



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Aline Aparecida da Rosa

**Associação da esquistossomose mansônica e diabetes mellitus tipo 1 em
modelo murino experimental: novas perspectivas sobre o impacto no
parasito e no tecido hepático**

Rio de Janeiro

2024

Aline Aparecida da Rosa

Associação da esquistossomose mansônica e diabetes mellitus tipo 1 em modelo murino experimental: novas perspectivas sobre o impacto no parasito e no tecido hepático

Tese apresentada, como requisito 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.

Orientadora: Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

Rio de Janeiro

2024

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

R789 Rosa, Aline Aparecida da.

Associação da esquistossomose mansônica e diabetes mellitus tipo 1 em modelo murino experimental: novas perspectivas sobre o impacto no parasito e no tecido hepático / Aline Aparecida da Rosa. - 2024.

81 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves

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

1. Diabetes Mellitus Tipo 1 – Induzido quimicamente – Teses. 2. Esquistossomose mansoni – Patologia – Teses. 3. *Schistosoma mansoni* – Anatomia e histologia – Teses. 4. Fígado – Patologia – Teses. I. Neves, Renata Heisler. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.995.1

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

Aline Aparecida da Rosa

Associação da esquistossomose mansônica e diabetes mellitus tipo 1 em modelo murino experimental: novas perspectivas sobre o impacto no parasito e no tecido hepático

Tese apresentada, como requisito 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 09 de dezembro de 2024.

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Renata Heisler Neves (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Alba Cristina Miranda de Barros Alencar

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Filomeno

Fundação Centro de Ciências e Educação Superior à Distância do
Estado do RJ

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe Jonice, que apesar do curtíssimo tempo que tivemos juntas, se mantém sempre no meu coração. À minha tão amada avó Catarina, o ser humano mais maravilhoso com quem tive o prazer de conviver. E, à minha bebezinha Luísa, que me ilumina todos dos dias, com seu jeito meigo e olhar apaixonante.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu infinito amor e cuidado em minha vida.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ por possibilitar a elaboração deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação pela bolsa disponibilizada.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro de parte desse projeto.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Renata Heisler Neves, pela oportunidade de aprender e conviver com uma pesquisadora de referência. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado durante esses anos.

À Dr^a Luciana Brandão-Bezerra, agradeço imensamente pelo conhecimento compartilhado, pela amizade e por todo suporte, principalmente, por ser sempre uma pessoa tão solícita e disposta a ajudar. Muito obrigada “Lu”!

Aos amigos: Bruno Moraes, Carlos Eduardo, Ingrid Mendes, Joana Bernardo, Juliana Lima, Karine Gomes, Luiz Roberto, Magda Sanches e Thainá de Mello. Não tenho palavras suficientes para expressar minha gratidão por ter convivido com pessoas tão incríveis, inteligentes, amorosas e sempre dispostas a apoiar. Vocês sem dúvida tornaram os meus dias nessa jornada, que se iniciou em 2016, muito melhores! Obrigada pela companhia nessa caminhada, sem a parceria e amizade de vocês, o caminho teria sido muito mais difícil! Sigamos apoiando uns aos outros por mais algumas décadas.

À professora Dra. Christiane Leal Corrêa pela sua disponibilidade e seu auxílio, fundamental nas análises histopatológicas.

À Dra. Vanessa Coelho De Góes Herdy por toda contribuição na parte experimental deste trabalho.

Aos técnicos e biólogos do Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto, Kaio e Regina por dedicarem seu tempo e suas habilidades no auxílio em diversas etapas da pesquisa.

Aos técnicos Peterson, Ander e Júlia por auxiliarem no processamento do material para a microscopia eletrônica de varredura.

Ao técnico Gustavo pelo auxílio no uso do microscópio eletrônico de varredura.

À Plataforma de Microscopia Confocal e Superresolução (RTT07A), Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz (RPT), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, pela disponibilidade em analisar o material desta pesquisa.

Aos demais professores, alunos e técnicos da Disciplina de Parasitologia, Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia/FCM/UERJ, obrigada por manterem este ambiente sempre amistoso e de muita aprendizagem diária.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médico Humana por todo apoio nesta pesquisa.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa: Prof^a. Dr^a Thaís Porto Amadeu, Prof^a. Dr^a Alba Cristina Miranda de Barros Alencar, Prof^a. Dr^a. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva, Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Filomeno, Prof^a Dra^a Fernanda Barbosa de Almeida da Cunha, Prof^a Dra^a Michele Costa-Silva, e Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva. Suas valiosas contribuições e o tempo dedicado foram fundamentais para o aprimoramento e sucesso da minha pesquisa.

À toda minha família pelo apoio e torcida, mesmo à distância. Em especial, à minha filha Luísa, que nasceu durante o curso e que se tornou a luz da minha vida, e ao meu marido Jackson, por todo apoio e companheirismo. Amo vocês.

Por fim, a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

Para o desejo do meu coração, o mar é uma gota.

Adélia Prado

RESUMO

ROSA, Aline Aparecida da. **Associação da esquistossomose mansônica e diabetes mellitus tipo 1 em modelo murino experimental**: novas perspectivas sobre o impacto no parasito e no tecido hepático. 2024. 81 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Este trabalho tem como objetivo compreender a associação entre a infecção pelo helminto *Schistosoma mansoni* e o diabetes mellitus tipo 1, induzido por estreptozotocina (STZ), estudando as alterações nos helmintos e no fígado. Para tal, foram utilizados camundongos Swiss Webster machos, com 9 semanas de vida, divididos em 4 grupos (n por grupo = 10). Para a indução do diabetes mellitus, 20 destes animais receberam 100mg/kg de STZ, por via intraperitoneal e 10 dias depois da aplicação, os animais que apresentaram glicemia > 200 mg/dL, foram considerados diabéticos. Após 30 dias, os animais ($n=20$) foram infectados por *S. mansoni*, por via subcutânea (± 80 cercarias por animal). Obteve-se então, os seguintes grupos de estudo: Grupo CS- animais não infectados e não diabéticos; Grupo I, animais infectados com *S. mansoni*; Grupo D, animais diabéticos; e Grupo DI, animais diabéticos e infectados pelo *S. mansoni*. A eutanásia ocorreu na nona semana de infecção, onde retirou-se o fígado, que foi submetido ao processamento histológico de rotina. Cortes histológicos obtidos foram corados por H&E, Tricrômico de Masson e Picrossirius Red, e analisados por histopatologia, métodos quantitativos (D36, quantificação de células e colágeno) e morfometria dos granulomas. Os helmintos adultos foram retirados do sistema porta e das veias do mesentério, separados por sexo, fixados em AFA e corados por Carmim Clorídrico, os sexos, por microscopia de campo claro, MEV e Confocal. Ao analisarmos os helmintos machos do Grupo DI notou-se tegumento mais espesso do que os espécimes do Grupo I (+43%; $p=0,001$), lobos testiculares com alterações em sua morfologia, e espaços vazios entre as células. Nas fêmeas, o ovário estava com área maior do que no Grupo I (+21%; $p=0,0150$), com oócitos que apresentavam variação do tamanho celular, pleomorfismo (formatos triangulares e retangulares) e espaços vazios entre eles. Na análise histopatológica do fígado observou-se extensas áreas de necrose, diversos granulomas em confluência, desnaturação de endonucleases no núcleo dos hepatócitos (visto também no Grupo D), células com degeneração hidrópica, microesteatose hepática e finalmente, hiperemia nos vasos e capilares. A esteireologia apontou decréscimo no volume de hepatócitos do Grupo DI (-15%; $p=0,008$), e das células de Kupffer (-40%; $p=0,026$), e aumento do infiltrado celular (+200%; $p=0,0151$) comparados aos Grupos CS, I e D, respectivamente. Avaliando a remodelação hepática, notou-se uma diminuição significativa de hepatócitos mononucleados e binucleados no Grupo DI comparando-o aos Grupos D e I. Não foram encontradas diferenças nas medidas de área e perímetro dos granulomas, no entanto a produção de colágeno foi 76% maior no Grupo DI comparado ao Grupo I ($p=0,0159$). Concluiu-se neste trabalho, que o diabetes mellitus tipo 1 modificou alguns parâmetros da infecção esquistossomótica, entre eles: a espessura do tegumento dos helmintos machos; o sistema reprodutor de machos e fêmeas; a desestruturação organizacional no tecido hepático que ocorre na esquistossomose e; a deposição de colágeno nos granulomas esquistossomóticos.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; morfologia dos vermes; diabetes mellitus; fígado; histopatologia.

ABSTRACT

ROSA, Aline Aparecida da. *Association of schistosomiasis mansoni and type 1 diabetes mellitus in an experimental murine model: new perspectives on the impact on the parasite and liver tissue*. 2024. 81 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

This study aims to understand the association between infection by the helminth *Schistosoma mansoni* and type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin (STZ) by studying the changes in the helminths and liver. For this purpose, male Swiss Webster mice, 9 weeks old, were divided into 4 groups (n per group = 10). To induce diabetes mellitus, 20 of these animals received 100 mg/kg of STZ intraperitoneally and 10 days after application, animals with blood glucose > 200 mg/dL were considered diabetic. After 30 days, the animals (n = 20) were infected with *S. mansoni* subcutaneously ($\pm$ 80 cercariae per animal). The following study groups were then obtained: Group CS - uninfected and non-diabetic animals; Group I - animals infected with *S. mansoni*; Group D, diabetic animals; and Group DI, diabetic animals infected with *S. mansoni*. Euthanasia occurred in the ninth week of infection, when the liver was removed and submitted to routine histological processing. Histological sections obtained were stained with H&E, Masson's Trichrome and Picrosirius Red, and analyzed by histopathology, quantitative methods (D36, cell and collagen quantification) and morphometry of granulomas. Adult helminths were removed from the portal system and mesentery veins, separated by sex, fixed in AFA and stained with Hydrochloric Carmine, for evaluation of the structures of the reproductive system, digestive system and tegument in both sexes, by bright field microscopy, SEM and Confocal. When analyzing the male helminths in the DI Group, we noticed a thicker tegument than the specimens in the infected Group (+43%; $p=0.001$), testicular lobes with changes in their morphology, and empty spaces between the cells. In females, the ovary presented a larger area than in Group I (+21%; $p=0.0150$), with oocytes that presented variation in cell size, pleomorphism (triangular and rectangular shapes) and empty spaces between them. The histopathological analysis of the liver demonstrated extensive areas of necrosis, several granulomas in confluence, denaturation of endonucleases in the nucleus of hepatocytes (also seen in Group D), cells with hydropic degeneration, hepatic microsteatosis and finally, hyperemia in the vessels and capillaries. Stereology showed a decline in the volume of DI hepatocytes (-15%; $p=0.008$) and Kupffer cells (-40%; $p=0.026$), and an increase in cellular infiltrate (+200%; $p=0.0151$) compared to the CS, I and D Groups, respectively. Evaluating liver regeneration, a significant decrease in mononucleated and binucleated hepatocytes was noted in Group DI compared to Groups D and I. No differences were found in the area and perimeter measurements of the granulomas, however, collagen production was 76% higher in Group DI compared to Group I ($p = 0.0159$). It was concluded in this study that the association of type 1 diabetes mellitus modified some parameters of schistosomal infection, among them: the thickness of the tegument of male helminths; the reproductive system of males and females; intensified the desorganizational in the liver tissue that occurs in schistosomiasis; and increased collagen deposition in schistosomal granulomas.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; worm morphology; diabetes mellitus; liver; histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2019	18
Figura 2 –	Casal de <i>Schistosoma mansoni</i> acasalados e corados em carmim clorídrico.....	19
Figura 3 –	Esquema dos helmintos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	20
Figura 4 –	Superfície tegumental de machos de <i>Schistosoma mansoni</i> observada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21
Figura 5 –	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Figura 6 –	Granuloma hepático na esquistossomose	23
Figura 7 –	Patogênese do Diabetes Tipo 1.....	27
Figura 8 –	Estrutura química da estreptozotocina.....	29
Quadro 1	Grupos experimentais	35
Figura 9 –	Espécime adulto macho de <i>Schistosoma mansoni</i> , recuperado de camundongos infectados e não diabéticos, Grupo I.....	45
Figura 10 –	Espécime adulto macho de <i>Schistosoma mansoni</i> , recuperado de camundongos infectados e diabéticos, Grupo DI.....	45
Figura 11 –	Microscopia confocal do sistema reprodutor de helmintos adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos.....	46
Figura 12 –	Microscopia eletrônica de varredura da região ântero-dorsal de <i>Schistosoma mansoni</i> adulto macho de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos.....	47
Figura 13 -	Sistema reprodutor de espécimes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> , recuperados de camundongos infectados e não diabéticos, Grupo I	50
Figura 14 -	Sistema reprodutor de espécimes adultos fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> , recuperados de camundongos infectados e diabéticos, Grupo DI.....	51
Figura 15 -	Microscopia confocal do sistema reprodutor de helmintos adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos.....	52

Gráfico 1 - Oograma por esmagamento do intestino delgado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e diabéticos ou não (média $\pm$ desvio-padrão)	53
Figura 16 - Parênquima hepático de camundongos não infectados e não diabéticos (Grupo CS).....	54
Figura 17 - Parênquima hepático de camundongos infectados e não diabéticos (Grupo I).....	55
Figura 18 - Parênquima hepático de camundongos não infectados e diabéticos (Grupo D).....	56
Figura 19 - Parênquima hepático de camundongos não infectados e diabéticos (Grupo DI).....	57
Gráfico 2 - Quantificação dos hepatócitos mononucleados e binucleados em fígado de camundongos Swiss Webster diabéticos e/ou infectados pelo <i>S. mansoni</i> . (média $\pm$ desvio-padrão)	59
Gráfico 3 - Distribuição percentual dos estágios evolutivos (exsudativo – E; exsudativo- produtivo - EP) dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> (I) e diabéticos (DI)	60
Figura 20 - Depósito de colágeno em fígado de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e diabéticos ou não.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Massa corporal, do fígado e massa relativa do fígado (expresso em gramas) de camundongos diabéticos e/ou infectados pelo <i>S. mansoni</i>	42
Tabela 2 –	Percentual de recuperação de helmintos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos (média $\pm$ desvio-padrão)	42
Tabela 3 –	Dados morfológicos e morfométricos do sistema reprodutor de helmintos adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos (média $\pm$ desvio-padrão)	44
Tabela 4 –	Dados morfológicos e morfométricos do sistema reprodutor de helmintos adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos (média $\pm$ desvio-padrão)	49
Tabela 5 -	Densidade do volume determinada por estereologia D36 (%) das estruturas do fígado de camundongos Swiss Webster diabéticos e/ou infectados pelo <i>S. mansoni</i> (média $\pm$ desvio-padrão)	58
Tabela 6 –	Análise morfométrica dos granulomas (área x perímetro) e quantificação de colágeno (%) do tecido hepático e de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> (I) e diabéticos (DI) (média $\pm$ desvio-padrão)	61
Tabela 7 –	Quantificação dos diferentes tipos de células dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> e diabéticos ou não	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFA	Solução com etanol, formol e ácido acético glacial
CEUA	Comitê de Étic no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DH	Dieta hiperlipídica
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
D36	Técnica Estereológica D36
E	Fase granulomatosa exsudativa
EP	Fase granulomatosa exsudativa-produtiva
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H&E	Hematoxilina e eosina
I	Fase granulomatosa involutiva
IFN - γ	<i>Interferon gama</i>
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IR	Fase granulomatosa inicial e/ou reativa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fase granulomatosa produtiva
PCE	Programa de Controle da Esquistossomose
PCR	Proteína C-Reativa
SEA	<i>Soluble Egg Antigens</i>
SGTP	<i>Schistosome glucose transponder</i>
SmNAGAL	α -N-acetilgalactosaminidase
STZ	Estreptozotocina
Th	<i>T-Helper</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa
nm	Nanômetros
>	Maior que
<	Menor que
°C	Graus Celsius
γ	Gama
pH	Potencial Hidrogeniônico
M	Molar
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
dL	Decilitro
μm ²	Micrômetros quadrados
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	JUSTIFICATIVA	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral	32
2.2	Objetivos Específicos.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	Desenho experimental.....	33
3.2	Comitê de Ética.....	34
3.3	Animais.....	34
3.4	Administração da estreptozotocina para a indução do diabetes.....	34
3.5	A infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos diabéticos.....	35
3.6	Divisão dos grupos experimentais.....	35
3.7	Necropsia e coleta das amostras.....	36
3.8	Oograma	36
3.9	Coloração dos helmintos adultos de <i>S. mansoni</i> para montagem das lâminas...	36
3.10	Análises morfológicas e morfométricas dos helmintos.....	37
3.11	Protocolo para o MEV.....	38
3.12	Processamento histológico do fígado e coloração das lâminas.....	38
3.13	Análise histopatológica e estereológica do fígado.....	39
3.14	Classificação, morfometria e quantificação das fibras de colágeno dos granulomas.....	40
3.15	Análise estatística dos dados.....	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Dosagens glicêmicas após aplicação da STZ.....	41
4.2	Avaliação da massa corporal e do fígado.....	41

