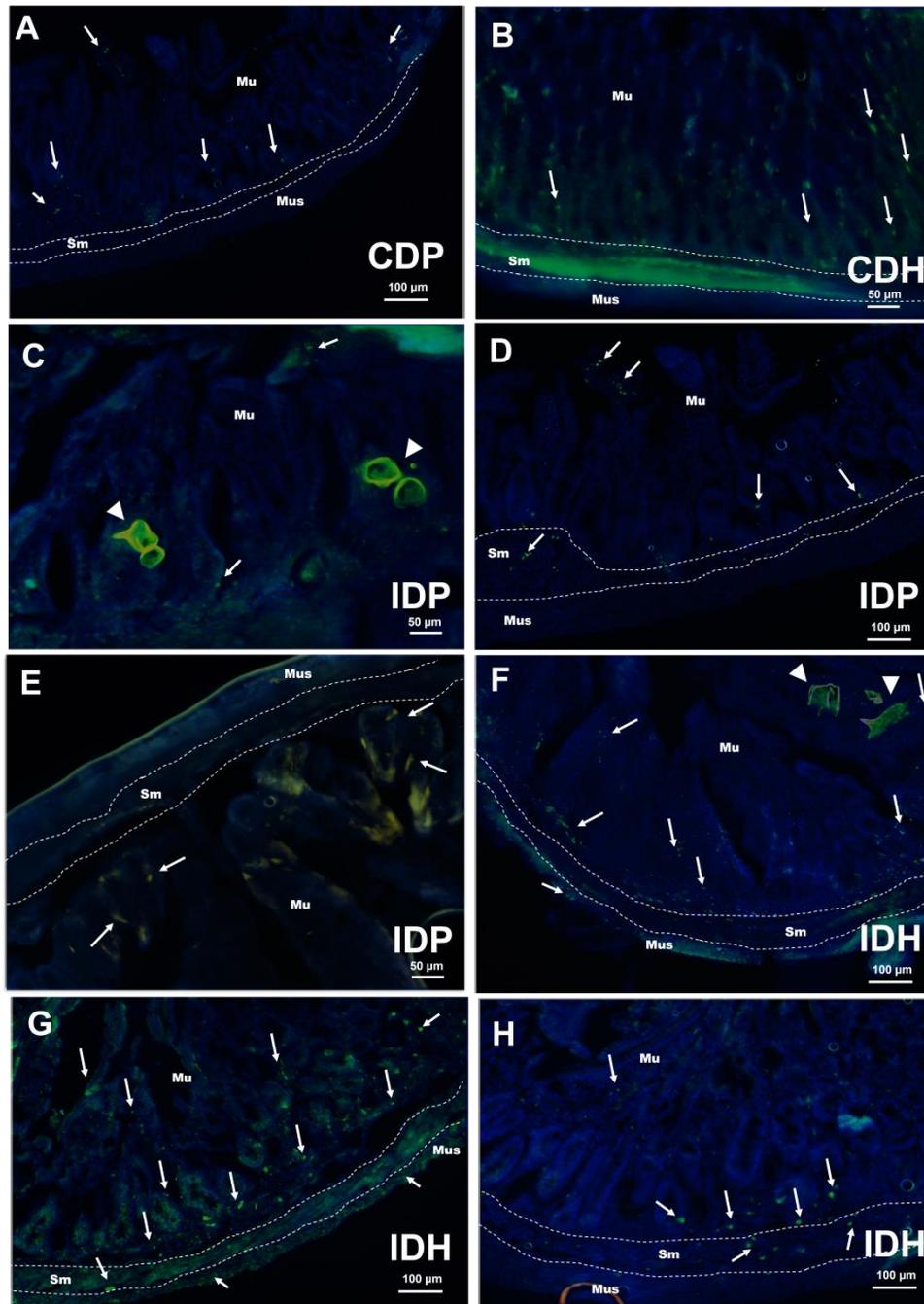
Fonte: o autor, 2023.

4.7 Análise da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A hibridização *in situ* por fluorescência nos permite a visualizar sequências específicas de DNA de diversos tipos celulares a partir de sondas alvos, neste estudo a técnica possibilitou a análise de espécies bacterianas isoladas da microbiota fecal de camundongos C57BL/6 não infectados e infectados com dieta padrão ou hiperlipídica conforme determinado pela coloração 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (células totais) e hibridização com sondas bacterianas específicas. As seções intestinais mostraram presença de bactérias na camada mucosa em CDP e em grande quantidade em CDH (Figura 21A e Figura 21B). O grupo infectado alimentado com dieta padrão apresentou bactérias próximo ao ovo de *S. mansoni* e camada submucosa (Figura 21C, 21D e 21E). Nos animais infectados submetidos à dieta hiperlipídica verificamos uma distribuição de bactérias nas camadas mucosa, sobretudo

nas criptas de Lieberkühn, na submucosa e muscular, sugerindo uma possível translocação de bactérias (Figura 21F, 21G e 21H).

Figura 21 - Microscopia por fluorescência usando hibridização *in situ* (FISH).



Legenda: Seções de intestino delgado de camundongos C57BL/6 não infectados e infectados alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica mostrando presença de bactérias. **A** e **B** – setas brancas mostrando presença de bactérias (verde) na camada mucosa, com rica presença no grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica; **C** – Presença de ovos de *S. mansoni* (cabeça de seta branca) e bactérias na parte inferior da camada mucosa (seta branca) em IDP; **D**- Bactérias presentes (seta branca) no ápice das vilosidades e na camada submucosa (IDP); **E**- Rica presença de bactérias próximo às criptas intestinais (IDP); **F**- Ovos de *S. mansoni* na camada mucosa (cabeça de seta branca), rica presença de bactérias na camada mucosa e alguns representantes na camada muscular (seta branca) em IDH. **G** – O FISH mostra presença de bactérias presente nas três camadas do

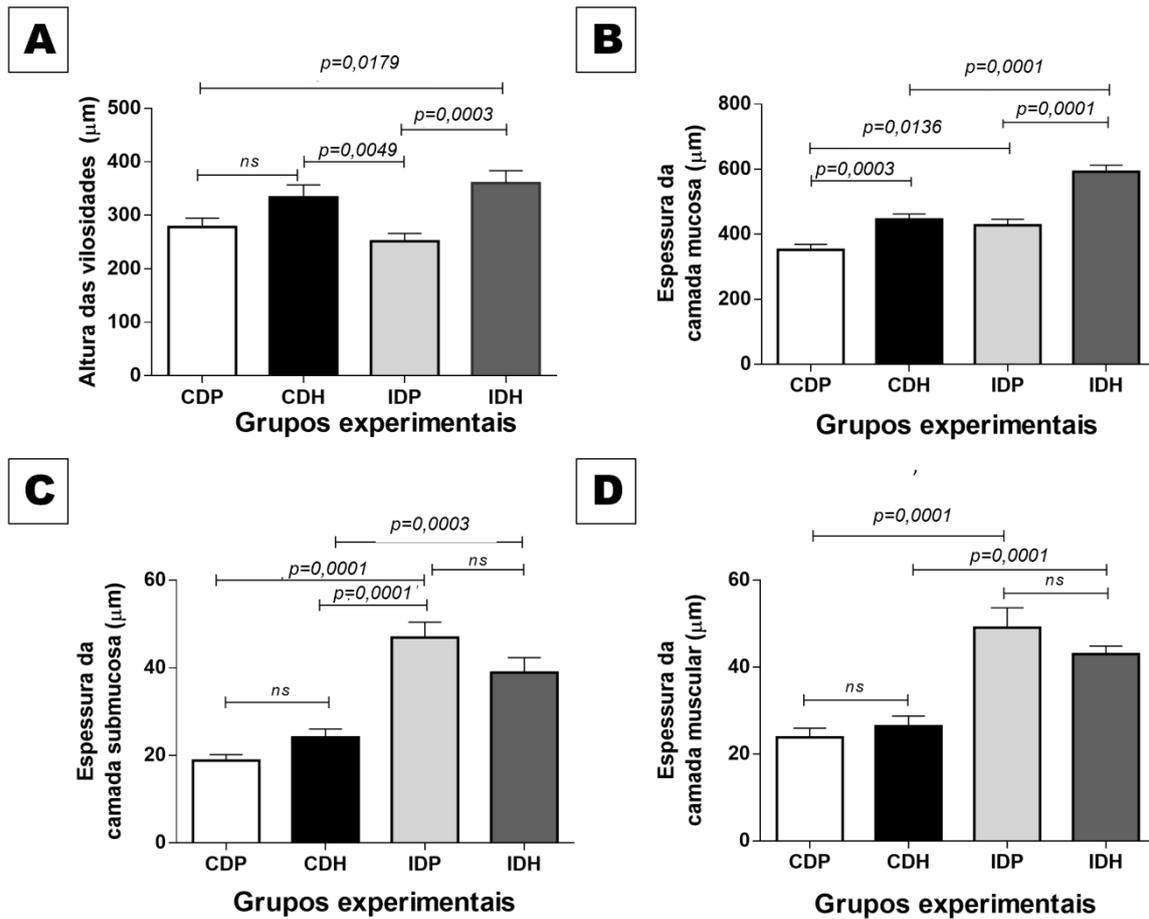
intestino delgado, reforçando invasão bacteriana em IDH. **H** – Bactérias (marcadas em verde) presente nas camadas mucosa e submucosa no grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica. Figuras em sobreposição mostrando bactérias (verde) e o tecido hospedeiro (4',6'-diamino-2-fenil-indol, DAPI em azul). Barras, 100µm (A, D, F, G e H) e 50µm (B, C e E). As imagens são representativas de 3 experiências. Abreviações: Mu, mucosa; Sm, submucosa; Mus, muscular. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica).

Fonte: o autor, 2023.

4.8 Intestino delgado: morfometria e histologia

Em nossas investigações, verificamos que a dieta por si só não modificou a altura das vilosidades entre os grupos analisados (CDP vs CDH, CDH vs IDH, $p > 0,05$) (Fig. 22A). Os resultados demonstraram que camundongos infectados alimentados com dieta hiperlipídica apresentam a altura das vilosidades aumentada em comparação ao grupo IDP ($p = 0,0003$) (Fig. 22A). A comparação da espessura total da camada mucosa nos diferentes grupos revelou que tanto a dieta quanto a infecção alteram a morfometria dessa região (Fig. 22B). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica mostraram ter camada mucosa mais espessa do que os alimentados com dieta padrão (CDH vs CDP, $p = 0,0003$; IDH vs CDP, CDH, IDP, $< 0,05$). Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em relação à espessura da camada submucosa entre camundongos alimentados com ração padrão (CDP) ou hiperlipídica (CDH) (Fig. 22C). Em comparação com o controle não infectado, a infecção causou aumentos significativos na espessura da camada submucosa (IDP vs CDP, CDH), entre IDH vs CDH também verificamos maior espessura da camada submucosa no grupo infectado (vs CDH, $p = 0,0003$), contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos infectados. Os grupos infectados, independente da dieta revelaram maior espessura na camada muscular quando comparamos com os não infectados, porém IDP vs IDH não tiveram diferença significativa entre si (Figura 22D).

Figura 22 - Morfometria do segmento jejunal do intestino.

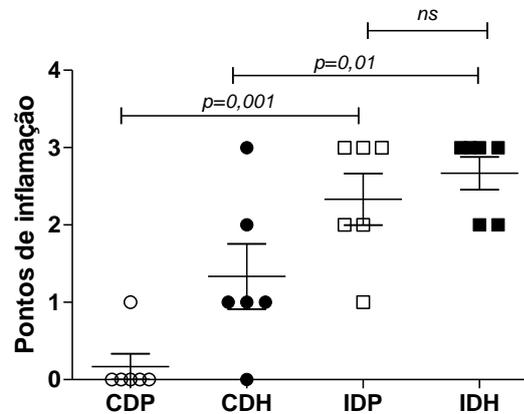


Legenda: **A** – altura das vilosidades; **B** – espessura da camada mucosa; **C** – espessura da camada submucosa; **D** – espessura da camada muscular. Valores expressos em média ± DP. n.s.: não significativo. Teste ANOVA. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica).

Fonte: o autor, 2023.

A análise dos pontos de inflamação revelou que a infecção foi o fator que mais contribuiu para este parâmetro, com diferenças estatísticas entre seus grupos não infectados, CDP vs. IDP ($p=0,001$) e CDH vs. IDH ($p=0,01$). Ainda que o grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica tenha apresentado mais pontos de inflamação no segmento do tecido estudado que o grupo infectado alimentado com dieta padrão, não verificamos diferença estatística significativa entre eles (Figura 23).

Figura 23 - Pontos de inflamação do segmento jejunal do intestino.

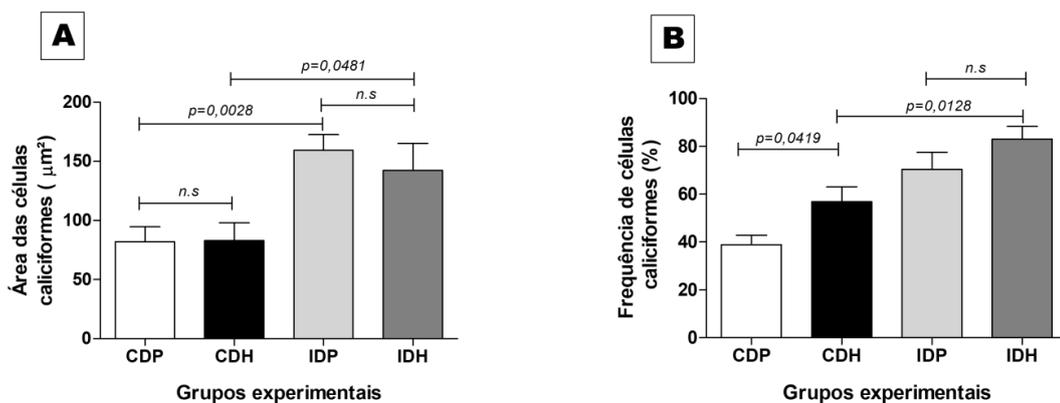


Legenda: Valores expressos em média \pm DP. n.s.: não significativo. Teste ANOVA. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica).

Fonte: o autor, 2023.

A infecção promoveu maior área das células caliciformes independente da dieta (Figura 24A) ao passo que nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica verificamos maior frequência de células caliciformes quando comparamos com os alimentados com dieta padrão, com diferença estatística entre CDP e CDH ($p=0,0419$). A infecção foi capaz de aumentar a frequência das células caliciformes em ambas as dietas, contudo, sem diferença significativa entre elas (Figura 24B).

Figura 24 - Área e frequência das células caliciformes do intestino delgado (jejuno) de camundongos C57BL/6 alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.

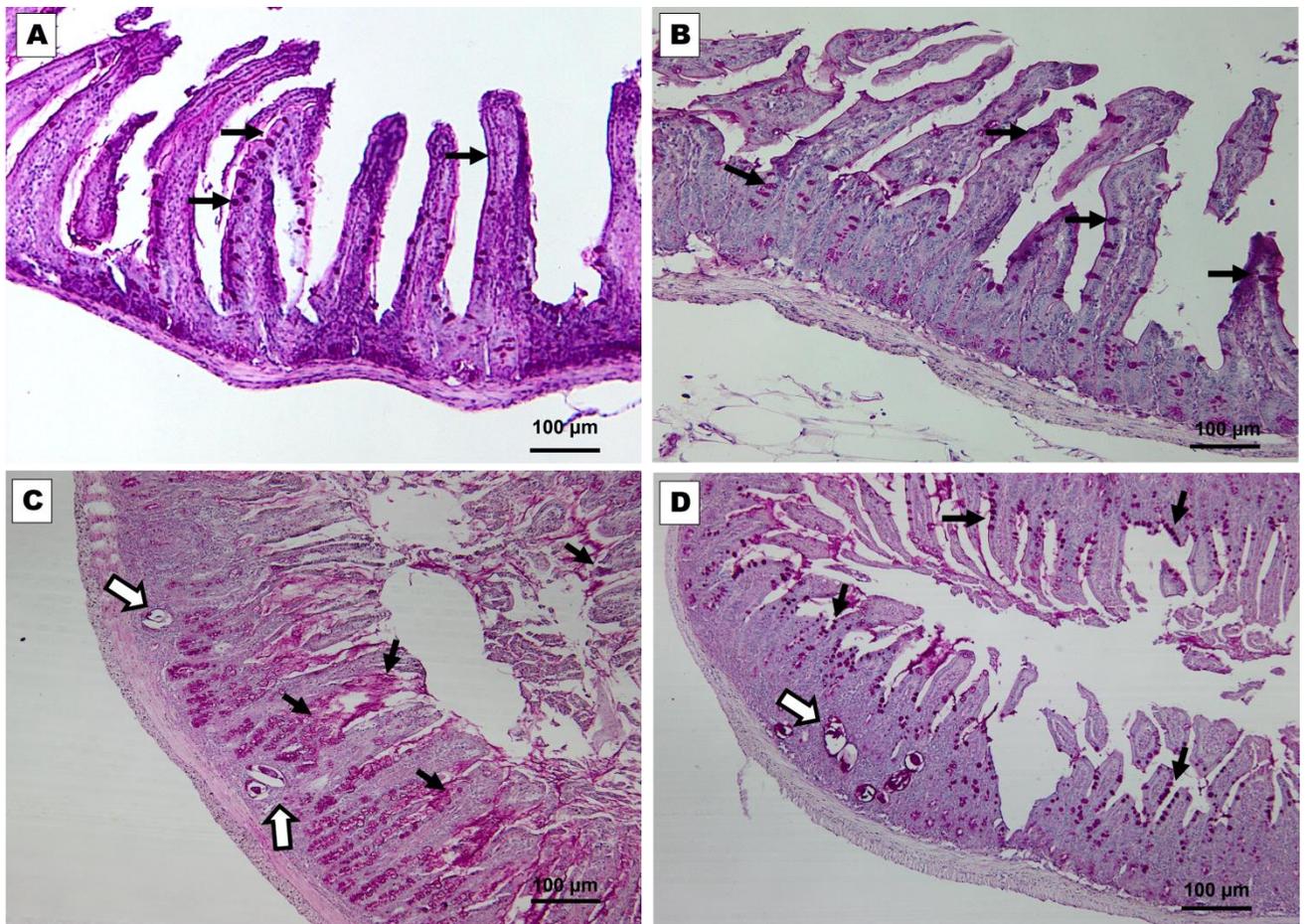


Legenda: Valores expressos em média \pm DP. n.s.: não significativo. Teste ANOVA. CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica).