4.2.1	<u>Massa corporal dos animais</u>	41
4.2.2	<u>Massa do fígado</u>	41
4.2.3	<u>Relação massa do fígado/massa do animal</u>	41
4.3	Análise parasitológica	42
4.3.1	<u>Recuperação de helmintos adultos e Infectividade</u>	42
4.3.2	<u>Análises do sistema reprodutor e tegumento dos helmintos machos</u>	43
4.3.3	<u>Análises do sistema reprodutor dos helmintos fêmeas</u>	48
4.3.4	<u>Oograma por esmagamento</u>	53
4.4	Histopatologia e Análises qualitativas do tecido hepático	53
4.4.1	<u>Histopatologia</u>	53
4.4.2	<u>Análises Quantitativas do fígado</u>	58
4.4.2.1	Estereologia- Método D36.....	58
4.4.2.2	Avaliação da remodelação do fígado.....	59
4.5	Avaliação qualitativa e quantitativa dos granulomas hepáticos	60
4.5.1	<u>Estágios de desenvolvimento dos granulomas hepáticos</u>	60
4.5.2	<u>Morfometria e quantificação de colágeno do granuloma</u>	61
4.5.3	<u>Quantificação dos diferentes tipos celulares nos granulomas</u>	62
5	DISCUSSÃO	64
	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose, parasitose causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*, é uma das doenças parasitárias mais importantes do mundo devido a sua alta morbidade e mortalidade, que causa risco não apenas a saúde humana, mas ao desenvolvimento socioeconômico da população (Xue et al., 2023). A esquistossomose mansônica afeta os seres humanos desde a antiguidade. Prova disso foi o encontro de ovos de espécies de *Schistosoma*, em múmias egípcias (Habicht et al., 2021). Apesar da sua importância, esta parasitose é considerada uma doença negligenciada e existem múltiplos fatores que limitam e dificultam o seu controle e sua eliminação (Menezes et al., 2023). Em 2021, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que aproximadamente 75,3 milhões de pessoas, em cerca de 78 países, receberam tratamento contra a doença.

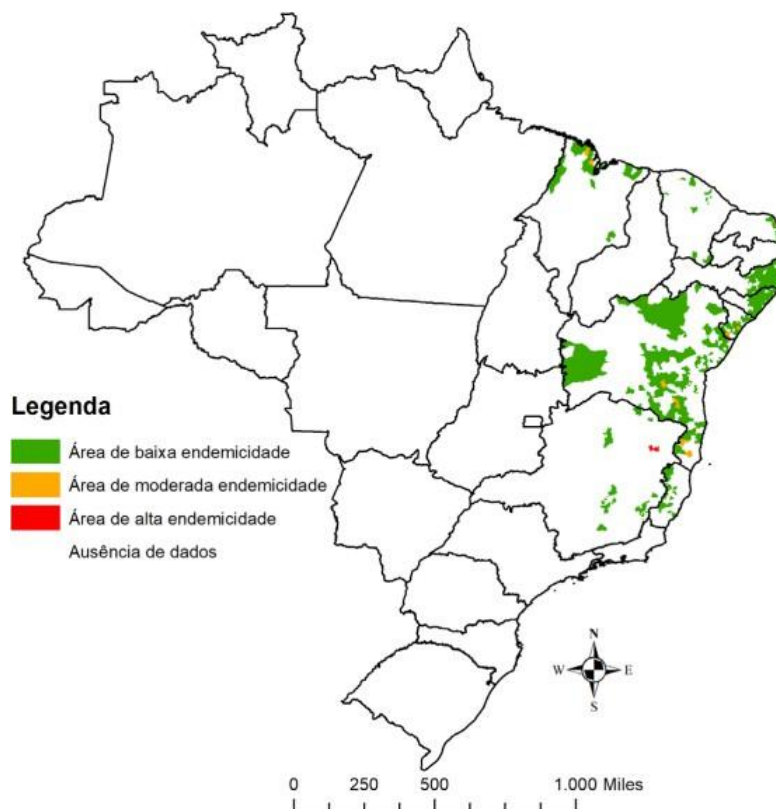
No Brasil, a esquistossomose é causada pela espécie *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, e está presente em 19 estados (principalmente nas regiões nordeste e sudeste) sendo 8 destes, considerados endêmicos: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (Figura 1). Na década de 1980, foi lançado um programa nacional de controle, o PCE (Brasil, 2024), voltado para a detecção e tratamento de pessoas infectadas. Desde então, a prevalência, morbidade e mortalidade relacionadas a esquistossomose diminuíram no Brasil. O Inquérito Nacional da Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses, apontou decréscimo na positividade da esquistossomose, que passou de 9,24% em 1977 para 1,79% em 2018, entretanto, casos graves e mortes continuam a ocorrer (Katz, 2018). De acordo com os últimos dados do Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose (SISPCE), o percentual de positividade para *S. mansoni* nas áreas endêmicas demonstrou ligeira queda nos casos, de 5,20% em 2009, para 3,22% em 2019. Neste período foram realizados na rotina em torno de 9.867.120 exames e detectados 423.117 casos e um percentual médio de positividade, em 10 anos de 4,29% (Brasil, 2021).

A esquistossomose mansônica está diretamente relacionada à pobreza (Katz, 2018). Fatores como: baixas condições de saneamento básico, renda familiar, nível de escolaridade e acesso à informação, influenciam fortemente a sua permanência no país. Nas áreas endêmicas da doença, inúmeras fontes de água utilizadas para fins domésticos ou de recreação, são consideradas de alto risco de transmissão, e cabe ressaltar que o risco de contrair a infecção

nesses locais não é eventual, já que os moradores dependem dessas fontes hídricas. Fatores ambientais (como a presença do hospedeiro intermediário) e sociais (como condições econômicas, de saneamento e abastecimento de água precários) podem contribuir para que ambientes indenes se tornem propícios à novos focos de transmissão (Brasil, 2024).

Os sintomas da esquistossomose podem variar devido a fatores como: exposição prévia ao parasito, carga parasitaria e reatividade do hospedeiro. Com isto, habitantes de áreas endêmicas que estão constantemente em contato com os antígenos do parasito, frequentemente apresentam poucos sintomas dificultando o diagnóstico (Bina e Prata, 2003; McManus et al., 2020). O padrão-ouro para detecção da esquistossomose é a técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972; Katz et al., 2018) em razão do seu baixo custo, sua fácil manipulação, e por ser um método quantitativo. Todavia, diversas técnicas seguem sendo estudadas e aprimoradas, como por exemplo o método do gradiente salino (Coelho et al., 2009), Helmintex® (Menezes et al., 2023), algumas técnicas moleculares (Enk et al, 2012; Oyeyemi et al., 2021) e o teste imunológico denominado de POC-CCA que apresentaram resultados promissores para utilização em áreas de baixa carga parasitária. O POC-CCA detecta antígenos catódicos circulantes (CCA, do inglês *circulating cathodic antigen*) na urina com alta sensibilidade e especificidade e, por se tratar de um teste rápido imunocromatográfico, permite diagnosticar a infecção em campo (Siqueira et al., 2016). Em um recente estudo realizado em área endêmica (baixa carga parasitária), mostrou que a positividade com o teste POC-CCA foi significativamente maior do que os resultados obtidos através do método Kato Katz (Bezerra et al., 2018; Grenfell et al., 2019; Menezes et al., 2023).

Figura 1 – Distribuição da esquistossomose segundo a média do percentual de positividade por município. Brasil, 2019



Fonte: BRASIL, 2024.

Schistosoma mansoni e seu ciclo biológico

O *S. mansoni* é um trematódeo com características raras em sua classe, pois apresentam sexos separados, dimorfismo sexual, além de serem longos e delgados (Figura 2). Os helmintos adultos, tanto o macho como a fêmea, apresentam duas ventosas na região anterior do corpo, a ventosa oral e a uma segunda ventosa, a uma pequena distância desta, a ventosa ventral ou acetábulo. No interior da ventosa oral abre-se o esôfago, que se bifurca no nível da ventosa ventral e funde-se em seguida, formando um ceco único que irá terminar na extremidade posterior do helminto (Kastner et al., 1975)

Figura 2- Casal de *Schistosoma mansoni* acasalados e corados em carmim clorídrico.



Fonte: Silva et al., 2008.

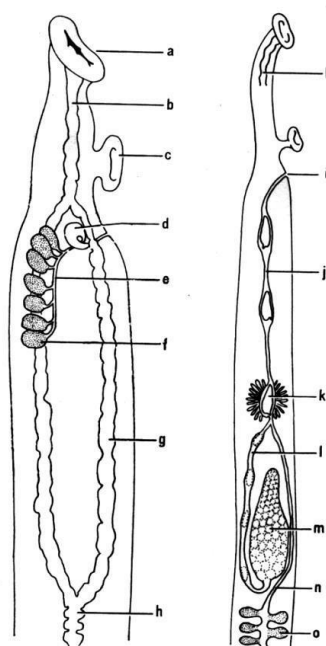
O macho mede cerca de 1 cm e possui uma coloração esbranquiçada. Sua região posterior do corpo é mais achatada dorsoventralmente do que a anterior, e se “dobra” para formar o chamado canal ginecóforo, onde a fêmea é albergada (Kastner et al., 1975). Seu aparelho genital é constituído por lobos testiculares intercomunicados, localizados no início do canal ginecóforo. Estes lobos testiculares são preenchidos por células cilíndricas em diferentes estágios de maturação (Neves et al., 2005). O canal deferente, por onde os espermatozoides são projetados, se dilata para constituir a vesícula seminal, que está ventralmente ligada ao poro genital pelo ducto ejaculador (Machado-Silva et al., 1998) (Figura 3).

As fêmeas são mais delgadas, porém maiores do que os machos, medindo cerca 1,2 a 1,6 cm de comprimento e apresentam uma coloração mais escura devido à hemozoína, um produto derivado da digestão de hemácias. Na região anterior do corpo, o sistema reprodutor é formado pelo ovário, composto por cordões de células germinativas hexagonais (oócitos) com núcleo central e diferentes estágios de maturação. O oviduto, por onde as células germinativas passarão para chegar ao oótipo, sai da extremidade do ovário e próximo a ele, encontra-se a espermateca, que possui forma alongada e espermatozóides armazenados. O ovitudo dilata-se formando o oótipo, que é composto por células cilíndricas, as glândulas de Mehlis (Neves et al., 2005) que são um grupo de células secretoras, importantes para a formação e excreção do ovo (Silva et al., 2008). O oótipo então, se abre em uma estrutura longa e cilíndrica revestida

por epitélio cilíndrico, o útero. O ovo segue através do útero, que se abre ventralmente logo abaixo da ventosa ventral, no poro genital, e então é liberado (Kastner et al., 1975) (Figura 3). Na parte posterior, as glândulas vitelínicas, possuem forma semelhante a “cachos de uvas”, são formadas por células colunares de tamanho irregular e núcleo central, produzem o vitelo, que é extremamente importante para a nutrição do ovo, e que chega ao oótipo através do viteloduto (Neves et al., 2005).

Em relação ao seu revestimento externo, o *S. mansoni* apresenta um tegumento heptalaminado, que está em constante processo de renovação, e onde nos machos, numerosos tubérculos são encontrados principalmente na região dorsal (Machado-Silva et al., 1998). Ao serem observados em microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se observar espinhos nos tubérculos e a presença de papilas sensoriais em seu tegumento (Brandão-Bezerra et al., 2019) (Figura 4).

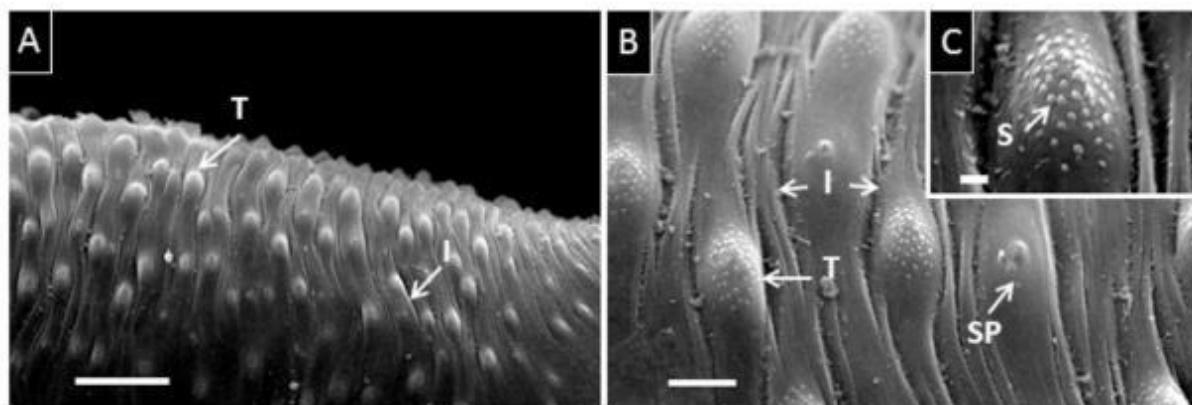
Figura 3 – Esquema dos helmintos adultos de *Schistosoma mansoni*.



Legenda: a, ventosa oral e boca; b, esôfago (desenho incompleto na fêmea); c, acetábulo ou ventosa ventral; d, vesícula seminal; e, canal deferente; f, lobo testicular; g, porção média bifurcada do intestino; h, início do ceco; i, orifício genital feminino; j, útero; k, um ovo em processo de formação da casca no oótipo; l, oviduto; m, ovário; n, viteloduto; o, glândulas vitelinas.

Fonte: Rey, 2008.