Fonte: o autor, 2023.

A análise das seções histológicas coradas com Ácido Periódico de Schiff mostra um tecido íntegro com células caliciformes bem distribuídas nas vilosidades intestinais em CDP (Figura 25A). O grupo alimentado com dieta hiperlipídica verificamos aumento na quantidade de células de caliciformes dispostas sobretudo nas porções superiores das vilosidades (Figura 25B). Os grupos infectados, verificamos presença de ovo na camada mucosa o que levou a hiperplasia das células caliciformes, em IDP elas estavam dispostas principalmente nas criptas intestinais e em IDH ao longo das vilosidades (Figura 25C e 25D, respectivamente).

Figura 25 - Seções de intestino delgado de camundongos C57BL/6 coradas com PAS para verificação de células caliciformes.

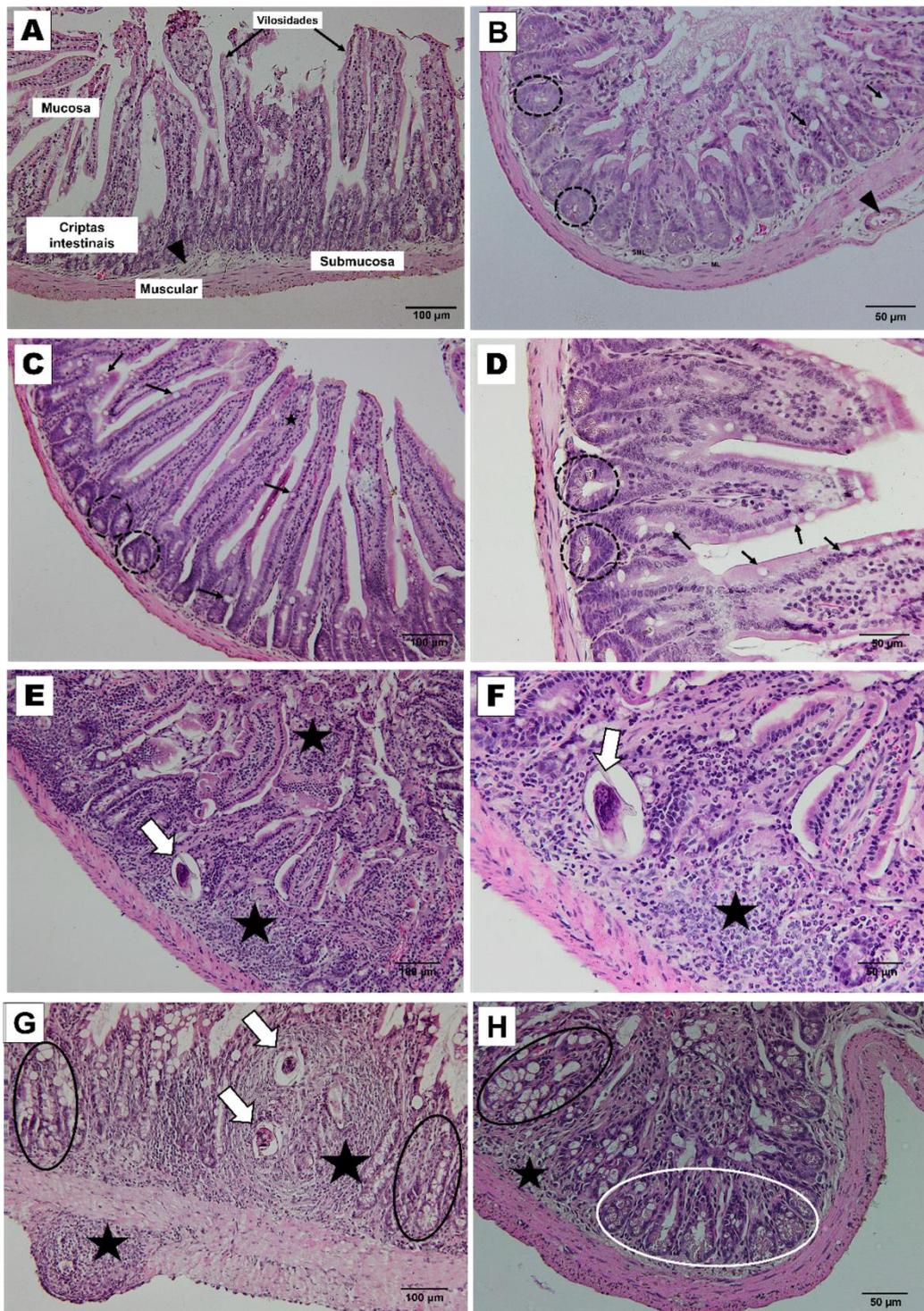


Legenda: Fotografias do segmento jejuno de camundongos C57BL/6. Coloração: PAS. **A:** CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); tecido íntegro com as vilosidades digitiformes e células caliciformes rica em muco (setas pretas). **B:** CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); discreto aumento de células caliciformes (setas pretas). **C:** IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); presença de ovos de *S. mansoni* (setas brancas) com granulomas intestinais e riqueza de células caliciformes (setas pretas). **D:** IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica); - intenso infiltrado inflamatório eosinofílico próximo aos ovos de *S. mansoni* (seta branca) e hiperplasia de células caliciformes (setas pretas). barra = 100 µm; coloração PAS.

Fonte: o autor, 2023.

Como esperado, os animais não infectados alimentados com dieta padrão apresentaram uma histologia intestinal normal, mostrando vilosidades semelhantes a dedos revestidas por um epitélio colunar simples, contendo eritrócitos esparsos e células caliciformes dispersas na base da mucosa, apoiadas em um tecido conjuntivo frouxo com várias células residentes na lâmina própria (Fig. 26A e 26B). Na base das vilosidades, células de Paneth contendo poucas vesículas estão localizadas nas glândulas intestinais ou criptas de Lieberkuhn. As camadas submucosa e muscular eram finas neste grupo. As vilosidades de CDP e CDH não apresentaram diferença significativa na altura, porém, observou-se hiperplasia de células intermediárias, que consistem em nichos proliferativos de células-tronco intestinais, visando a substituição de enterócitos e/ou células caliciformes (Fig. 26C e 26D). Nestes grupos, as células de Paneth, ao que indica, apresentaram maior concentração de vesículas secretoras de muco. Em camundongos infectados de ambas as dietas (IDP e IDH), verificamos ligeira perda da mucosa epitelial, submucosa e integridade da camada muscular externa provavelmente devido ao infiltrado inflamatório induzido por ovo de *S. mansoni*. Infiltrado rico em células polimorfonucleares (Fig. 26E e 26F). Outras alterações histopatológicas demonstraram hiperplasia de vilosidades e hipertrofia de células de Paneth, células caliciformes, células intermediárias e a formação de vários granulomas com tamanhos variados (Fig. 26G e 26H). Os camundongos IHFC mostraram uma camada mucosa mais espessa do que os outros grupos.

Figura 26 - Histologia do segmento jejuno de camundongos C57BL/6.



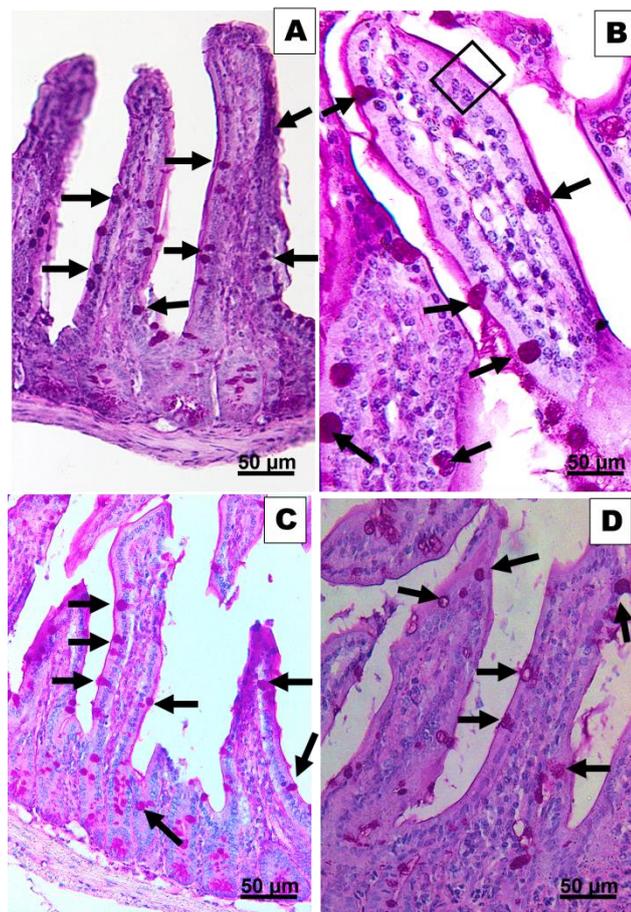
Legenda: Fotografias do segmento jejuno de camundongos C57BL/6. **A e B:** CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); **A:** sem nenhuma alteração histológica. Vilosidades, integridade das criptas intestinais, camada submucosa, camada muscular e arteriola (cabeça de seta preta). **B:** Células caliciformes (seta preta), células de Paneth (círculo preto) e arteriola (cabeça de seta preta). **C e D:** CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); **C:** discreto aumento de células caliciformes (seta preta), células de Paneth e hiperplasia de células intermediárias. **D:** presença de polimorfonucleares, células de Paneth (círculo preto) e hiperplasia de células intermediárias. **E e F:** IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); **E:** rico infiltrado inflamatório na camada mucosa (estrela preta) e ovo de *S. mansoni* aprisionado na camada submucosa (seta branca). **F:** predomínio de polimorfonucleares no processo inflamatório (estrela preta). **G e H:** IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica); **G:** - Ovos de *S. mansoni* (seta branca) circundados por células