Figura 4- Superfície tegumental de machos de *Schistosoma mansoni* observada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

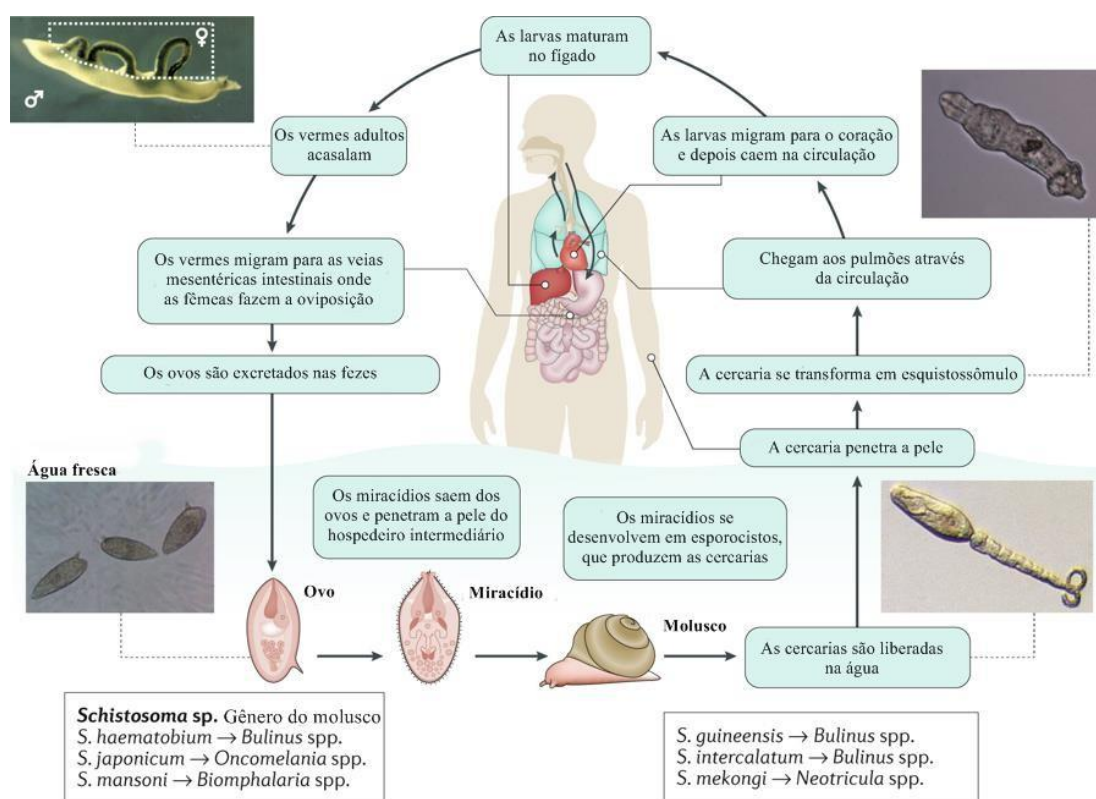


Legenda: (T) Tubérculos; (I) Sulcos intertuberculares; (SP) Papilas sensoriais; (S) Espinhos.

Fonte: Brandão-Bezerra et al., 2019

O *S. mansoni* possui um ciclo biológico heteróximo (Figura 5) que se inicia quando o hospedeiro vertebrado infectado (hospedeiro definitivo), libera ovos viáveis nas fezes que, em contato com a água doce, se rompem permitindo a saída da forma larvária ciliada denominada miracídio. O miracídio é a forma infectante ao hospedeiro invertebrado (hospedeiro intermediário), que são caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*. Nos caramujos, os miracídios passam por reorganização morfológica e biológica, resultando na produção de esporocistos primários. Por poliembrionia, são gerados os esporocistos secundários que geram cercarias, forma infectante ao hospedeiro vertebrado (Simões et al., 2017). Quatro a seis semanas depois, as cercarias saem dos caramujos pelas partes moles e nadam livremente. Desta forma, ao entrar em contato com coleções d'água contaminadas, o hospedeiro vertebrado é infectado pelas cercarias que o penetram ativamente pela pele, transformando-se em esquistossômulos. Após 3-5 dias, migram pela circulação sanguínea passando pelo coração e pulmão até chegarem no sistema porta hepático, onde as formas jovens amadurecem sexualmente (macho e fêmea) e acasalam-se (Gryseels, 2012; Gryseels et al., 2006). Após o acasalamento, os helmintos deslocam-se contra a corrente sanguínea para as veias do mesentério, onde a fêmea inicia a oviposição. Alguns destes ovos, atravessam a parede intestinal, alcançando a luz intestinal, sendo liberados adjunto às fezes, propiciando o reinício do ciclo biológico (Mcmanus et al., 2018) (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Mcmanus et al., 2018. Adaptado.

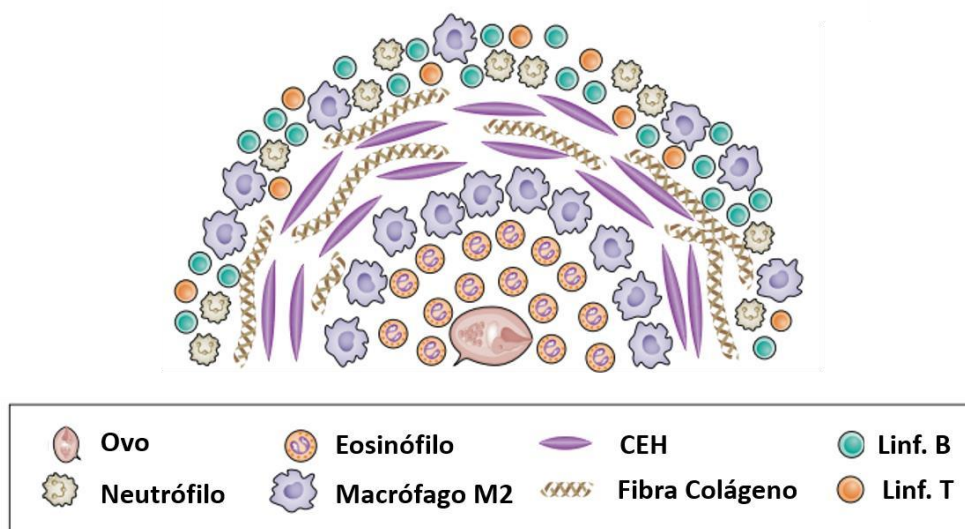
A patogenicidade da esquistossomose no fígado

Alguns ovos liberados pelas fêmeas nas veias do mesentério são carregados pelo fluxo sanguíneo, porém com a diminuição gradual no calibre dos capilares, não conseguem progredir ficando retidos em alguns órgãos, sobretudo no fígado, tornando-o o principal foco da resposta do hospedeiro ao parasito (Costain et al., 2018; Schwartz e Fallon, 2018). Ao secretarem antígenos solúveis (Soluble Egg Antigens – SEA), os ovos nos sinusóides hepáticos desencadeiam uma reação fisiopatológica complexa que iniciam a formação do granuloma. Os SEA secretados induzem a produção das interleucinas 4 (IL-4) e 5 (IL-5). A IL-4 induzirá a produção de imunoglobulina E (IgE), e a IL-5 por sua vez, induzirá a produção e mobilização de eosinófilos (Burke et al., 2009; McManus et al., 2020). Nesta fase da infecção (pós oviposição) a resposta imune do tipo Th2 é estabelecida e essas citocinas, juntamente com IL-13, induzem à ativação de macrófagos M2, produção de IgE, IgG1 e IgG4 pelos linfócitos B e, o recrutamento de eosinófilos, mastócitos e basófilos, que são os principais tipos celulares que

compõem os granulomas ao redor dos ovos, impedindo sua migração (Pearce et al., 2004; Castro et al., 2018; Costain, 2023) (Figura 6).

À medida que a infecção permanece, o hospedeiro entra em um estado mais regulado, caracterizado pela redução da responsividade aos antígenos e expansão de células T reguladoras (Tregs). Estas células possuem função supressora e, a partir da liberação de citocinas como IL-10 e TGF- β , regulam a inflamação. A produção de ovos persiste durante esse período, mas com níveis Th2 diminuídos, menos ativação de linfócitos e granulomas involutivos.

Figura 6. Granuloma hepático na esquistossomose.



Legenda: Esquema demonstrando o granuloma hepático. CEH: Célula estrelada hepática; Linf. B: Linfócito B; Linf. T: Linfócito T.

Fonte: Adaptado de McManus et al., 2020.

Durante seu desenvolvimento, os granulomas esquistossomóticos passam por diferentes estágios de maturação, apresentando desde as formas iniciais com predominância celular, até os estágios cicatriciais com grande quantidade de colágeno. À vista disto, o granuloma esquistossomótico apresenta os seguintes estágios, sugeridos por Lenzi et al., 1998:

- i. Fase pré-granulomatosa fraca e inicial e/ou reativa (IR);
- ii. Fase pré-granulomatosa exsudativa (E);
- iii. Fase granulomatosa exsudativa-produtiva (EP);
- iv. Fase granulomatosa produtiva (P);
- v. Fase granulomatosa involutiva (I).

As fases pré-granulomatosas (IR e E) se caracterizam pela grande presença de células inflamatórias ao redor do ovo. Na fase exsudativa-produtiva (EP), os granulomas são caracterizados pela presença de diferentes tipos celulares como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e fibroblastos, com produção de colágeno e apresentam aspecto circular. Os granulomas na fase produtiva (P) se caracterizam pela maior presença das fibras de colágeno e na fase involutiva (I) o ovo foi destruído predominando a fibrose (Costa-Silva et al., 2002; Lenzi et al., 1998).

A presença de granulomas periovulares isolados na periferia da veia porta é uma característica encontrada em indivíduos que apresentam lesões hepatointestinais, muito comum em áreas endêmicas. As manifestações clínicas leves ou assintomáticas são explicadas pela baixa carga parasitária que permite a existência de um equilíbrio entre a resposta do hospedeiro aos novos ovos e a reabsorção de lesões antigas (Castro et al., 2018; Freitas et al., 1999). A fibrose nos granulomas hepáticos obstrui o fluxo sanguíneo e aumenta a pressão portal culminando em alterações vasculares hepáticas graves que incluem a redução severa do sistema da veia porta, hiperplasia e hipertrofia do sistema arterial (Andrade, 2009; Lambertucci, 2010). Paradoxalmente, os granulomas periovulares atuam protegendo o tecido do hospedeiro circundante das toxinas liberadas pelo ovo, atuando não apenas como uma barreira física entre o ovo e o tecido, mas também com sequestro de produtos antigênicos secretados pelo ovo (Hams et al., 2013).

A esquistossomose associada a outras morbidades não infecciosas

Estudos que avaliem a associação entre a esquistossomose e condições não infecciosas são cada vez mais relevantes. Compreender o comportamento da infecção esquistossomótica e na resposta gerada pelo hospedeiro já afetado por outra doença em simultâneo, poderá permitir melhores abordagens, visto que esta parasitose causa grande impacto na saúde pública. Por viverem no sangue, os esquistossomos são altamente dependentes do metabolismo do hospedeiro, portanto o parasito e a evolução da infecção podem ser afetados por alterações neste metabolismo, assim como pela existência de comorbidades (Hulstijn et al. 2001; Neves et al., 2001; Alencar et al., 2009).

Nos últimos anos, nosso grupo vem desenvolvendo pesquisas que abordam a associação de alterações metabólicas com a infecção pelo *S. mansoni*. Neves et al., (2007a) e seus estudos sobre os efeitos da dislipidemia durante a esquistossomose na fase aguda, demonstraram o favorecimento dos helmintos adultos, quando roedores foram submetidos a uma dieta rica em

gordura. O aumento na quantidade de ovos liberados pelas fêmeas acarretou em maiores danos ao fígado e outros órgãos do hospedeiro. Os lipídios induzem o parasito a expressar uma proteína de superfície, que possuem receptores de colesterol circulante e, esta associação da proteína e colesterol, protege e favorece o parasito contra a resposta imune do hospedeiro (Neves et al., 2007 b) .

Camundongos esquistossomóticos e com desnutrição proteica apresentaram diminuição no granuloma periovular e alterações importantes no desenvolvimento dos vermes adultos, quando comparados aos animais esquistossomóticos eutróficos (Neves et al., 2001; Simões et al., 2002). Além disto, os animais com essa comorbidade, produzem uma resposta imune celular e humoral, com títulos de anticorpos e produção de citocinas (IFN γ , IL-4 e IL10) em níveis muito mais baixos do que os animais eutróficos em fase aguda da infecção, alterando o perfil padrão de resposta nesta fase (Coutinho et al., 2010).

Da Silva Filomeno et al., (2020) utilizaram o modelo C57BL/6 para analisar a associação entre a esquistossomose e a síndrome metabólica. Apesar da constatação da diminuição dos níveis lipídicos e da esteatose no fígado do hospedeiro devido a infecção, a presença de granulomas periovulares e das alterações decorrentes da síndrome metabólica, como depósito de fibras de colágeno nos vasos sinusoidais e processos inflamatórios, tornaram as lesões hepáticas mais intensas.

A associação da infecção experimental pelo *S. mansoni* e a ingestão de etanol à 18% por 28 dias, resultou em diversas alterações morfológicas no helminto como: danos no tegumento dos parasitos machos com modificações nos espinhos e tubérculos, descamação tegumentar e lesões erosivas. Além de alterações no sistema reprodutor tanto de machos quanto de fêmeas, resultando em um aumento no número de ovos imaturos e mortos no intestino destes camundongos (Brandão-Bezerra et al., 2019). No parênquima hepático, a área dos granulomas aumentou em todos os estágios evolutivos, e além das alterações comuns durante a infecção, foi observada microesteatose alcóolica, presença de necrose e infiltrado mononuclear, caracterizando a hepatite alcoólica, e exacerbando os danos hepáticos (Brandão-Bezerra et al., 2022).

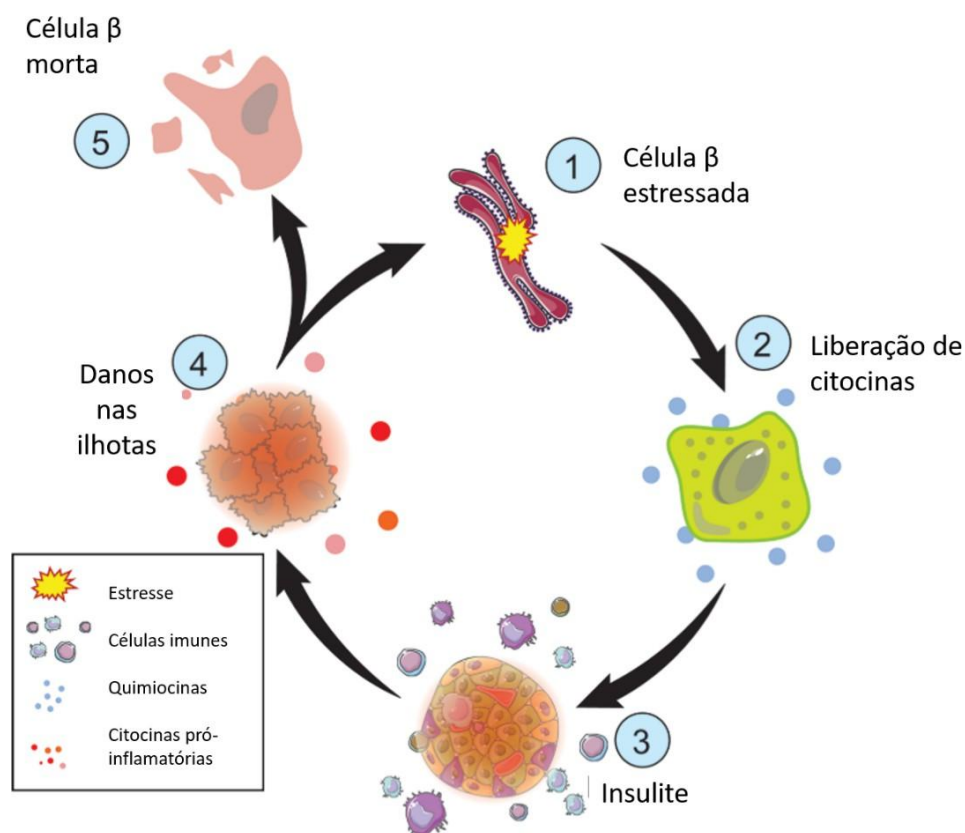
Diabetes mellitus tipo 1 e suas características

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome endócrina, crônica caracterizada por hiperglicemia persistente devido à produção de insulina irregular e/ou resistência à insulina (Scaratti et al., 2023; Khan et al., 2024). Estimativas recentes indicam que cerca de 422 milhões de pessoas têm diabetes e em torno de 1,6 milhão de mortes são atribuídas diretamente à doença

a cada ano (Magliano et al., 2021), fazendo com que seja considerada um dos problemas de saúde mais desafiadores do século XXI. O Brasil ocupa a 4^a colocação entre os dez países com maior número de pessoas com DM (16.780.800 brasileiros entre 20-79 anos de idade) e o 3^o lugar mundial quando se trata de crianças e adolescentes com DM tipo 1 (95.846 jovens entre 0-19 anos de idade) (Magliano et al., 2021).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) ou diabetes mellitus dependente de insulina (DMID) ocorre por efeito da destruição imuno-associada, se não diretamente imunomediada, das células β pancreáticas produtoras de insulina (Figura 7), sendo portanto considerada uma doença autoimune e sua ocorrência é mais comum em crianças e adultos jovens (Katsarou et al., 2017; Lovic et al., 2020). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) ou diabetes mellitus não dependente de insulina (DMNDI) está associado à resistência à insulina e à falta de compensação adequada pelas células β ocasionando uma deficiência relativa na secreção de insulina (Al-awar et al., 2016; Lovic et al., 2020). Além do pâncreas, vários órgãos sofrem alterações no diabetes incluindo rins e fígado. Em pacientes com DM1 o mau controle metabólico, pode acarretar em danos ao fígado, resultando em hepatomegalia secundária devido ao depósito de glicogênio intra-hepático (Bastardas et al., 2007).

Figura 7. Patogênese do Diabetes Tipo 1.



Legenda: Etapas até a morte das células β em DM1. A demanda metabólica de desafio nutricional resulta em estresse no retículo endoplasmático e estresse oxidativo (1) seguido pela liberação de quimiocinas pelas células β (2). As quimiocinas atraem células imunes (3), como macrófagos e células T, que podem danificar a ilhota (4) diretamente através das interações das células T e indiretamente através da liberação de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. O dano celular exacerba o Retículo endoplasmático e o estresse oxidativo, perpetuando esse ciclo. A incapacidade de restaurar a homeostase celular resultará na morte das células beta (5).

Fonte: Toren et al., 2021. Adaptado.

A prevalência do DM1 tem aumentado nos países desenvolvidos, porém é menos frequente em regiões tropicais onde doenças infecciosas como a esquistossomose, são endêmicas. A "hipótese da higiene" sugere que uma menor exposição a infecções, devido à melhoria da higiene e acompanhamento regular de saúde, pode aumentar o risco de doenças autoimunes e alérgicas (Zaccone et al., 2003; Cooke et al., 2004; Caraballo, 2018). Estudos anteriores já demonstraram que a exposição de camundongos aos SEA reduziu o risco de DM1, possivelmente pela indução de macrófagos M2 do tecido adiposo e da expansão de células T reguladoras, que devido à sua função supressora, podem promover um efeito protetor contra o

diabetes (Crevel et al., 2017). Em contra partida a associação do diabetes e a esquistossomose, mostrou que os helmintos adultos se beneficiam da glicose, visto que a energia gerada a partir dela, permite que migrem pelos tecidos, invadam o sistema vascular e escapem do sistema imunológico do hospedeiro (Hulstijn et al., 2001). Outro estudo, onde se comparou os níveis séricos de glicose e lipídios, entre pacientes com esquistossomose crônica e indivíduos sem esquistossomose, constatou que os pacientes com infecção por *Schistosoma japonicum* tinham níveis significativamente mais baixos de glicose, triglicerídeos e colesterol do que aqueles sem a infecção (Duan et al., 2018). Alguns resultados apontam que as helmintíases, incluindo a esquistossomose, suprimem as respostas inflamatórias e restauram a homeostase da glicose, melhorando a sensibilidade à insulina em modelos animais, além da homeostase metabólica (Hussaarts et al., 2015). Devido a isto, alguns autores até sugerem o uso de parasitoses como terapia para doenças inflamatórias crônicas não infecciosas (Oliveira et al., 2017).

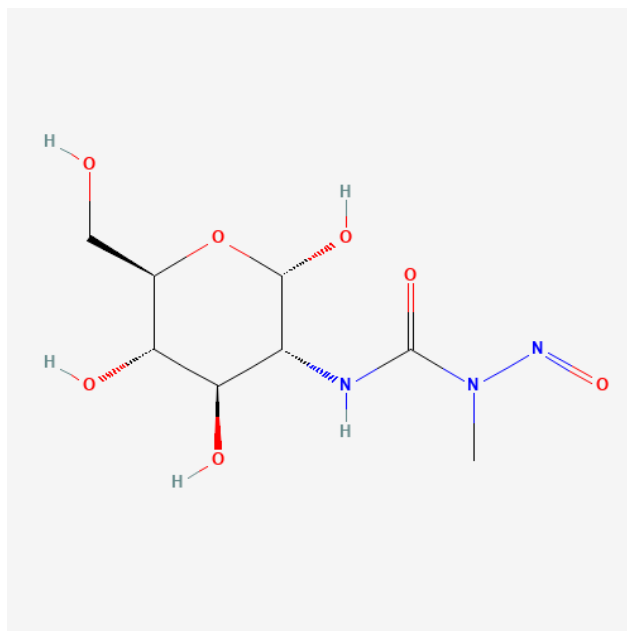
A indução experimental do DM1 por estreptozotocina

Desde a sua descoberta em 1959, a estreptozotocina (STZ) tem sido amplamente utilizada para a indução de diabetes em animais experimentais e em estudos pré-clínicos. A STZ danifica seletivamente as células β pancreáticas, gerando alterações estruturais, funcionais e bioquímicas que se assemelham àquelas que geralmente aparecem na doença em humanos.

Desta forma, a STZ se tornou uma ferramenta clinicamente relevante para induzir o diabetes tipo 1 e tipo 2 e estudar sua patogênese (Góes et al., 2016; Goyal et al., 2016; Jin et al., 2020).

Para garantir a reprodutibilidade dos estudos com STZ alguns aspectos importantes devem ser ponderados: a sua variabilidade na preparação, via e dose de administração, farmacocinética e farmacodinâmica entre as espécies, cepa animal a ser utilizada, idade e outras características dos modelos experimentais (Goyal et al., 2016). A dose a ser administrada é um fator importante, tanto para o tipo de diabetes a ser induzida, como pela toxicidade inespecífica em outros órgãos provocada pela STZ (Hulstijn et al. 2001; Furman et al., 2015; Birgani et., 2018). Acredita-se que o DM1 seja induzido em animais experimentais por uma única injeção de STZ (Goyal et al., 2016). Diferentemente, a indução do DM 2 apresenta várias abordagens como: injeção de STZ após administração de nicotinamida (Wu et al., 2008; Giribabu et al., 2018) e alimentação com dieta hiperlipídica após ou antes da administração de STZ (Jin et al., 2020).

Figura 8- Estrutura química da estreptozotocina.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/streptozotocin>. Acesso em 29 de setembro de 2024.

Esquistossomose e diabetes mellitus

A esquistossomose e o diabetes mellitus são morbidades extremamente importantes que causam grande impacto na saúde pública e, que podem ocorrer simultaneamente em um hospedeiro. Estudos indicam que o diabetes mellitus pode aumentar a incidência e a gravidade de muitas infecções e há evidências de que a hiperglicemia e o mau controle glicêmico estão correlacionados com o risco de infecção e com o seu desfecho (Crevel et al., 2017).

Góes et al., (2016), analisaram os efeitos da estreptozotocina (STZ) e da esquistossomose mansônica na biodistribuição do ^{99m}Tc-pertecnetato de sódio (Tecnécio), um radiofármaco amplamente usado na medicina nuclear. Os resultados deste estudo, mostraram diminuição na captação do radiofármaco, principalmente no fígado e no pâncreas, que são respectivamente, órgãos onde ocorrem alterações fisiopatológicas na esquistossomose mansônica e no diabetes.

A indução do diabetes mellitus com STZ em camundongos infectados pelo *S. mansoni* resultou em menor número de ovos por grama de fezes e menor quantidade de ovos maduros e viáveis no intestino. A menor excreção fecal de ovos em camundongos diabéticos

possivelmente foi devido a maturação prejudicada dos ovos, demonstrando o impacto desta associação na capacidade reprodutiva dos helmintos (Hulstijn et al. 2001; 2011).

Em recente estudo, a interação da infecção esquistossomótica, diabetes mellitus e obesidade em camundongos foi analisada, e identificou-se um aumento na contagem de ovos nos tecidos, na porcentagem de ovos maduros e na densidade de fibrose, acarretando em maiores danos ao hospedeiro. Enquanto que a infecção pelo *S. mansoni* induziu alterações no perfil lipídico e nos níveis de glicose no sangue em grupos diabéticos e obesos infectados e impactou favoravelmente os níveis de insulina em camundongos obesos (Amer et al., 2023).

Pesquisas recentes relatam a correlação negativa entre a esquistossomose e o DM1. Uma vez que, antígenos relacionados ao *S. mansoni* afetam a composição das células imunológicas, estimulando um aumento nas células T e natural killer e desta forma, podem regular as respostas imunes adaptativas relacionadas à prevenção do DM1 e alterar os eixos Th1/Th2 e Th17/Treg (Tang et al., 2024).

Estas pesquisas citadas corroboram a importância de se investigar a associação entre esquistossomose e diabetes mellitus tipo 1, afim de compreender como a relação parasito-hospedeiro pode ser modificada nesta circunstância.

1 JUSTIFICATIVA

É sabido que o diabetes mellitus é um fator de risco para muitas doenças infecciosas, e sua incidência vem aumentando também em áreas endêmicas para doenças tropicais negligenciadas definidas pela OMS, como a esquistossomose.

Os aspectos biológicos e do desenvolvimento da infecção causada pelo *S. mansoni* são bem consolidados, da mesma forma em que há na literatura vasta informação sobre os efeitos e patogenia do DM1. No entanto, não há análise aprofundada (com a metodologia que aqui fora utilizada) sobre as alterações morfológicas nos helmintos bem como, não há análises demonstrando o impacto desta comorbidade sobre o fígado do hospedeiro.

Neste contexto, buscamos investigar se a infecção pelo *S. mansoni* na fase aguda quando associada ao diabetes mellitus tipo 1 induzida por STZ, causa alterações morfológicas nos helmintos adultos e modifica o padrão dos danos hepáticos causados pela esquistossomose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

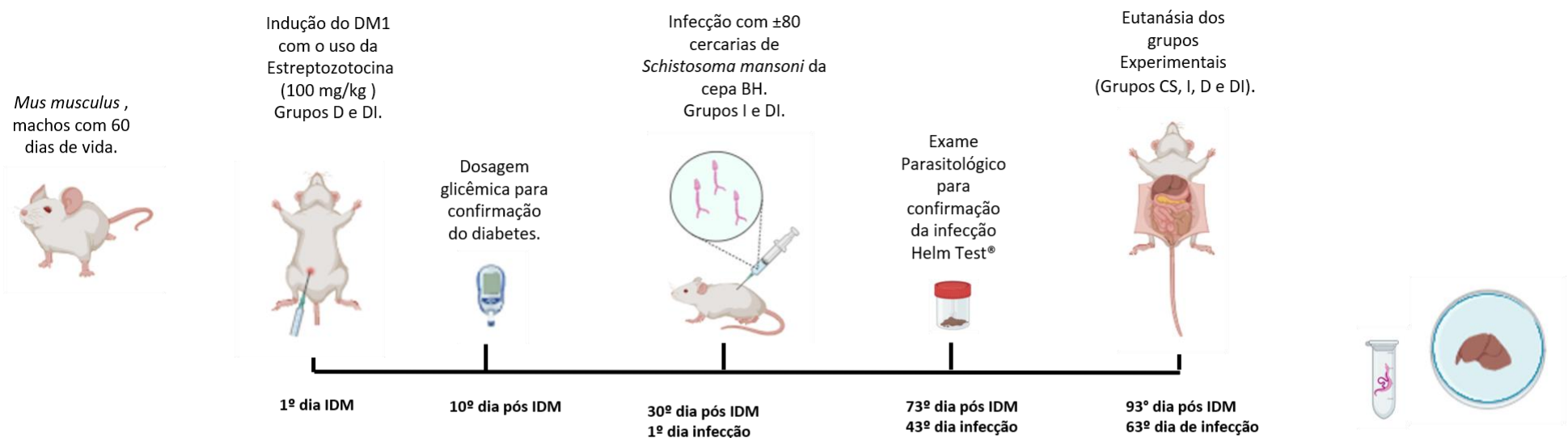
Avaliar o impacto da associação do diabetes mellitus tipo 1 com a esquistossomose aguda experimental, na morfologia do parasito e no tecido hepático do hospedeiro.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se ocorreu alteração na infectividade e na recuperação dos vermes adultos;
- b) Verificar se o diabetes mellitus alterou a maturação dos ovos liberados pelo helminto;
- c) Investigar se houve modificações morfológicas e morfométricas no tegumento e no sistema reprodutor dos vermes adultos;
- d) Caracterizar as alterações histopatológicas no tecido hepático, decorrentes da infecção esquistossomótica associada ao diabetes mellitus tipo 1;
- e) Realizar estudo quantitativo das estruturas do tecido hepático.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental



LEGENDA

CS - Animal não infectado e não diabético (Controle Sadio)

I - Animal infectado

D - Animal diabético

DI - Animal infectado e diabético

IDM- Indução do diabetes mellitus tipo 1

Análises

- Biométricas
- Parasitológicas
- Morfológicas do Helminthos
- Histológicas do Fígado

3.2 Comitê de Ética

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ), sob o protocolo de número CEUA/013/2013. O protocolo experimental e os cuidados com os animais seguiram o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (US National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011) e a Lei Brasileira 11.794/2008 (Marques et al., 2009) além da regulamentação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3 Animais

Para a realização deste estudo foi utilizado como modelo experimental *mus musculus* machos (n=40), linhagem Swiss Webster, com 9 semanas de vida. Os animais foram obtidos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e foram alojados no Biotério da Disciplina de Parasitologia (Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro).

Durante o experimento, os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno (40 x 33 cm), em uma sala com umidade (60 ± 10 %) e temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas, expostos a ciclos de luz artificial e escuro (12/12 horas) e exaustor para circulação do ar. Os camundongos receberam ração comum como alimentação (Nuvilab CR-1- NUVITAL Nutrients Ltda., Colombo, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*.

3.4 Administração da estreptozotocina para a indução do diabetes

Para a indução do diabetes mellitus utilizou-se o fármaco estreptozotocina (STZ) diluída em tampão citrato, 0,01M e pH 4,5. Ao todo 20 animais receberam 100mg/kg de STZ em dose única (Chaudhry et al., 2013; Goyal et al., 2016), por via intraperitoneal. Com a intenção de se evitar mortes por choque hipoglicêmico, nas primeiras 24 horas após a administração da droga, os animais receberam uma solução contendo glicose à 5% ao invés de água. Para submeter todos os animais ao mesmo estresse, a outra metade dos camundongos (n=20), recebeu apenas a solução tampão pela mesma via de administração.

Para se confirmar o êxito da indução do diabetes, a glicemia foi verificada 10 dias após a aplicação do STZ, sem jejum, utilizando o monitor de glicemia (G-Tech Free SD Biosensor,

Inc). Os animais que apresentaram glicemia > 200 mg/dL foram considerados diabéticos (Hulstijn et al. 2001; Furman et al., 2015; 2021).

3.5 A infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos diabéticos

Para a infecção experimental foram utilizadas cercarias da cepa BH (Belo Horizonte), do *S. mansoni*, fornecidas pelo Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, que foram injetadas por via subcutânea no dorso dos animais (± 80 por animal).

A administração da STZ pode ocasionar danos aos helmintos adultos devido ao seu efeito tóxico (Hulstijn et al. 2001) Sendo assim, a infecção dos animais ocorreu 30 dias após a indução do diabetes para que a droga fosse metabolizada e excretada e o DM1 estivesse bem estabelecido. Somente os animais que apresentaram glicemia > 200 mg/dL, foram infectados.

A eficácia da infecção foi verificada 43 dias após a exposição às cercarias. Amostras de fezes foram pesquisadas quanto à presença de ovos do parasito por meio do método de Kato-Katz, o Helm Test® comercial (Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante.