inflamatórias (estrela preta), hiperplasia e hipertrofia de células caliciformes (elipse preta) e células de Paneth (círculo branco); **H**: IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica) - intenso infiltrado inflamatório eosinofílico (estrela preta) e hiperplasia de células caliciformes (elipse preta) e células de Paneth (elipse branca). Coloração: hematoxilina e eosina. A, C, E e G - barra = 100 μm ; B, D, F e H - barra = 50 μm .

Fonte: o autor, 2023.

A topografia do intestino delgado presente na figura 27 mostra vilosidades com epitélio íntegro onde residem enterócitos absorptivos com bordas em escova e células secretoras enteroendócrinas e células caliciformes (Figura 27A e 27B) no grupo CDP. O grupo CDH (Figura 27C e 27D) mostra proliferação de células de Paneth e uma distribuição de células caliciformes por toda camada mucosa. A Figura 27D mostra uma sutil inflamação em parte da camada mucosa.

Figura 27 - Histologia do segmento jejuno de camundongos C57BL/6 não infectados alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.

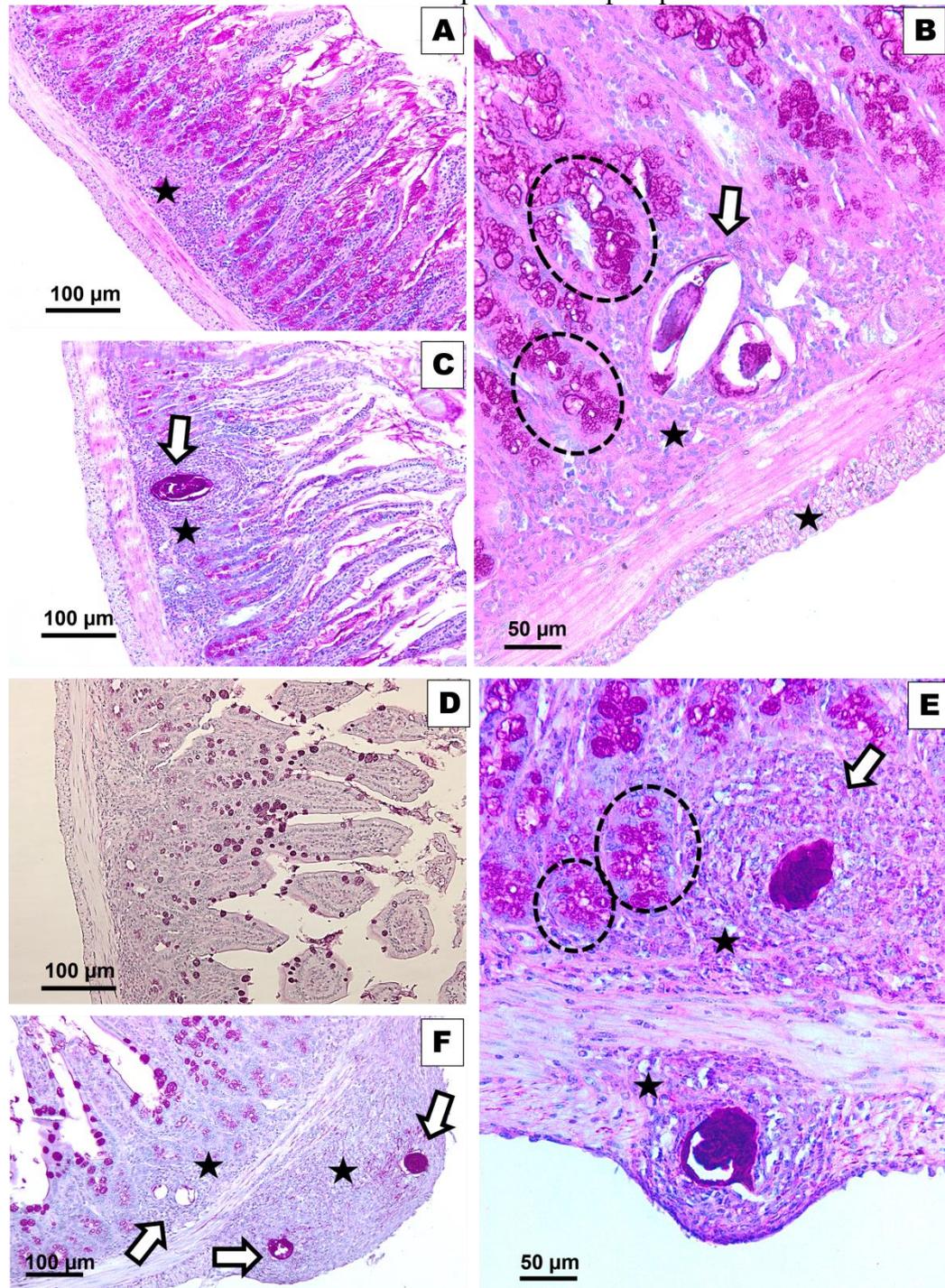


Legenda: Fotografias do segmento jejuno de camundongos C57BL/6 não infectados alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica. **A e B**: CDP (grupo não infectado alimentado com dieta padrão); **A**: células caliciformes (setas pretas) em um tecido íntegro sem nenhuma alteração histológica. **B**: Enterócito com suas bordas em escova (retângulo preto). **C e D**: CDH (grupo não infectado alimentado com dieta hiperlipídica); **C**: discreto aumento de células de Paneth e nas caliciformes (setas pretas). **D**: pequena presença de infiltrado inflamatório próximo às criptas intestinais e células caliciformes (setas pretas). Coloração PAS; barra = 50 μm .

Fonte: o autor, 2023.

Alterações histológicas foram verificadas em IDP (Figura 28A, 28B e 28C) e IDH devido à presença de granulomas periovulares nas camadas mucosa e muscular. A forma aguda da infecção revelou alto grau de inflamação intestinal independente da dieta, contudo, verificamos maiores depósitos de ovos no grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica com granulomas confluentes em ambas as camadas do jejuno. A composição celular era constituída por uma abundância de eosinófilos, poucos macrófagos e neutrófilos e muitas células enteroendócrinas e células caliciformes em IDH (Figura 28D, 28E e 28F).

Figura 28 - Histologia do segmento jejuno de camundongos C57BL/6 infectados com *Schistosoma mansoni* alimentados com dieta padrão ou hiperlipídica.



Legenda: **A, B e C:** IDP (grupo infectado alimentado com dieta padrão); **A:** Rico infiltrado inflamatório na camada mucosa do intestino delgado (estrela preta); **B:** Hiperplasia das células de Paneth (elipses pretas), ovos de *S. mansoni* (seta branca) e infiltrado inflamatório na camada mucosa e muscular; **C:** Granuloma periovarial (seta branca) na camada mucosa com riqueza de células inflamatórias (estrela preta). **D, E e F:** IDH (grupo infectado alimentado com dieta hiperlipídica). **D:** Vilosidades intestinais com proliferação de células caliciformes (cor magenta); **E:** Hiperplasia de células de Paneth (elipses pretas) e granuloma periovariais (seta branca) na camada mucosa e muscular com riqueza de células inflamatórias (estrela preta). **F:** Confluências de granulomas na camada muscular e mucosa (setas brancas), proliferação de células caliciformes e de eosinófilos (estrela preta). Coloração PAS; B e E - barra = 50 µm; A, C, D e F - barra = 100 µm

Fonte: o autor, 2023.

5 DISCUSSÃO

Buscamos investigar neste trabalho como a esquistossomose mansoni, a síndrome metabólica (SM) e a microbiota intestinal impactam na morfologia do jejuno em camundongos C57BL/6.

O modelo C57BL/6 está bem estabelecido na literatura por desenvolver satisfatoriamente a esquistossomose, a obesidade e a síndrome metabólica experimentalmente (FRAULOB et al., 2010; DA SILVA FILOMENO et al., 2020; DA SILVA FILOMENO et al., 2022). Além disso, o uso de roedores, sobretudo camundongos e ratos, possibilita altas taxas reprodutivas, manipulação genética, ciclo de vida curto e redução de custos com alimentação e criação em comparação com outros modelos (FLEMER et al., 2017). Contudo, em relação aos estudos com microbiota, camundongos apresentam menor amostragem tecidual e fecal sustentando perfis microbiológicos mais distintos dos humanos em comparação com modelo de rato (FLEMER et al., 2017; LLEAL et al., 2019).