3.6 Divisão dos grupos experimentais

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos, os diabéticos (receberam STZ) e não-diabéticos (não receberam STZ). Após a confirmação da indução do diabetes, através das medições da glicose (glicemia acima >200 mg/dL), os animais foram subdivididos para a infecção por *S. mansoni*. Desta forma, obtivemos 4 grupos: Grupo CS, animais não infectados e não diabéticos (controle sadio); Grupo I, animais infectados por *S. mansoni*; Grupo D, animais diabéticos; e Grupo DI, animais diabéticos e que, foram infectados pelo *S. mansoni* (Quadro1).

Quadro1- Grupos experimentais

Grupo CS	animais não infectados e não diabéticos (controle sadio);	n=10
Grupo I	animais infectados com <i>S. mansoni</i> ;	n=10
Grupo D	animais diabéticos;	n=10
Grupo DI	animais diabéticos e infectados com <i>S. mansoni</i> .	n=10

3.7 Necropsia e coleta das amostras

Na 9ª semana de infecção, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (Hulstijn et al., 2011), pesados e então, os órgãos foram retirados, pesados em balança de precisão (BioPrecisa, JH2102 model). O lobo medial do fígado foi fixado em formol tamponado 10% à temperatura ambiente e designado para as análises histopatológicas deste estudo.

Após a pesagem dos órgãos, os helmintos adultos foram retirados do sistema porta e das veias do mesentério, separados por sexo com o uso de um estereoscópio, quantificados e então fixados em AFA (solução com 95% de etanol 70%, 3% de formol e 2% de ácido acético glacial) (Neves et al., 1998) para posterior processamento para MEV ou coloração e montagem das lâminas. O percentual de recuperação de helmintos foi calculado de acordo com a carga infectante (número de cercarias inoculadas) e o número de helmintos recuperados (Freire et al. 2003).

3.8 Oograma

Para o oograma, o primeiro centímetro do segmento distal do intestino delgado foi prensado entre duas lâminas histológicas (oograma de esmagamento). A determinação dos estágios evolutivos dos ovos, foi realizada por microscópio de campo claro (Nikon Eclipse E200) e foram considerados os seguintes graus de maturação: imaturos, maduros e mortos (Machado-Silva et al., 1991; Neves et al, 2007b).

3.9 Coloração dos helmintos adultos de *S. mansoni* para montagem das lâminas

Os helmintos adultos foram retirados do fixador AFA e corados por carmim clorídrico (Neves et al., 1998), obedecendo as seguintes etapas: coloração em carmim clorídrico (30 minutos); retirada do excesso de corante por etanol a 70%; diferenciação, com obtenção de contraste dos diferentes órgãos com álcool clorídrico a 0,5%; desidratação gradual em série alcoólica (70%, 90% e absoluto - 3 minutos em cada etapa); clarificação em salicilato de metila com Bálsamo do Canadá (1:2) e montagem dos espécimes entre lâmina e lamínula, com preparação permanente, com bálsamo do Canadá.

3.10 Análises morfológicas e morfométricas dos helmintos

As lâminas com os espécimes corados foram submetidas à análise morfológica e morfométrica (Brandão-Bezerra et al., 2019; Neves et al., 2001) em um analisador digital de imagens equipado com câmera (Bel Photonics DV-5000 - 5.0 MP, Bel Engineering, Monza/Itália) e imagens capturadas pelo programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza/Itália).

Para a microscopia Confocal utilizou-se LSM 980-ZEISS (Laser Confocal Microscopy), com filtro LP570 e comprimento de onda de 543 nm (Brandão-Bezerra et al., 2019), da Plataforma de Microscopia Confocal e Superresolução (RTT07A), Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz (RPT), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Nos machos foram estudados:

- a) Aparelho Digestivo (Esôfago) - comprimento (μm) e largura (μm) do esôfago, desde a ventosa oral até a ventosa ventral; presença ou não de hemozoína e vacúolos/ espaços.
- b) Lobos testiculares – densidade de células germinativas, onde foi considerado como padrão normal aqueles que estavam totalmente preenchidos por células; presença ou não de vacúolos; quantidade; área (μm^2) e perímetro (μm); comprimento e largura.
- c) Vesícula seminal –densidade de espermatozoides, onde foi considerado como padrão normal aquelas que estavam totalmente preenchidas; área (μm^2) e perímetro (μm).
- d) Tegumento – espessura do tegumento na região dos lobos testiculares (linha traçada com auxílio do software do analisador de imagens); número de tubérculos (região anterior) em 100 μm de comprimento (linha traçada com auxílio do software do analisador de imagens); altura (μm) e largura (μm) dos tubérculos no tegumento.

Nas fêmeas foram estudados:

- a) Aparelho Digestivo (Esôfago)- comprimento (μm) e largura (μm) do esôfago, desde a ventosa oral até a ventosa ventral; presença ou não de hemozoína e vacúolos/ espaços.
- b) Ovário – diferenciação celular (maturação dos oócitos); número de oócitos sendo liberados; área (μm^2) e perímetro (μm).
- c) Glândulas vitelínicas – para a densidade das glândulas vitelínicas foi realizado um

sistema de escore, sendo considerado: alta (+++), média (++) e baixa (+), onde a densidade alta (+++) foi considerada como padrão normal; produção de vitelo (presença de vitelo).

- d) Espermateca – densidade de espermatozoides, onde foi considerado como padrão normal aquelas que estavam totalmente preenchidas; área (μm^2) e perímetro (μm).
- e) Produção de ovos – presença de ovos no oótipo ou útero.
- f) Tegumento – espessura do tegumento próximo à ventosa ventral (linha traçada com auxílio do software do analisador de imagens).

3.11 Protocolo para o MEV

Após a recuperação, os vermes foram fixados em Karnovski (glutaraldeído 2,5% formaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M) e foram imersos em tubos com fundo chato contendo pelo menos 2/3 do fixador. Antes de iniciar o processamento, a amostra se manteve em tetróxido de ósmio 1% (pós-fixador) em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora, para proteger as lipoproteínas naturais dos tecidos. Então, as amostras passaram por desidratação em série alcóolica gradual com banhos de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e etanol absoluto, 3 vezes, por 15 minutos em cada etapa. A etapa final do processamento - secagem - ocorreu por meio da sublimação na câmara de ponto crítico (Leica EM CPD300) (Torres et al., 2011).

Os espécimes foram montados no suporte (“stub”), utilizando fita de carbono e cobertos por uma fina camada de ouro, com espessura de 20-25 nm (metalização) (Torres et al., 2011). Por fim, as amostras foram examinadas e as imagens capturadas no microscópio eletrônico de varredura ZEISS Auriga Compact, - na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FCM- UERJ), Rio de Janeiro, Brasil.

3.12 Processamento histológico do fígado e coloração das lâminas

O fígado foi fixado em formol tamponado 10%, à temperatura ambiente para a preservação dos tecidos por no mínimo 48 horas. Em seguida, o material foi submetido ao processamento histológico de rotina, iniciando com a desidratação em séries alcólicas crescentes, com 15 minutos em cada etapa, removendo a água dos tecidos. Na próxima etapa, a clarificação por meio de banhos de xilol para facilitar a impregnação da parafina (15 minutos em cada série), e posteriormente a etapa de impregnação, onde o tecido foi mergulhado em parafina líquida a 58°C por 15 minutos por série. As amostras foram então incluídas em um bloco de parafina até solidificar (Molinari et al., 2010). Após a inclusão das amostras, os blocos foram cortados em micrótomo com 5 μm de espessura para a confecção das lâminas.

Os cortes histológicos nas lâminas foram corados em hematoxilina e eosina (H&E) para o estudo e caracterização morfológica do parênquima hepático, Tricrômico de Masson para diferenciar e evidenciar componentes específicos do tecido, como fibras colágenas e elementos celulares, Giemsa para visualização das células presentes no granuloma, e Picrosirius Red para identificação de colágeno nos granulomas (Molinaro et al., 2010).

3.13 Análise histopatológica e estereológica do fígado

Para a análise histopatológica todas as estruturas do tecido hepático foram avaliadas em diferentes aumentos (40X, 100X, 200X, 400X e 1000X) em microscópio de campo claro. As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus Cell Sens Entry 1.18 (Build 16686).

Para a estereologia, que é uma técnica constituída de um sistema de teste, normalmente composto por pontos de teste e/ou linhas de teste sobre um quadro ou área de teste (Weibel, 1981; Mandarin-de-lacerda, 2003), utilizou-se o método estereológico D36 para avaliar a densidade volumétrica das seguintes estruturas: hepatócitos, sinusóides, possível esteatose, células de Kupffer e infiltrado inflamatório calculada sob a seguinte fórmula:

$$Vv(\text{estrutura}) = \frac{Pp(\text{estrutura})}{Pt}$$

Pp corresponde aos pontos onde tocam as estruturas analisadas e Pt os pontos totais do teste (36). A densidade de volume se refere à proporção relativa das estruturas em relação ao volume total do tecido analisado (Mandarin-de lacerda et al., 2003; Brandão-Bezerra et al., 2022).

Foram avaliados 10 campos aleatórios por animal, com aumento de 200x, totalizando 50 campos por grupo.

A quantificação de hepatócitos mononucleados e binucleados foi realizada utilizando o software Image Pro Plus - Media Cybernetics, USA. A contagem de células foi feita em área pré-determinada de 600µm X 800µm (480000 mm²), sendo avaliados dez campos aleatórios, por animal, em objetiva de 10X, totalizando 50 campos por grupo. Para a contagem, foram apenas consideradas as células cujos núcleos foram visualizados (Mandarin-de-lacerda, 2003).

3.14 Classificação, morfometria e quantificação das fibras de colágeno dos granulomas

Utilizando a microscopia de campo claro analisou-se as fases de desenvolvimento e a reação periovular dos granulomas. As principais células envolvidas na resposta inflamatória (eosinófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, plasmócitos, fibroblastos e neutrófilos) e os diferentes estágios do desenvolvimento do granuloma foram quantificados (Lenzi et al., 1998). Para estas análises foram seguidos os seguintes critérios: a) Em todas as análises envolvendo o granuloma, foram considerados 50 granulomas por grupo (10 por animal). b) Para quantificação de células foi utilizado um sistema de escore, sendo considerado: abundante (+++), muito (++), pouco (+), raras (+/-) e ausente (–) (Brandão-Bezerra et al., 2022).

A análise morfométrica dos granulomas foi realizada por meio do analisador digital de imagens equipado com câmera (Bel Photonics DV-5000 - 5.0 MP, Bel Engineering, Monza/Itália) e imagens capturadas pelo programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza/Itália), onde foi obtido os resultados tanto da área quanto do perímetro somente dos granulomas que apresentaram ovos visíveis no centro (Costa-Silva et al., 2002).

3.15 Análise Estatística dos dados

Na análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 10 Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade para verificar se os dados se ajustavam à curva normal de Gauss. Então, os grupos foram comparados utilizando o teste não paramétrico Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn's, Mann-Whitney para resultados com médias nas comparações entre 2 grupos e Chi-quadrado para os resultados em percentual. As medidas com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativamente diferentes. Os dados serão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média ou média $\pm$ desvio padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Dosagens glicêmicas após aplicação da STZ

Na dosagem glicêmica, 10 dias após a aplicação da STZ, considerou-se o nível de glicose acima de 200mg/dL, como uma concentração sanguínea padrão para indicar o diabetes nos animais (Hulstijn et al., 2002; Góes et al., 2016; Birgani et al., 2018). Nos grupos diabéticos

os níveis de glicose foram de 362 ± 146 mg/dL no Grupo DI e no Grupo D 304 ± 185 mg/dL. Nos grupos em que a droga não foi administrada, Grupo CS (145 ± 20 mg/dL) e Grupo I (152 ± 17 mg /dL), os níveis de glicemia se mantiveram abaixo de 200 mg/dL.

4.2 Avaliação da massa corporal e do fígado

4.2.1 Massa corporal dos animais

A massa corporal dos animais foi maior nos grupos de animais diabéticos. O Grupo D, foi maior significativamente quando comparado ao Grupo CS (+22%; $p = 0,0159$). que o Grupo DI, aumentou significativamente comparado ao Grupo I (+9%; $p=0,0079$) Tabela 1.

4.2.2 Massa do fígado

Os resultados da massa do fígado mostraram que o grupo infectado, Grupo (I) apresentou aumento com diferença significativa quando comparado ao Grupo CS (+55%; $p=0,0079$). Já o grupo de animais diabéticos e infectados (DI) apresentou aumento significativo em relação ao grupo diabético (D) (+38%; $p=0,0079$) (Tabela 1).

4.2.3 Relação massa do fígado/massa do animal

Como esperado, observamos aumento significativo na massa relativa do fígado nos grupos infectados. No Grupo I a massa relativa aumentou 37% quando comparado ao Grupo CS ($p=0,0079$). Enquanto o Grupo DI aumentou 41% em relação ao grupo diabético D ($p=0,0079$). Não houve diferenças significativas na comparação entre os Grupos I e DI ($p> 0,05$). (Tabela 1).

Tabela 1 – Massa corporal, massa do fígado e massa relativa do fígado (expresso em gramas) de camundongos diabéticos e/ou infectados pelo *S. mansoni* (média $\pm$ desvio-padrão).

	Grupos			
	CS	I	D	DI
Massa corporal	32 $\pm$ 5,3	35 $\pm$ 1,3	39 $\pm$ 1,5 ^a	38 $\pm$ 1,3 ^c
Massa do Fígado	1,78 $\pm$ 0,16	2,77 $\pm$ 0,14 ^a	1,96 $\pm$ 0,27	2,70 $\pm$ 0,20 ^b
Massa Relativa do Fígado*	5,73 $\pm$ 1,05	7,88 $\pm$ 0,22 ^a	5,01 $\pm$ 0,64	7,05 $\pm$ 0,58 ^b

Legenda: CS: Não infectado e não diabético; I: Infectado; D: Diabético; DI: Diabético e Infectado. *: **Massa Relativa do Fígado= (massa absoluta do órgão/massa corporal do animal) x 100.** (^a): Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao Grupo CS; (^b): Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao Grupo D; (^c): Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao Grupo I.

Fonte: A autora, 2024.

4.3 Análise parasitológica

4.3.1 Recuperação de helmintos adultos e Infectividade

No grupo de animais diabéticos e infectados, Grupo DI, houve um número significativamente maior de machos (+61%; $p=0,0261$), fêmeas (+77%; $p=0,0350$) e no total de helmintos recuperados (+109%; $p=0,0050$) das veias mesentéricas e/ou da veia porta, quando comparado ao Grupo I. O percentual de infectividade apresentou uma diferença de +114% ($p=0,0261$) entre os Grupos DI e I, demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 – Percentual de recuperação de helmintos adultos de *Schistosoma mansoni* em camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos (média $\pm$ desvio-padrão).

Recuperação de Helmintos e Infectividade			
	Grupos		
	I	DI	Valor de p
Machos	13 $\pm$ 5	21 $\pm$ 15 ^c	$p=0,0261$
Fêmeas	9 $\pm$ 3	16 $\pm$ 13 ^c	$p=0,0350$
Total	11 $\pm$ 5	23 $\pm$ 13 ^c	$p=0,0050$
Infectividade (%) *	27	58 ^c	$p=0,0261$

Legenda: I:Infectado; DI: Diabético e Infectado. (*):**Diferença em percentual de helmintos adultos recuperados e das cercarias inoculadas.** (^c): Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao Grupo I.

Fonte: A autora, 2024.

4.3.2- Análises do sistema reprodutor e tegumento dos helmintos machos

Para avaliar as possíveis alterações na morfologia dos vermes adultos desencadeadas pela associação com o DM, usamos a MEV para avaliar as estruturas do tegumento e a microscopia de campo claro e confocal para avaliar o sistema reprodutor.