De certo que uma ração com alto teor de lipídeos é capaz de causar alterações biométricas pelo aumento da massa corporal e índice de adiposidade (SANTOS et al., 2019). Como esperado, a alimentação hiperlipídica induziu a síndrome metabólica em camundongos C57BL/6 (FRAULOB et al., 2010; DA SILVA FILOMENO et al., 2020). O perfil lipídico (TC, TG, LDL-C e VLDL-C) e área sob a curva (AUC) durante o teste de tolerância oral à glicose teste foram maiores nos grupos hiperlipídicos. Muitos estudos corroboram nossos achados (ORNELLAS et al., 2015; HUSSAIN et al., 2016). IDH e IDP (9 semanas de infecção, fase aguda) demonstraram uma diminuição nos níveis de lipídios plasmáticos e parâmetros biométricos, conforme observado em estudos anteriores em Swiss Webster (HULSTIJN et al., 2011; ALENCAR et al., 2012). Recentemente, relatamos que a infecção aguda por *S. mansoni* melhorou a captação periférica de glicose na obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos machos C57BL/6 (DA SILVA FILOMENO et al., 2020; FILOMENO et al., 2022).

Os camundongos infectados alimentados com dieta padrão apresentaram maior carga de ovos de *S. mansoni* no tecido intestinal (oograma), bem como a maturação dos ovos em comparação com os camundongos IDH. Embora não seja significativo, a carga parasitária também foi maior em camundongos IDP do que em IDH, 79 e 69 vermes adultos, respectivamente. IDP apresentou oito fêmeas recuperadas a mais que IDH. Contudo, a razão entre o total de ovos e o número de casais indicou 14, 36 ovos liberados pelo grupo IDH e 12, 59 pelo CDP. Acreditamos que uma baixa recuperação de helmintos possa ter ocorrido em

virtude de uma possível migração dos vermes para os vasos adjacentes que levam sangue para o pâncreas e para o baço.

Estudos anteriores indicam que o diabetes mellitus (DM), característico da SM, pode afetar o perfil da infecção pelo *S. mansoni*, como padrão de oograma, maturação dos ovos e diminuição da produção fecal de ovos (EL-SHENAWY; SOLIMAN, 2002; EL-WAKIL et al., 2002). El-Wakil e colaboradores (2002) revelaram que camundongos C57BL/6J diabéticos (DM1) experimentalmente infectados com estreptozotocina e *S. mansoni* apresentaram redução na excreção de ovos e maturação prejudicada em comparação com grupos diabéticos não infectados. Resultados semelhantes foram encontrados por Thabet et al., (2008), que não observaram diferença na recuperação de vermes adultos, oograma intestinal ou quantidade de ovos nas fezes de camundongos diabéticos e infectados em relação ao seu grupo controle. Contudo, maiores investigações são necessárias para afirmar neste estudo. De certo que, antígenos de ovo solúveis de *S. mansoni* regulam profundamente o sistema imunológico do hospedeiro infectado por meio de um mecanismo complexo (ZACCONE et al., 2009).

Apesar do vasto conhecimento sobre a fisiopatologia da esquistossomose mansoni, pouco se sabe sobre suas implicações na microbiota intestinal no modelo C57BL/6 e sua associação com a SM. Os grupos infectados mostraram uma predominância de Proteobacteria e Firmicutes independentemente da dieta. *Enterobacter cloacae* não foi identificada em IDP e *Klebsiella variicola* apenas em IDH. Em humanos, a *K. variicola* está se tornando um problema de saúde pública, pois além causar infecções, tem potencial para adquirir de genes antimicrobianos e de virulência (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019). Não identificamos esta espécie associada exclusivamente com esquistossomose mansoni ou síndrome metabólica. A bactéria mais comum no trato intestinal, *E. coli*, foi encontrada em todos os grupos. As bactérias desempenham um papel importante no controle do peso corporal e da homeostase energética (BOULANGÉ et al., 2016; ISOLAURI, 2017, LIM et al., 2020). Em camundongos e intestinos humanos, > 90% das espécies bacterianas são compostas dos filos Bacteroidetes e Firmicutes, enquanto Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia estão em proporções relativamente menores. Uma mudança nas espécies totais dos filos (Firmicutes e Bacteroidetes) foi observada, com um aumento em Firmicutes e uma diminuição no filo Bacteroidetes em camundongos e em pacientes com obesidade (KAHN FLIER., 2000; YANG et al., 2017).

O MALDI-TOF MS empregado neste estudo pode ser um importante aliado na identificação de microrganismos, no entanto, alguns desafios importantes devem ser considerados, tais como bases de dados incompletas, parentesco próximo das espécies de

interesse e os meios de cultura utilizados no desenho experimental. A biologia molecular proporciona maior precisão e permite a identificação de um maior número de microrganismos, mas requer mais tempo e recursos financeiros para o seu desenvolvimento.

Estudos demonstraram que a microbiota intestinal em modelos murinos com obesidade, quando comparado com grupos eutróficos, está associada a uma maior diversidade e abundância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes que têm uma maior capacidade de captar energia aumentando o depósito de gordura (KAHN; FLIER., 2000; YANG et al., 2017).

Estudar e compreender esta complexa relação entre saúde e doença e a ecologia intestinal muitas vezes é baseada em amostras fecais, com a vantagem de ser um método cuja coleta não é invasiva, contudo, é incapaz de capturar a diversidade filogenética e funcional microbiana presente ao longo do trato-gastrointestinal (DELBAERE et al., 2023).

O modelo experimental usado no estudo sobre microbiota é fundamental para a compreensão dessa complexa relação entre dieta e esquistossomose. Em seu estudo, Jenkins et al. (2018) utilizaram camundongos *Swiss* para analisar a diversidade da microbiota intestinal na infecção por *S. mansoni*, enquanto em nosso trabalho utilizamos camundongos C57BL/6, configurando um fator para que a microbiota não apresente o mesmo padrão já relatado.

A hibridização *in situ* por fluorescência sugere a ocorrência de translocação bacteriana nos grupos infectados, sobretudo no grupo submetido à dieta hiperlipídica. Sabe-se que esse processo ocorre devido ao aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, estimulado pela dieta, pelo aumento do crescimento bacteriano, a debilitação do sistema imune (HOLZCHEITER et al., 2014) e às lesões causadas pelo ovo de *S. mansoni* durante sua passagem para o lúmen intestinal. As alterações na microbiota intestinal, conhecidas como disbiose, exercem efeitos prejudiciais na saúde do hospedeiro, influenciando as vias metabólicas e a suscetibilidade à síndrome metabólica e às alterações anatomopatológicas.

Estudos sugerem que os helmintos podem ter um impacto na diversidade, estrutura da comunidade bacteriana e função da microbiota intestinal por meio de diferentes mecanismos, incluindo alteração das vias metabólicas imunológicas (BROWN et al., 2012; BROADHURST et al., 2012; GLENDINNING et al., 2014; LEE et al., 2014). Sabe-se que na esquistossomose mansoni Bacteroidetes e Firmicutes são mais abundantes no microbioma intestinal do camundongo. Abundâncias relativas de filos bacterianos foram detectadas em amostras de conteúdo luminal do intestino delgado e grosso de camundongos infectados por *S. mansoni* por 28 e 50 dias (JENKINS et al., 2018).

A expressão das citocinas IL-10, IL-6, MCP-1 e TNF- α em macrófagos peritoneais não teve influência na dieta, mas sim na infecção por *S. mansoni*. Respostas relacionadas a Th1 são induzidas durante o início da esquistossomose aguda (PEARCE et al., 1991; YOUNOSSI et al., 2018), com produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF - α) e produção de interferon (IFN- γ) contra antígenos do helminto (RINER et al., 2013; CHUAH et al., 2014). Níveis elevados de IL-6, IL-10 e TNF- α podem ser protetores contra esquistossomose hepatoesplênica grave em humanos (MUTENGO et al., 2018). A MCP-1 é encontrada em níveis elevados nas infecções por *S. mansoni* na fase aguda. A MCP-1 influencia a infiltração de células inflamatórias e a celularidade que ocorre na resposta granulomatosa ao redor dos ovos (SILVEIRA-LEMOS et al., 2010).

Provavelmente, o grupo CDH foi influenciado pela dieta, alterando seu microambiente intestinal. A dieta hiperlipídica afeta diretamente as respostas do hospedeiro e pode influenciar o grau de absorção de gordura (HAMILTON et al., 2015; MARTINEZ-GURYN et al., 2018). O epitélio do intestino delgado é composto de criptas, contendo células em proliferação, células de Paneth diferenciadas terminalmente e algumas células caliciformes, células enteroendócrinas e vilosidades compostas por enterócitos diferenciados e células caliciformes (CHENG E LEBLOND, 1974). Sabe-se que uma dieta hiperlipídica é capaz de modular inflamação podendo afetar a estrutura intestinal (DANG et al., 2023).