Nas análises por microscopia de campo claro e confocal (Figuras 9 a 11), os helmintos machos provenientes de animais não diabéticos, apresentaram no interior dos lobos testiculares células com aspecto arredondado e núcleos preservados (Figura 9 - a; Figura 11 - a). Os lobos se apresentavam lado a lado (enfileirados) e com tamanhos semelhantes entre si. A vesícula seminal apresentou alta densidade de espermatozoides (Figura 9- b; Figura 11 - b).

No Grupo DI, animais diabéticos e infectados com *S. mansoni*, os machos recuperados apresentaram tegumento significativamente mais espesso do que os espécimes do grupo infectado (+43%; $p=0,001$) (Tabela 3), porém, com tubérculos íntegros. Havia vacúolos na porção anterior bem como na posterior, em 7 espécimes deste grupo (Figura 10- a). Os lobos testiculares apresentaram morfologia alterada, presença de células imaturas e vacúolos em seu interior (Figura 10-c, d; Figura 11-c, e). Na vesícula seminal foi observado células imaturas e menor densidade de espermatozoides (Figura 10-b; Figura 11- d, f).

A análise por MEV mostrou a superfície do tegumento do *S. mansoni* macho (Figura 12), mostrando que helmintos do Grupo I, apresentaram um tegumento íntegro com presença de numerosos tubérculos com espinhos, presença de sulcos intertuberculares e papilas sensoriais (Figura 12 - a, b, c, d). No entanto, no grupo de animais diabéticos (DI), notou-se alterações no tegumento. Estes espécimes apresentaram tegumento entumecido, áreas com perda dos sulcos intertuberculares e redução na quantidade e leve achatamento de tubérculos (Figura 12 - d, e, f, g).

Tabela 3 – Dados morfológicos e morfométricos do sistema reprodutor de helmintos adultos machos de *Schistosoma mansoni* recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos (média ± desvio-padrão).

Parâmetros	Grupos	
	I	DI
Lobos Testiculares		
Nº de Lobos	8±2	9±2
Densidade de células	++++	+++
Área (µm²)	24922±7807	25460±4882
Perímetro (µm)	850±200	889±143
Comprimento	69,32±19,33	73,03±18,97
Largura	50,65±11,33	44,13±12,52
Vesícula Seminal		
Área (µm²)	1254±534	1314±649
Perímetro (µm)	152,4±40,3	141,7±44,5
Aparelho Digestivo (Esôfago)		
Comprimento (µm)	176,46±83,74	173,49±48,40
Largura (µm)	43,31±36,88	38,24±18,91
Espessura do Tegumento (µm)	6,75±0,71	9,68±1,10 ^c
Tubérculo		
Quantidade ^a	3,73±1,28	4,07±1,03
Altura (µm)	6,98±0,58	7,03±0,88
Largura (µm)	14,71±027	14,24±0,53

Legenda: I: Infectado; DI: Diabético e Infectado. (°): Diferença significativa (p< 0,05) comparado ao Grupo I;
^a medido em 100 µm de comprimento
Fonte: A autora, 2024.

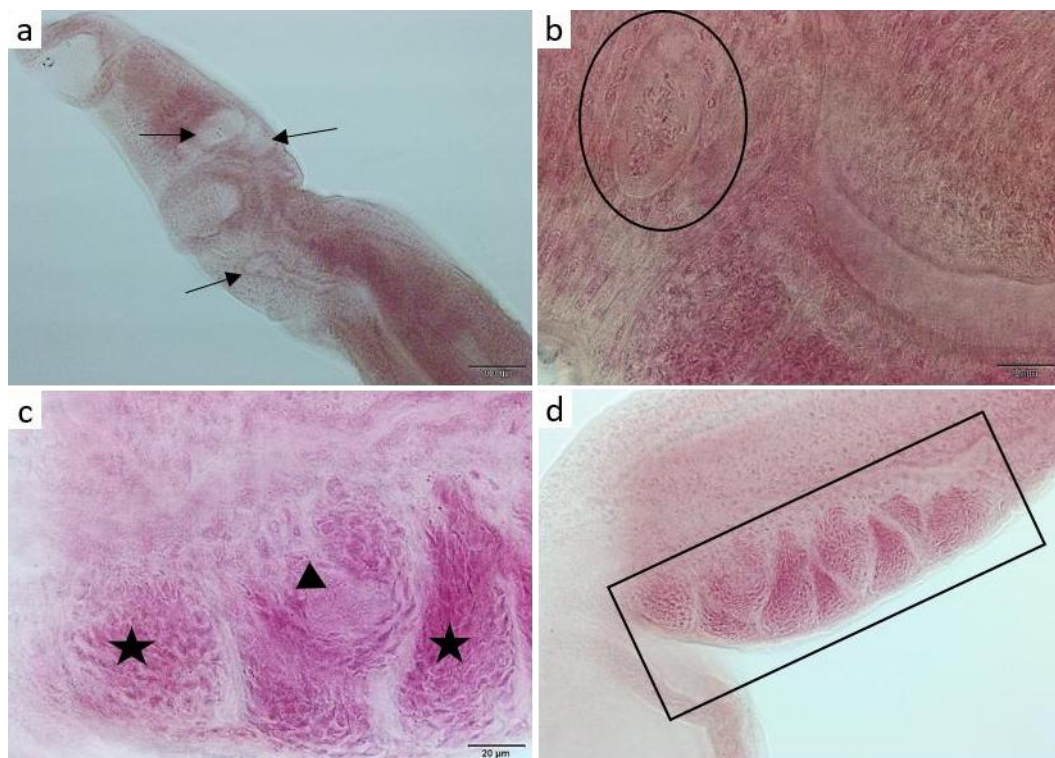
Figura 9- Espécime adulto macho de *Schistosoma mansoni*, recuperado de camundongos infectados e não diabéticos, Grupo I.



Legenda: (Imagem a) - macho do Grupo I apresentando lobos testiculares preservados. Tegumento e espinhos íntegros e ventosa ventral. (Imagem b) - vesícula seminal preenchida com espermatozoides. (VV) ventosa ventral; (LT) lobos testiculares; (retângulo) espinhos; (T) tegumento. Imagem b (círculo) vesícula seminal.

Fonte: A autora, 2024.

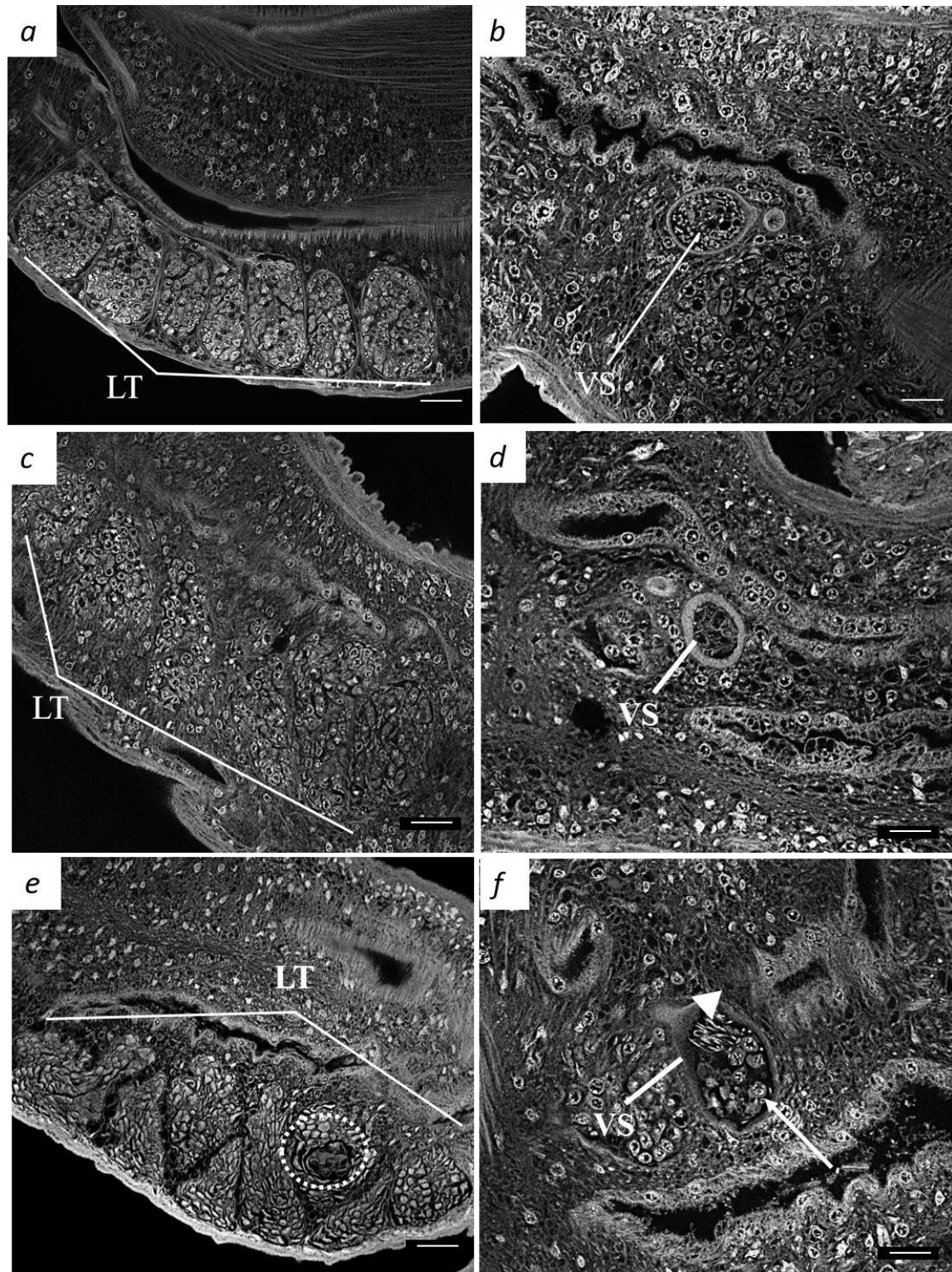
Figura 10- Espécime adulto macho de *Schistosoma mansoni*, recuperado de camundongos infectados e diabéticos, Grupo DI.



Legenda: (Imagem a) - macho do Grupo DI demonstrando presença de vacúolos na porção anterior; (Imagem b) - vesícula seminal com parede espessa; (Imagem c) - presença de vacúolos nos lobos testiculares com células imaturas e maduras; (Imagem d) - alteração na forma dos lobos testiculares e maior espessura no tegumento. (seta) vacúolos; (círculo) vesícula seminal; (cabeça de seta) espaço vazio no lobo testicular; (estrela) diferentes estágios de maturação das células nos lobos testiculares; (retângulo) lobos testiculares em formato triangular.

Fonte: A autora, 2024.

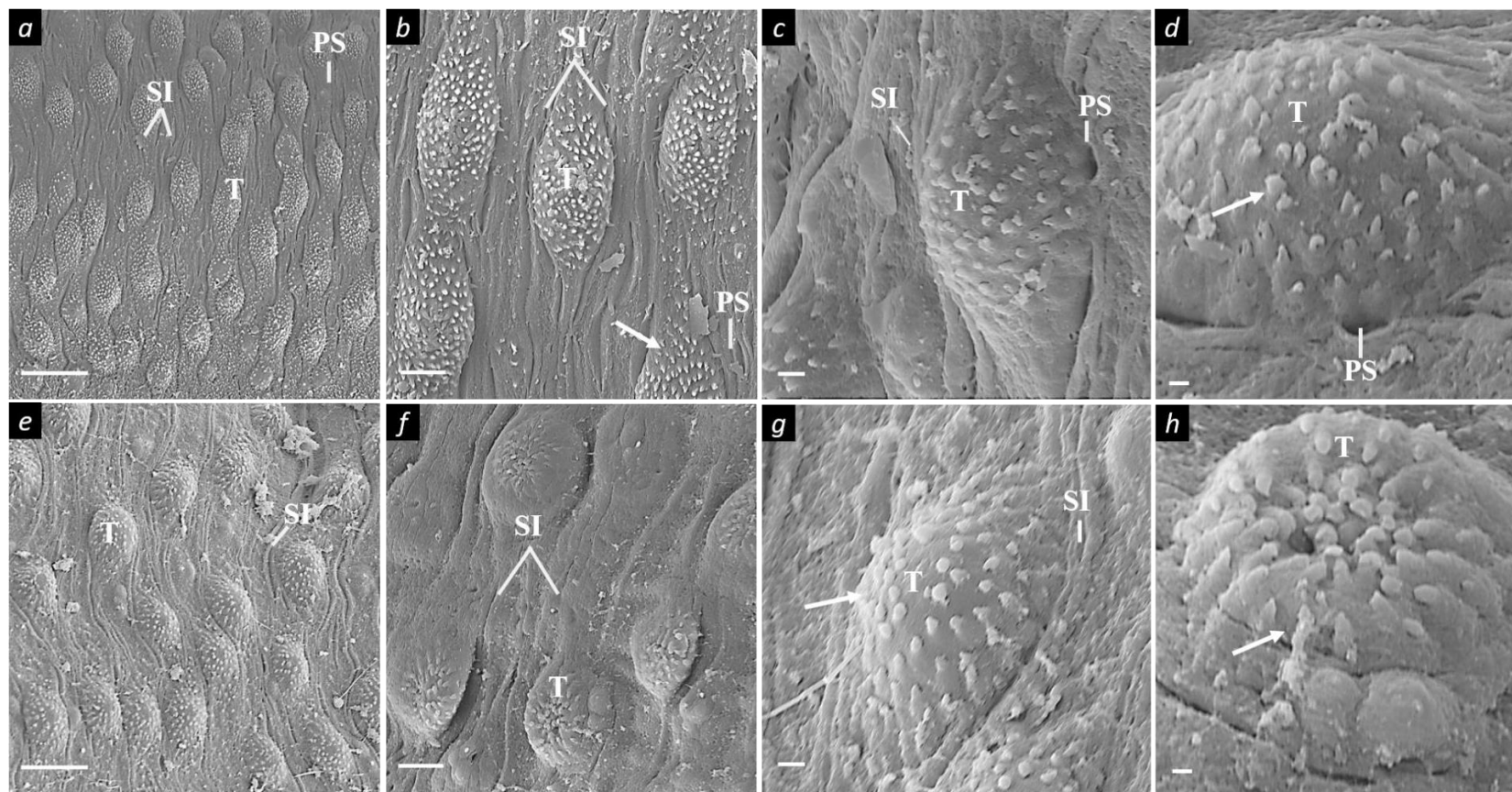
Figura 11 – Microscopia confocal do sistema reprodutor de helmintos adultos machos de *Schistosoma mansoni* recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos.



Legenda: O Grupo I apresentou células com núcleo visível no interior dos lobos testiculares (a), alta densidade de espermatozoides presentes na vesícula seminal (b). Os helmintos dos Grupo DI apresentaram alterações celulares (c, e) e vacúolos no interior dos lobos testiculares (c, e), presença de células imaturas e de menor densidade de espermatozoides dentro da vesícula seminal (d, f). LT: lobos testiculares; círculo: vacúolos; VS: vesícula seminal; cabeça de seta: espermatozoides; Seta: células germinativas. Barras - 50 μm.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da região ântero-dorsal de *Schistosoma mansoni* adulto macho de *Schistosoma mansoni* recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos.



Legenda: Os helmintos do grupo somente infectado. I (a, b, c e d) apresentaram tegumento normal (a) tubérculos com numerosos espinhos (b), presença de sulcos intertuberculares (c) e de papilas sensoriais (d). Em animais diabéticos (DI), os helmintos apresentaram entumescimento no tegumento (e), com perda dos sulcos intertuberculares (f) e em algumas áreas (f,g,h), menor quantidade e achatamento de tubérculos (g,h). T: tubérculos; Seta: espinhos; SI: sulcos intertuberculares; PS: papilas sensoriais. Imagens (a, g) = 50 μ m; (b, f) = 10 μ m; (c, g) = 2 μ m; (e, h) = 1 μ m. Fonte: A autora, 2024.