As células de caliciformes produzem grande parte do muco intestinal. Esse muco é rico em proteínas e peptídeos antibacterianos que atuam como barreira principalmente em locais de grande vulnerabilidade. Esses peptídeos antimicrobianos protegem o hospedeiro de patógenos entéricos, ajudam a moldar a composição da microbiota colonizadora e protegem contra a translocação bacteriana (CLEVERS et al., 2013; LUESCHOW et al., 2020). Sabe-se que essas células contribuem para a resposta intestinal inata e para a regulação da microbiota intestinal com a produção de lisozima, α -defensinas, entre outras, que são microbicidas altamente eficazes (KIERSZENBAUM, 2016).

A parede celular bacteriana gram-negativa contém lipopolissacarídeo (LPS) que pode penetrar o epitélio intestinal devido a alterações na permeabilidade da mucosa intestinal causadas por uma dieta rica em gordura (CANI et al., 2007; CANI et al., 2008). Uma dieta rica em gordura modifica a microbiota intestinal e inicia inflamação de baixo grau, resistência à insulina e diabetes tipo 2. O LPS bacteriano pode causar endotoxemia e inflamação (AMAR et al., 2011; MOSZAK et al., 2020).

Dietas hiperlipídicas e associadas à esquistossomose *mansonii* resultam em danos a órgãos, incluindo fígado, baço, coração, pulmão e rins (ALENCAR et al., 2012; SILVA et al., 2012; CORRÊA et al., 2013; DA SILVA FILOMENO et al., 2020). Dieta rica em gordura é capaz de alterar a morfologia intestinal (CAMPBELL et al., 2016). Embora em IDP tenhamos recuperados mais vermes, principalmente fêmeas, o grupo IDH apresentou alteração das vilosidades e formação de vários granulomas, hiperplasia e hipertrofia de células de Paneth, células calciformes e camada mucosa mais espessa que todos os outros grupos. Neste estudo, o dano ao tecido intestinal pode ser o resultado de inflamação (TROBOJEVIĆ-STANKOVIĆ et al., 2010) devido a ovos retidos no intestino em camundongos.

A dieta rica em gordura e a infecção contribuem para o aumento da permeabilidade intestinal e da inflamação (CANI et al., 2007; ALENCAR et al., 2012). A perda de integridade torna o epitélio intestinal mais permeável a lipopolissacarídeos microbianos (LPS) e outros metabólitos que na circulação levam à inflamação dos tecidos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, resistência à insulina e outras condições associadas à SM (DABKE et al., 2019; MOSZAK et al., 2020). Estes últimos autores mostraram que uma dieta hiperlipídica e a infecção esquistossomótica aguda ou crônica têm impacto significativo na arquitetura do intestino delgado em camundongos Swiss Webster. Em nossos achados, também encontramos alterações na fase aguda em C57BL/6 e podem ser influenciadas pela microbiota intestinal que neste estudo apresentou Proteobacteria e Firmicutes.

Alterações morfológicas e histológicas decorrentes de patógenos e/ou dietas são capazes de interromper a homeostase intestinal que interfere a ecologia microbiana podendo levar à adaptação do tecido intestinal caracterizada por dilatação, aumento da área de comprimento das vilosidades, aumento do número de calciformes e elevadas permeabilidade do epitélio intestinal (BILLIAUWS et al., 2018; DELBAERE et al., 2023). No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a relação entre a microbiota intestinal e a síndrome metabólica na esquistossomose.

A maior parte das bactérias que colonizam o intestino são anaeróbias que podem atingir o número de 10^{11} UFC/g de fezes (BEZIRTOGLOU., 1997). Contudo, a identificação de bactérias anaeróbias requer métodos complicados, demorados e laboriosos uma vez que a maior parte da contagem de bactérias é efetuada em meios seletivos (AMANN et al., 1991). Aqui, o MALDI-TOF atingiu seu objetivo na identificação de espécimes e gêneros de procaríotos, entretanto, o uso de ferramentas moleculares com base na detecção do RNA ribossômico e seus genes no estudo da ecologia microbiana nas condições experimentais aqui

propostas, esquistossomose mansoni e síndrome metabólica, tornam possível estudar de forma mais robusta a composição microbiana.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acreditamos que este estudo possibilitará compreender a patologia da esquistossomose mansoni na síndrome metabólica e a relação com a microbiota intestinal que pode deixar o quadro infeccioso mais difícil podendo, possivelmente, influenciar até no tratamento. De certo, verificamos que a esquistossomose associada à síndrome metabólica é capaz de carrear bactérias para tecidos adjacentes podendo colaborar para o processo inflamatório que os antígenos solúveis do ovo são capazes de causar. Este estudo pode fornecer uma ferramenta útil para estudos futuros. No entanto, ainda é necessário elucidar várias questões para compreender claramente a interação entre esquistossomose mansoni, síndrome metabólica, microbiota e distúrbio intestinal visto que existem diferenças entre as populações e diversos fatores que contribuem para variações da ecologia das comunidades microbianas e para o estabelecimento da esquistossomose mansoni. Portanto, são necessários mais estudos para ampliar esse conhecimento, o que pode abrir caminho para a melhor compreensão da interação entre o microbioma do intestino na esquistossomose em indivíduos com síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

- ABDELHALIM, M. A. K.; JARRAR, B. M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 1, p. 160-166. 2011.
- ABDELMALEK, M. F.; DIEHL, A. M. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. **Medical Clinics of North America**, v. 9, p.1125-1149. 2007.
- ALENCAR, A.C.M.B, NEVES, R.H.; ÁGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA ,C.A.; GOMES, D.C.; MACHADO-SILVA, J.R. High-fat diet has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 608-613. 2009.
- ALENCAR, A.C.M.B.; NEVES, R.H.; OLIVEIRA, A.V, MACHADO-SILVA, J.R. Changes in the small intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice fed a high-fat diet. **Parasitology**, v. 139, p. 716-725. 2012.
- AMANN, R. et al. Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. **Nature**, v. 351, p. 161-164, 1991.
- ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of pipe-stem fibrosis of the liver (experimental observation on murine schistosomiasis). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, P; 325-334, 1987.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 656-663. 2009.
- ANTFOLK, M.; JENSEN, K. B. A bioengineering perspective on modelling the intestinal epithelial physiology in vitro. **Nature Communications**, v. 11, p. 6244, 2020.
- ANTHONY, B. J., RAMM, G. A., MCMANUS, D. P. "Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis", **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 572–579, 2012.
- ARIADNA, J. A. et al. Acompanhamento do ciclo de vida de *Schistosoma mansoni* (PLATYHELMINTHES: TREMATODA) em condições laboratoriais. *Revista de Biologia e Ciências da terra*, v. 1, n. 2, 2001.
- BÄCKHED, F., DING, H., WANG, T., *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2 nov. 2004.
- BÄCKHED, F., MANCHESTER, J. K., SEMENKOVICH, C. F., *et al.* Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 979–984, 16 jan. 2007.
- BALOG, C. I. A., MEISSNER, A., GÖRALER, S., *et al.* Metabonomic investigation of human *Schistosoma mansoni* infection, **Molecular BioSystems**, v. 7, n. 5, p. 1473, 2011.

BANSAL, D.; BHATTI, H. S.; SEHGAL, R. Lipids in Health and Disease. Role of cholesterol in parasitic infections. **Lipids in Health and Disease**, v.4, n.10. 2005.

BARBOSA-DA-SILVA, S.; FRAULOB-AQUINO, J.C.; LOPES, J.R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; AGUILA, M.B. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. **PLoS One**, 7 (7):e39837, 2012.

BARROS, L. A., NEVES, R. H., DE MOURA, E. G., *et al.* "Effects of low-protein diet on *Schistosoma mansoni* morphology visualized by morphometry and confocal laser scanning microscopy", **Journal of Helminthology**, v. 83, n. 01, p. 13, 10 mar. 2009.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, London, v. 40, n. 4, p. 527-528, Apr. 1968.

BEZIRTOZGLU, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. **Anaerobe**, v. 3, p. 173-177, 1997.

BHATTACHARJEE, S., KALBFUSS, N., PRAZERES DA COSTA, C. "Parasites, microbiota and metabolic disease", **Parasite Immunology**, v. 39, n. 5, p. e12390, maio 2017.

BIBBÒ, S., IANIRO, G., GIORGIO, V., *et al.* The role of diet on gut microbiota composition, **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 22, p. 4742–4749, 2016.

BILLIAUWS, L. *et al.* Intestinal adaptation in short bowel syndrome. What is new? **Nutrición Hospitalaria**, v. 35, p. 731-737, 2018.

BOOTH, M.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; KADZO, H.; *et al.* Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES depending on age and gender. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 1295–1303. 2004.

BOTTIEAU, E.; CLERINX, J.; DE VEGA, M. R.; VAN DEN ENDEN, E.; *et al.* Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. **Journal of Infection**, v. 52, p. 339–45. 2006.

BOULANGÉ, C. L., NEVES, A. L., CHILLOUX, J., *et al.* "Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease", **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2014.

CAESAR, R.; TREMAROLI, V.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; CANI, P.D.; BÄCKHED, F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. **Cell Metab.** 2015, 22, 658–668.

CARICILLI, A.; CASTOLDI, A.; CÁMARA, N. Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. **World Journal Gastrointest Pathophysiol.**

CHANDRA, R. K. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 80, n. 374, p. 129 – 132. 1991.

CHEEVER, A. W.; LENZI, J. A.; LENZI, H. L.; ANDRADE, Z. A. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 917-940. 2002.

COELHO, P. M.; RASO, P.; MELLO, R. T.; TOPPA, N. H. Size of hepatic granuloma produced by eggs of 2 geographic strains of *Schistosoma mansoni*, in mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n.2, p.213-7. 1989.

COLLEY, D. G., BUSTINDUY, A. L., SECOR, W. E., *et al.* "Human schistosomiasis", **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, jun. 2014. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673613619492>. Acesso em: 18 jun. 2022.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A.; L., SECOR, W. E., KING, C. H. Human schistosomiasis. **The Lancet**. 383, 2253–2264. 2014.

COLLINS, J.T.; BADIREDDY, M. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. In: **StatPearls**. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). 2019.

CORTÉS, A.; TOLEDO, R.; CANTACESSI, C. "Classic Models for New Perspectives: Delving into Helminth–Microbiota–Immune System Interactions", **Trends in Parasitology**, v. xx, 2018..

COSTAIN, A. H., MACDONALD, A. S., SMITS, H. H. **Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses**. **Frontiers in immunology**. [S.l.: s.n.], 2018.

COSTA-SILVA, M.; RODRIGUES-SILVA, R.; HULSTIJN, M.; NEVES, R. H.; PANASCO, M. S.; LENZI, H. L.; MACHADO-SILVA, J. R. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 129-142. 2002.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, supl. 1, p. 13-19. 2004.

COUTINHO, E. M. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99 (Suppl. I), p. 85-92. 2004.

COUTINHO, E. M.; BARROS, A. F.; BARBOSA, JR. A.; OLIVEIRA, A. S.; SILVA, L. M.; ARAÚJO, R. E.; ANDRADE, Z. A. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 919-925. 2003.

COUTINHO, E. M.; SILVA, F. L.; BARROS, A. F.; ARAÚJO, R. E.; OLIVEIRA, S.A.; LUNA, C. F.; BARBOSA JR, A. A.; ANDRADE, Z. A. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Tropica.**, v. 101, p. 15-24. 2007.

DA SILVA FILOMENO, C. E., COSTA-SILVA, M., CORRÊA, C. L., *et al.* "The acute schistosomiasis mansoni ameliorates metabolic syndrome in the C57BL/6 mouse model", **Experimental Parasitology**, v. 212, n. 2020, p. 1–6, maio 2020.

DELBAERE, K. et al. The small intestine: dining table of host-microbiota meetings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 3, fuad022, 2023.

DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, p. 881-887. 2006.

DIETERICH, W.; SCHINK, M.; ZOPF, Y. Microbiota in the gastrointestinal tract. *Med. Sci. (Basel)* 2018, 6, 116.

DIMENSTEIN, R.; CARVALHO, V. C. O.; OLIVEIRA, D. N. G.; GILLET, M. P. T. Alterations in the levels and composition of plasma lipoproteins (VLDL, LDL AND HDL) in brazilian patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 1091-1102. 1992.

DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Ed. UFPE, cap. 5, p. 91–105. 1994.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, p.1415-1428. 2005.

ELBAZ, T., ESMAT, G. "Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review", **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 445–452, set. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685451>. Acesso em: 23 jul. 2021.

EL-SHENAWY, N., SOLIMAN, M. On The Interaction between Induced Diabetes Mellitus and Schistosomiasis: Mechanism and Protection. **The Egyptian Journal of Hospital Medicine**, 8(1), 18-31. 2002.

EL-WAKIL HS, ABOUSHOUSA TS, EL HADDAD O, GAMIL NB, MANSOUR T, EL-SAID H. Effect of *Schistosoma mansoni* egg deposition on multiple low doses streptozotocin-induced insulin-dependent diabetes. **J Egypt Soc Parasitol**, 2002, 32(3), 987-1002.

FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 1, p. 29-35. 2000.

- FILOMENO, C. E. DA S. et al. A high-fat diet and schistosomiasis mansoni cause histological changes in mice livers. **Brazilian Journal of Health and Biomedical Sciences**, v. 21, n. 2, p. 101–110, 2022.
- FLEMER, B. et al. Fecal microbiota variation across the lifespan of the healthy laboratory rat. **Gut Microbes**, v. 8, p. 428-439, 2017.
- FLOUDAS, A., AVIELLO, G., SCHWARTZ, C., *et al.* "Schistosoma mansoni Worm Infection Regulates the Intestinal Microbiota and Susceptibility to Colitis", **Infection and Immunity**, v. 87, n. 8, p. 1–11. 2019.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem.**, 1972, 18 (6), 499–502.
- GADJA, A. M; PELLIZON, M. A; RICCI, M. R; ULMAN, E. A. Diet-induced metabolic syndrome in rodent model. **Animal Lab News**. 2007.
- GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M.S.; RABÈS, J.P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C., *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity**. (Silver Spring), 15 (8), 1996-2005. 2007.
- GARBA DJIRMAY, A., MONTRESOR, A. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2015. WHO. 49/50(91), 585–600, 2016.
- GLENDINNING, L., NAUSCH, N., FREE, A., *et al.* "The microbiota and helminths: sharing the same niche in the human host", **Parasitology**, v. 141, n. 10, p. 1255–1271. 2014.
Disponível em:
https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182014000699/type/journal_article.
- GOLABI, P.; OTGONSUREN, M.; CABLE, R.; FELIX, S.; *et.* Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) is associated with impairment of Health Related Quality of Life (HRQOL). **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 14, n. 1, p. 18, 2016.
- GRUNDY, S.M. Metabolic syndrome pandemic. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 28, p. 629- 636. 2008.
- GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.
- GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin N Am.**, v. 26, p. 383–397, 2012.
- GUIGAS, B.; MOLOFSKY, A. B. A worm of one's own: how helminths modulate host adipose tissue function and metabolism. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. p. 9, p. 435-441. 2015.
- HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers Immunology**, v. 89, p.1-8. 2013.
- HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease**. v. 6, p.425-56. 2011.

HILL, D.A, ARTIS, D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. **Annu Rev Immunol** 2010;28:623-67.

HOLZSCHEITER, M.; LAYLAND, L. E.; LOFFREDO-VERDE, E.; *et al.* "Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis", **Clinical and Experimental Immunology**, v. 175, n. 2, p. 246–257. 2014.

HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: The great neglected tropical diseases. *J. Clin. Invest.* 118, 1311–1321. 2008.

HUANG, P. L. "AT A GLANCE A comprehensive definition for metabolic syndrome", v. 237, p. 231–237, 2009.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease Models & Mechanisms**. v. 2, n.6, p. 231-237. 2009.

ISOLAURI, E., "Microbiota and Obesity". **Intestinal Microbiome: Functional Aspects in Health and Disease**, v. 88. p. 95–105. 2007.

JENKINS, T. P., PEACHEY, L. E., AJAMI, N. J., *et al.* "*Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota", **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12072, 13 dez. 2018b. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-30412-x>.

JOVICIC, N., JEFTIC, I., JOVANOVIC, I., *et al.* "Differential immunometabolic phenotype in Th1 and Th2 dominant mouse strains in response to high-fat feeding", **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–21, 2015.

KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 473-481, 2000.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. 2018. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0208>.

KATZ, N.; Chaves, A.; Pellegrino, J. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 14 (6), 397-400.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. **Revista do Instituto de Medicina. tropical de. São. Paulo.**, v. 35, p. 399–404, 1993.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; KERR, I. B.; ANTUNES, S. L.; MOTA, E. M.; OLIVEIRA, D. N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 86, n.3, p. 77-90. 1991.

LEY R.E.; BÄCKHED F.; TURNBAUGH P.; LOZUPONE C.A.; KNIGHT R.D.; GORDON J.I. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11070-5.

LIÉVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 315-337, 2006.

LIM, R.; CABATBAT, J. J. T.; MARTIN, T. L. P.; *et al.* "Large-scale metabolic interaction network of the mouse and human gut microbiota", **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 204, 26 dez. 2020.

LIMA, V. L. M.; SENA, V. L. M.; STEWART, B.; OWEN, J. S.; DOLPHIN, P. J. An evaluation of the marmoset *Callitix jacchus* (sagui) as an experimental model for dyslipoproteinemia of human Schistosomiasis mansoni. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1393, p. 235-243. 1998.

LLEAL, M. *et al.* A single faecal microbiota transplantation modulates the microbiome and improves clinical manifestations in a rat model of colitis. **EBioMedicine**, v. 48, p. 630-641, 2019.

LUESCHOW, S. R.; MCELROY, S. J. The paneth cell: the curator and defender of the immature small intestine. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 587, 2020.

MACGREGOR, A. N.; KUSEL, J. R. Isolation and characterisation of a surface membrane glycoprotein from adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 34, p. 237-244, 1989.