4.3.3 Análises do sistema reprodutor dos helmintos fêmeas

Na análise por microscopia de campo claro e confocal dos helmintos fêmeas provenientes de animais não diabéticos (I), o ovário apresentou aspecto normal e maturação regular dos oócitos que mantinham forma arredondada com tamanhos semelhantes entre eles (sem dismorfia ou variação no tamanho celular) e, alguns destes, estavam sendo liberados. (Figura 13 – a; Figura 15 – a). As glândulas vitelínicas encontravam-se com sua morfologia inalterada e organizadas, apresentando uma disposição em formato de “cachos de uva” (Figura 13 – b; Figura 15 – b).

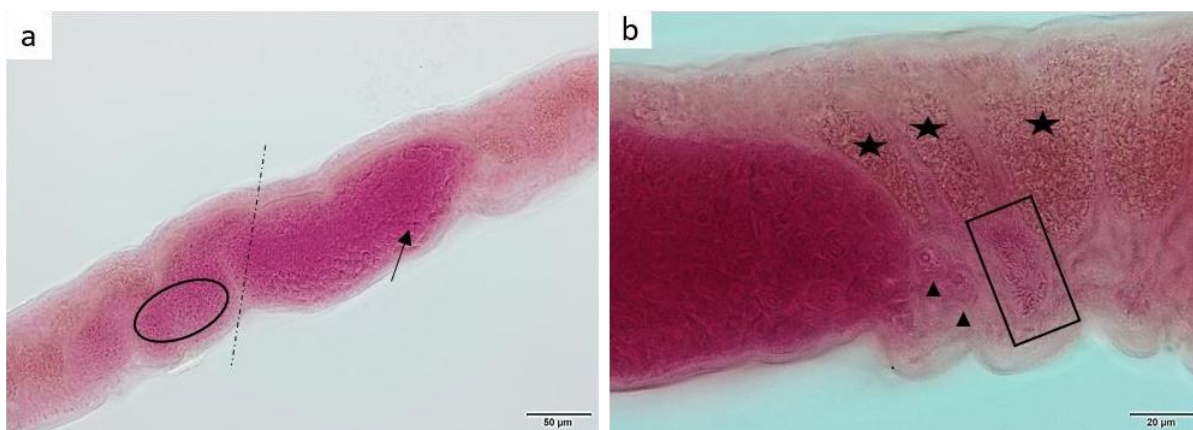
Ao analisarmos os espécimes fêmeas do Grupo DI, constatou-se que o ovário estava mais alongado, com área significativamente maior do que nas fêmeas do Grupo I (+21%; $p=0,0150$) (Tabela 4). Em relação a maturação dos oócitos no ovário, o Grupo DI apresentou maior quantidade de células imaturas (Figura 14-a; Figura 15- e). Os oócitos maduros estavam dispostos aproximadamente no terço final do órgão e apresentavam variação no tamanho e pleomorfismo (formatos triangulares e retangulares) (Figura 14-a, b; Figura 15- c). Observou-se também no ovário deste Grupo (DI), espaços vazios entre as células, que estavam dispostas de modo desorganizado, com falta de coesão (Figura 14-a, b; Figura 15- c). A espermateca encontrava-se bem preenchida (Figura 14- c). As glândulas vitelínicas encontravam-se com morfologia alterada, sem o formato habitual de “cachos de uva”, e dispostas de maneira desorganizada (Figura 14- d; Figura 15- d, f).

Tabela 4- Dados morfológicos e morfométricos do sistema reprodutor de helmintos adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos (média ± desvio-padrão).

Parâmetros		Grupos	
		I	DI
Densidade de glândulas vitelínicas(%)		++++	++
Ovário			
Maturação dos oócitos		Regular	Diminuída
Oócitos liberados		2±0,5	3±1,1
Área (µm²)		19756±5905	24049±3552 ^c
Perímetro (µm)		709±177	824±186
Densidade de espermatozoides na espermateca		++++	++++
Espermateca			
Área (µm²)		669±237	802±121
Perímetro (µm)		121±33	183±87

Legenda: I: Infectado; DI: Diabético e Infectado. (°): Diferença significativa (p< 0,05) comparado ao Grupo I. (++) preenchimento em torno de ½; (+++) preenchimento em torno de 2/3; (+++++) preenchimento total.
Fonte: A autora, 2024.

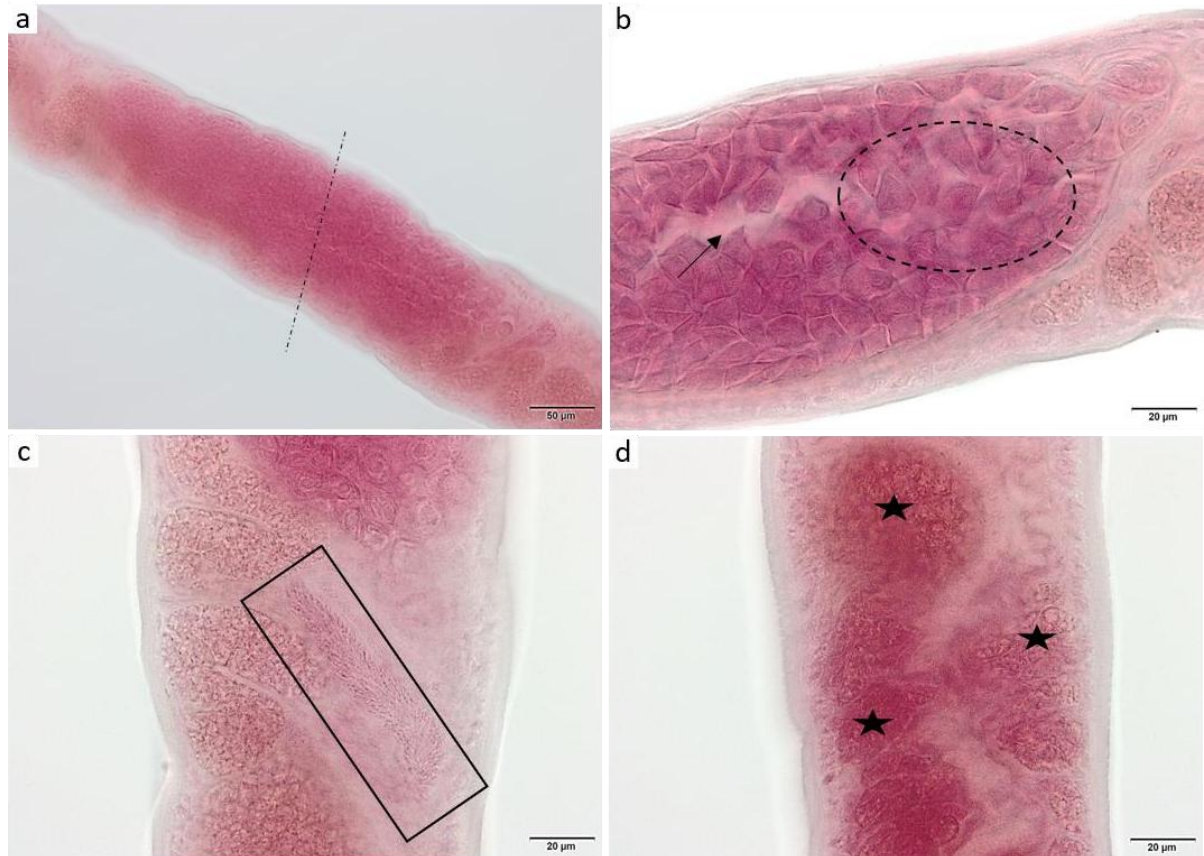
Figura 13- Sistema reprodutor de espécimes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni*, recuperados de camundongos infectados e não diabéticos, Grupo I.



Legenda: (Imagem a) - Ovário de fêmea do Grupo I. (Imagem b) - Liberação dos oócitos; (círculo) oócitos imaturos; (linha tracejada) oócitos iniciando a maturação; (seta) oócitos prontos para serem liberados pelo órgão; (cabeça de seta) oócitos maduros sendo liberados do ovário; (retângulo) espermateca preenchida com espermatozoides; (estrela) glândulas vitelínicas com morfologia inalterada e organizadas.

Fonte: A autora, 2024.

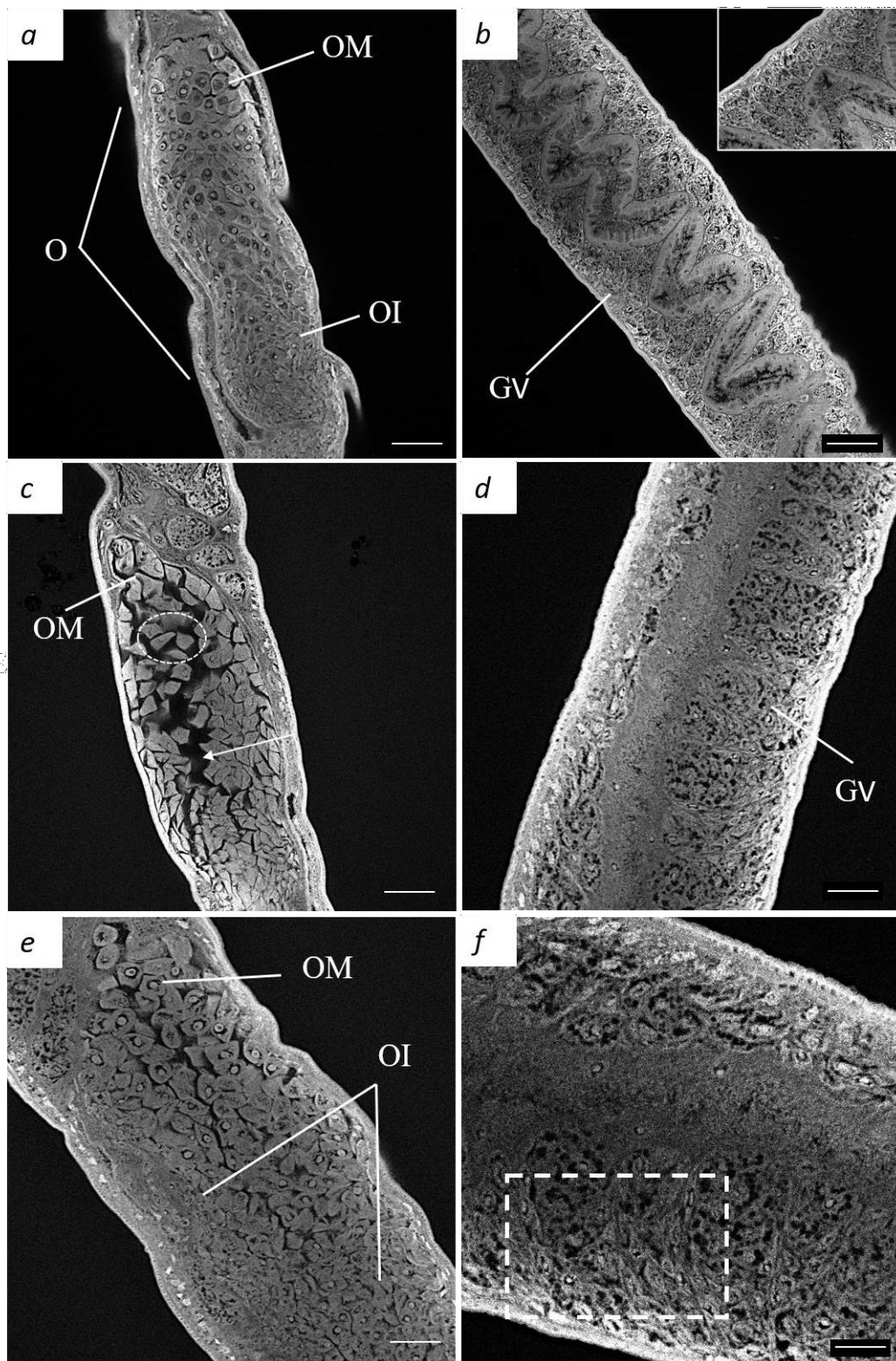
Figura 14- Sistema reprodutor de espécimes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni*, recuperados de camundongos infectados e diabéticos, Grupo DI.



Legenda: (Imagem a) Maturação de células no ovário. (Imagem b) Oócitos no ovário. (Imagem c) Espermateca preenchida por espermatozoides. (Imagem d) – Glândulas Vitelínicas. (cabeça de seta) hemácias no aparelho digestivo; (retângulo tracejado) espessura do tegumento; (seta) presença de vacúolos; (linha tracejada) divisão aproximada entre células imaturas e células em maturação; (círculo) oócitos pleomórficos; (seta) espaços vazios entre os oócitos; (retângulo) espermateca preenchida por espermatozoides; (estrela) glândulas vitelínicas com morfologia alterada e desorganizadas.

Fonte: A autora, 2024.

Figura 15 – Microscopia confocal do sistema reprodutor de helmintos adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* recuperados de camundongos Swiss Webster diabéticos e não diabéticos.



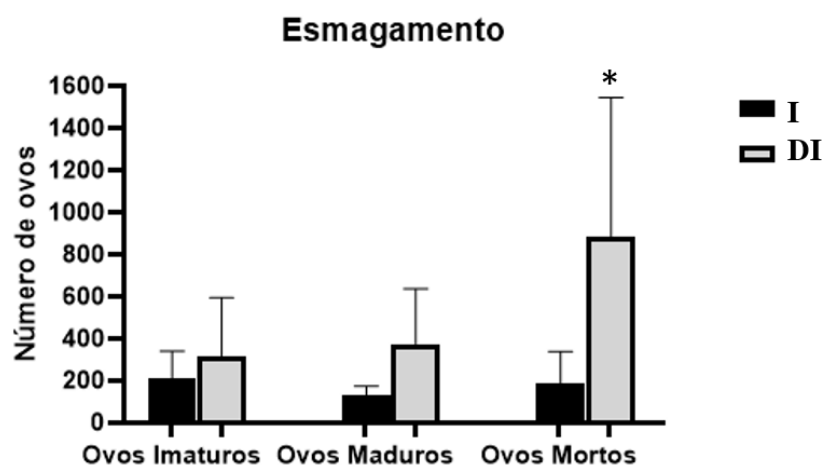
Legenda: No Grupo I, ovário com aspecto normal e com maturação regular dos oócitos (a); Glândulas vitelínicas com morfologia inalterada, formato de “cachos de uva” (b); No Grupo DI, ovário com células pleomórficas, espaços vazios (c) e maturação irregular de oócitos (e). Glândulas vitelínicas com alteração celular (d,f). O: ovário; OM: oócitos maduros; OI: oócitos imaturos; círculo: oócitos pleomórficos; seta: espaços vazios; GV: glândulas vitelínicas; Retângulo: desorganização celular nas glândulas vitelínicas. Barras=50μm.

Fonte: A autora, 2024.

4.3.4 Oograma por esmagamento

Os dados obtidos do oograma no intestino delgado estão representados no Gráfico 1. Os animais diabéticos apresentaram maior percentual de ovos imaturos (+49,5%), maduros (+186%) e mortos, (+371; $p=0,0497$) quando comparados aos animais do Grupo I.

Gráfico 1– Oograma por esmagamento do intestino delgado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e diabéticos ou não (média $\pm$ desvio-padrão).