MARCHESE, V.; BELTRAME, A.; ANGHEBEN, A.; MONTEIRO, GB.; *et al.* Schistosomiasis in immigrants, refugees and travellers in an Italian referral centre for tropical diseases. **Infect Dis Poverty**, 7 (1), 55. 2018.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, G.; CERRELLI, F.; LENZI, M.; *et al.* Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. **Hepatology**, v. 37, p. 917-923. 2003.

MARTINEZ, E. M.; NEVES, R. H.; OLIVEIRA, R. M. F.; MACHADO-SILVA, J. R.; REY, L. Parasitological and morphological characteristics of Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* in *Mus musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 557-564. 2003.

MEIRA, D. A. Interactions of infection, nutrition, and immunity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 4, p. 315-319. 1995.

MEYER, F.; MEYER, H.; BUEDING, E. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flat worms *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 21, p. 257-266. 1970.

MIRANDA, M.A.; KUEHN, C.C.; CARDOSO, J.F.R.; OLIVEIRA, L.G.R.; MAGALHÃES, L.G.; TIOSSI, R.F.J., *et al.* Immunomodulatory effect of the alkaloidic extract of Solanum lycocarpum fruits in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.** 133, 396–402. 2013.

MOSZAL, M., SZULINSKA, M., BGDANSKI, P. "You Are What You Eat — The Relationship between", **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1–30, 2020.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. **Annu Rev Med.** 62:361–80. 2011.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana.** 11^a ed.; São Paulo: Atheneu, 2005.

NEVES, R. H. ALENCAR, A. C. M.B. et al. Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. **Journal of Helminthology**, v. 81, n. 4, p. 361–368, 2007 a.

NEVES, R. H.; ALENCAR, A. C. M. B.; COSTA-SILVA, M.; ÁGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; MACHADO-SILVA, J. R.; GOMES, D. C. Long-term feeding a high fat diet causes histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 324-332. 2007b.

NØHR, M.K.; PEDERSEN, MH.; GILLE, A.; EGEROD, K.L.; ENGELSTOFT, MS.; HUSTED, A.S.; et al. GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. **Endocrinology** 2013; 154:3552-64.

ONGURU D, LIANG Y, GRIFFITH Q, NIKOLAJCZYK B, MWINZI P, GANLEY-LEAL L. Human schistosomiasis is associated with endotoxemia and Toll-like receptor 2- and 4-bearing B cells. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:321–4.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 499 – 511. 2002.

PROD'HOM, G.; BIZZINI, A.; DURUSSEL, C. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. **J Clin Microbiol**, 48(4):1481–3. 2010.

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M. , DE VOS, W. M. "The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota", **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 996–1047, 2014.

RAMOS, T. M. B.; VASCONCELOS, A. S.; CARVALHO, V. C. O.; LIMA, V. L. M. Alterações nos níveis de colesterol, triglicérides e fosfolípídeo total em plasma de *Callithrix jacchus* (sagui) reinfestado por *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 37- 40. 2004.

RASO, G; VOUNATSOU, P; MCMANUS, D. P; N'GORAN, E. K; UTZINGER, J. A. Bayesian approach to estimate the age-specific prevalence of *Schistosoma mansoni* and implications for schistosomiasis control. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1491-1500. 2007.

RASO, G; VOUNATSOU, P; MCMANUS, D. P; N'GORAN, E. K; UTZINGER, J. A. Bayesian approach to estimate the age-specific prevalence of *Schistosoma mansoni* and implications for schistosomiasis control. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1491-1500. 2007.

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

RESCIGNO, M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011; 32:256-64.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3ª ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M.; FRANCESCHI, F.; MIGGIANO, G.A.D.; GASBARRINI, A.; MELE, M.C. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms** 2019, 7, 14.

RIZZO, A. C. B.; GOLDBERG, T. B. L.; SILVA, C.C.; KUROKAWA, C. S.; NUNES, H. R. C.; CORRENTE, J. E Metabolic syndrome risk factors in overweight, obese, and extremely obese Brazilian adolescents. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 19, p. 1-7. 2013.

ROCHA, M. O.; ROCHA, R. L.; PEDROSO, E. R. et al. Pulmonary manifestations in the initial phase of schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 311–18. 1995.

RODRÍGUEZ-MEDINA, N.; BARRIOS-CAMACHO, H.; DURAN-BEDOLLA, J.; GARZA-RAMOS, U. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. **Emerg Microbes Infect.** 8(1):973-988. 2019.

ROGERS, M. V. Do Parasites express receptors for host lipoproteins? **Parasitology Today**, v. 7, p. 117-120, 1991.

RÖSER, D.; BJERRUM, S.; HELLEBERG, M.; NIELSEN, H. V.; DAVID, K. P.; THYBO, S.; STENSVOLD, C. R. Adventure tourism and schistosomiasis: serology and clinical findings in a group of Danish students after white-water rafting in Uganda. **JMM case reports**, 5(4), e005141. 2018.

RUFFER, M. Note on the presence of “*Bilharzia haematobia*” in Egyptian mummies of the twentieth dynasty. **Br Med J**, 1, p. 16, 1910.

RUTITZKY, L. I.; MIRKIN, G. A.; STADECKER, M. J. Apoptosis by Neglect of CD4 + Th Cells in Granulomas: A Novel Effector Mechanism Involved in the Control of Egg-Induced Immunopathology in Murine Schistosomiasis, **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 4, p.1859-1867. 2003.

SAMUEL, B.S.; SHAITO, A.; MOTOIKE, T.; REY, FE.; BACKHED, F.; MANCHESTER, J.K.; et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 105:16767–72. 2008.

SANDERS, E. R. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. **J Vis Exp**, (63):064. 2012.

SANTOS-MARCOS, J. A., PEREZ-JIMENEZ, F., CAMARGO, A. "The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome", **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 70, p. 1–27, 2019.

SCHWARTZ, C., FALLON, P. G. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. **Frontiers in immunology**. 9, 2492, 2018

SCHWARTZ, C., OESER, K., PRAZERES DA COSTA, C., *et al.* "T Cell–Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal *Schistosoma mansoni* Infection Independently of Basophils", **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 7, p. 3590–3599, 2014.

STADECKER, M. J.; ASAH, H.; FINGER, E.; HERNANDEZ, H. J.; RUTITZKY, L. I.; SUN, J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 201, p. 168-169. 2004.

STEINMANN, P; KEISER, J; BOS, R; TANNER, M; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infectious Disease**, v. 6, p. 411-425. 2006.

STEWART, D.; FULTON, W. B.; WILSON, C.; MONITTO, C. L.; PAIDAS, C. N.; REEVES, R. H.; DE MAIO, A. Genetic contribution to the septic response in a mouse model. **Shock**. v. 18, n. 4, p. 342–347. 2002.

SWINBURN, B. A; SACKS, G; HALL, K. D.; MCPHERSON, K.; FINEGOOD, D. T; MOODIE, M. L; *et al.* The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. **Lancet**, v. 378, p. 804-814. 2011.

TACCHINO, R. M. Bowel length: measurement, predictors, and impact on bariatric and metabolic surgery. **Surgical Obesity and Related Diseases**, v. 11, p. 328-334, 2015.

TAKAHASHI, Y.; SOEJIMA, Y.; FUKUSATO, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 19, p. 2300–2308, 2012.

TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**. 444:1027–31, 2006.

VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annual Review of Physiology**, v. 71, p. 241-260, 2009.

VELLA, A. T.; HULSEBOSCH, M. D.; PEARCE, E. J. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen- responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 sub- set differentiation is evident at the precursor level. **The Journal of Immunology**, v.149, p.1714–1722. 1992.

VITORINO, R. R; SOUZA, F. P. C; COSTA, A. P; FARIA JÚNIOR, F. C; SANTANA, L. A; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, p. 39-45. 2012.

WANG, Y., HOLMES, E., NICHOLSON, J. K., *et al.* "Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: An approach for biomarker identification", **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 34, p. 12676–12681, 24 ago. 2004.

WILLIAMS, G. T; WILLIAMS, W. J. Granulomatous inflamations: a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, n. 7, p. 723-33, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Schistosomiasis. Fact sheet 115. World Health Organization, Geneva, 2014. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/> > Acessado em 17 de jun. de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva. 2013. Disponível em: <
http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/>. Acessado em 17 de jun. de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis [Internet]. [acesso em 4 nov 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.

WYNN, T. A.; ELTOUM, I.; CHEEVER, A. W.; LEWIS, F. A.; GAUSE, W. C.; SHER, A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, p. 1430-1440, 1993.

YANG, B. G., HUR, K. Y., LEE, M. S. **Alterations in gut microbiota and immunity by dietary fat**. **Yonsei Medical Journal**. 58(6), 1083–1091, 2017.

YATSUNENKO T, Rey FE, Manary MJ *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, 486: 222-227. 2012.

ZAISS, MM and Harris NL. Interactions between the intestinal microbiome and helminth parasites. **Parasite immunology**, 38: 5-11. 2016.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M.; KAUFMAN, F.; TAJIMA, N.; *et al.* Consensus Group: The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. **Pediatric Diabetes**, v. 8, p. 299–306. 2007.