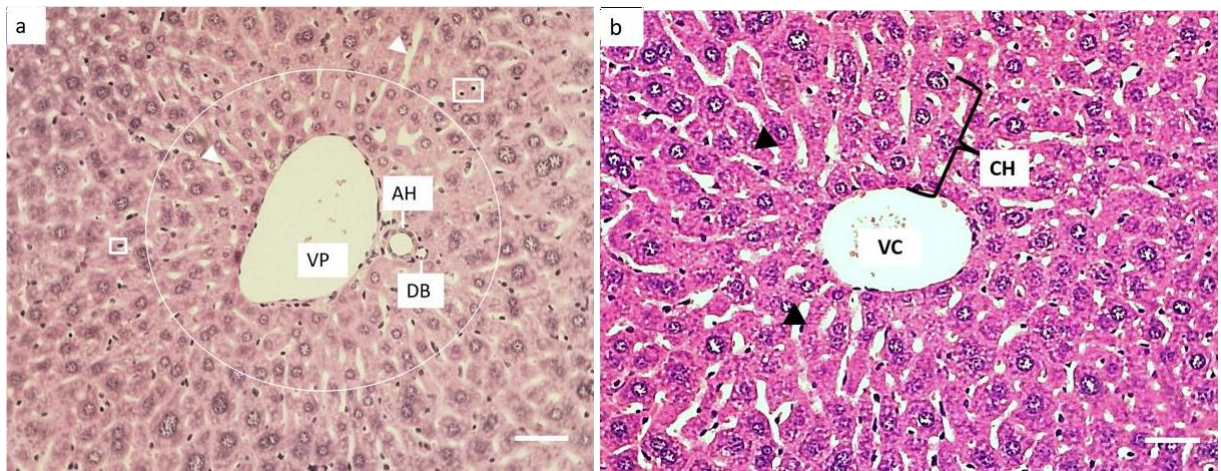
Legenda: I: Infectado; DI: Diabético e Infectado. (*): Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao Grupo I.
Fonte: A autora, 2024.

4.4 Histopatologia e Análises qualitativas do tecido hepático

4.4.1 Histopatologia

Como esperado, o parênquima hepático dos camundongos do Grupo CS (não infectados e não diabéticos) (Figura 16 – a, b) estava com aspecto normal com cordões de hepatócitos bem preservados, permeados por finos capilares, os sinusóides, e em seu interior notou-se a presença de macrófagos residentes, as células de Kupffer (Figura 16 -a). Além destas estruturas, o espaço porta (composto pela veia porta, artéria hepática e ducto biliar) (Figura 16 - a), e veia centrolobular (Figura 16- b) estavam íntegros nesse grupo.

Figura 16 – Parênquima hepático de camundongos não infectados e não diabéticos (Grupo CS).

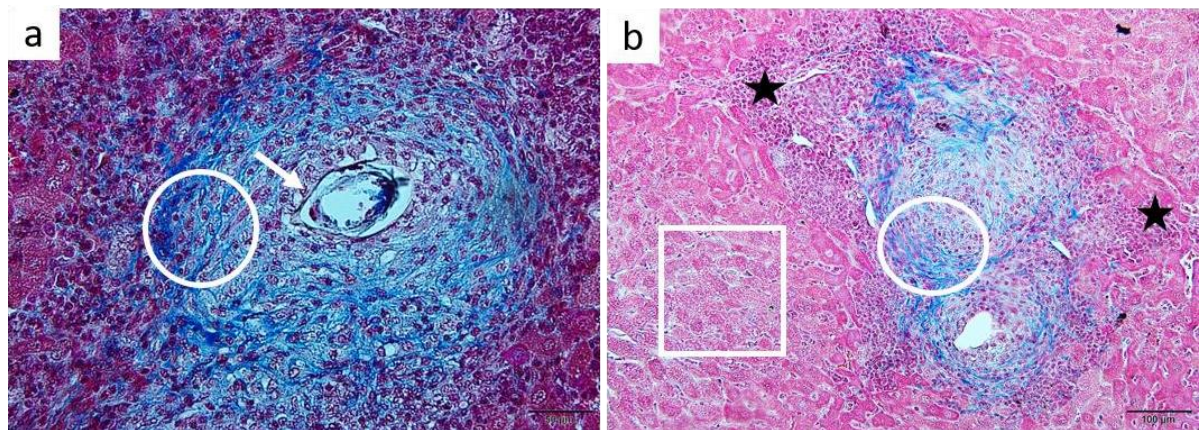


Legenda: (a,b) -Parênquima hepático composto pelo espaço porta, veia centrolobular e cordões de hepatócitos, permeados por sinusóides. (a) veia porta, artéria hepática e ducto biliar, formando o espaço porta; (b) veia centrolobular e sinusóides entre os cordões de hepatócitos. (circulo) - espaço porta; (VP)- veia porta; (AH) - artéria hepática; (DB) - ducto biliar; (quadrado) células de Kupffer; (cabeça de seta) - sinusóides; (CH) - cordões de hepatócitos; (VC)- veia centrolobular; Cortes corados em HE, Barras=60 µm.

Fonte: A autora, 2024.

Na análise histopatológica do Grupo I foram percebidas as típicas alterações hepáticas decorrentes da infecção esquistossomótica (Figura 17- a,b). Lesões periovulares com formação de granulomas (Figura 17 - a), majoritariamente dos tipos exsudativo (fase pré-granulomatosa) e exsudativo-produtivo (fase granulomatosa). Nestes granulomas notou-se a presença de eosinófilos, macrófagos, células gigantes, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos. Nas áreas adjacentes aos granulomas, observou-se os danos no parênquima hepático com formação de tecido necrótico, hiperemia além de intenso infiltrado leucocitário (Figura 17- b).

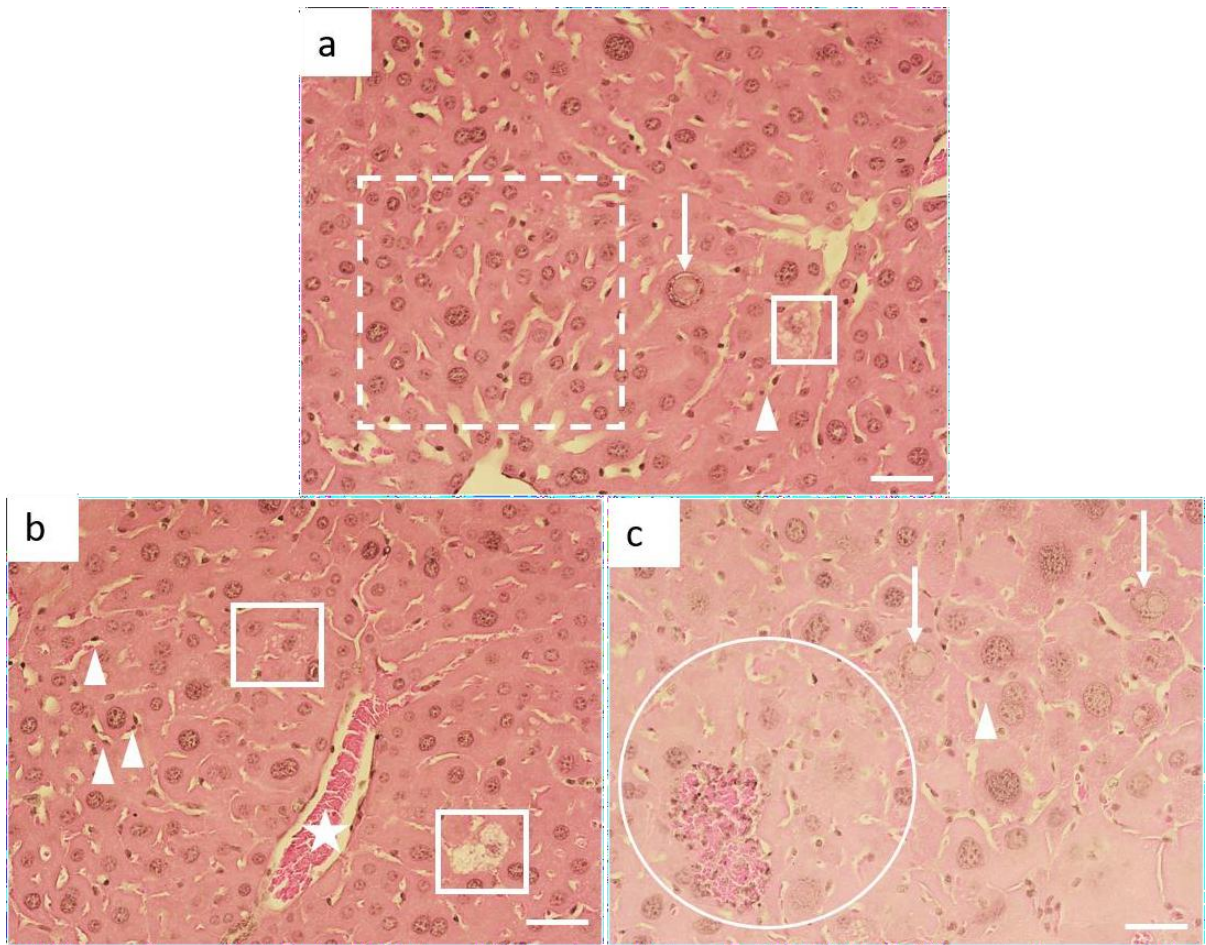
Figura 17 – Parênquima hepático de camundongos infectados e não diabéticos (Grupo I).



Legenda: (a,b)- Formação de granulomas no parênquima hepático, infiltrado celular e lesões no tecido perigranuloma. (a) granuloma de tipo exsudativo b) formações granulomatosas, com lesões no tecido adjacente, sugerindo diapedese e infiltrado leucocitário. (seta) -ovo de *Schistosoma mansoni*; (círculo) – agregado celular ao redor do ovo, composto por leucócitos e fibras de colágeno; (estrela) – infiltrado celular; (quadrado)- lesões do tecido hepático. Cortes corados em Tricrômico de Masson; Barras=50 μ m (imagem a) e 100 μ m (imagem b).
Fonte: A autora, 2024.

No Grupo D, a análise histopatológica apontou hiperplasia e hipertrofia dos hepatócitos, que apresentaram citoplasma mais rosado do que o habitual (Figura 18- a, b, c). Muitos hepatócitos apresentaram núcleos com alterações (endonucleases desnaturadas) (Figura 18- a, c) e conjuntamente, áreas de necrose no tecido (Figura 18- c). Além do mais, constatou-se uma retração nos sinusóides e campos com hiperemia nos vasos e capilares (Figura 18- b). Focos de infiltrados celulares e de microesteatose hepática foram visualizados pelo tecido e, observou-se também, a presença acentuada das células de Kupffer (Figura 18- a, b, c).

Figura 18 - Parênquima hepático de camundongos não infectados e diabéticos (Grupo D).

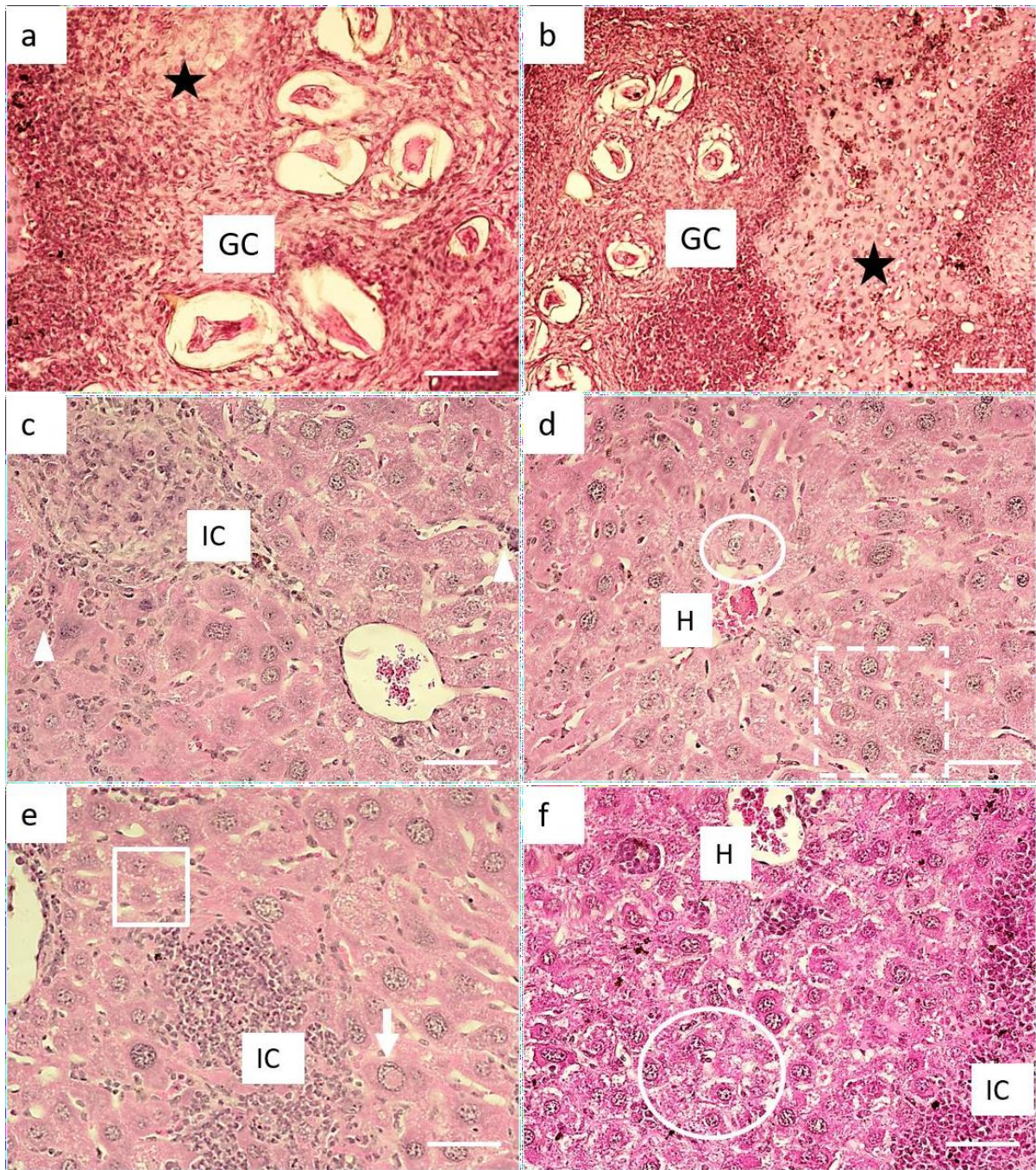


Legenda: (a,b,c)- Alterações no tecido hepático dos animais com diabetes, induzida por estreptozotocina. (a) Fígado com hiperplasia celular, foco de microesteatose e hepatócito com alteração nuclear; b) Presença acentuada das células de Kupffer nos sinusoides, hiperemia e focos de microesteatose hepática; c) Áreas de necrose no tecido e hepatócitos com alterações nucleares. (seta) – alteração nuclear nos hepatócitos; (cabeça de seta) - células de Kupffer; (círculo) – área de lesão necrótica no tecido; (estrela) – hiperemia; (quadrado)- microesteatose hepática; (quadrado tracejado) - hiperplasia celular. Cortes corados em H&E. Barras=60 μ m.

Fonte: A autora, 2024.

A infecção esquistossomótica associada ao diabetes causou alterações importantes no tecido hepático dos animais deste Grupo (DI) (Figura 19- a, b, c, d, e, f). Extensas áreas de degradação e degeneração do tecido foram visualizadas. Havia numerosos granulomas em confluência e nas áreas adjacentes foi possível observar necrose tissular (Figura 19- a, b). No núcleo dos hepatócitos, notou-se alterações em seu tamanho além de alterações estruturais (endonucleases desnaturadas) (Figura 19- d, e). A degeneração hidrópica caracterizada pela presença de vacúolos no citoplasma dos hepatócitos, também foi observada (Figura 19- c, d, f). Foi possível constatar uma desorganização na estrutura dos lobos hepáticos, microesteatose hepática e finalmente, hiperemia nos vasos e capilares (Figura 19- c, d).

Figura 19 – Parênquima hepático de camundongos infectados e diabéticos (Grupo DI).



Legenda: (a, b, c, d e, f) Alterações no tecido hepático dos animais esquistossomóticos associado ao diabetes, induzida por estreptozotocina. (a) Granulomas em confluência; b) Extensa área de necrose adjacente aos granulomas; c) Diapedese a partir de veia centro lobular e infiltrado leucocitário; d) Hepatócitos com tamanhos irregulares e hiperemia nos vasos; e) Hepatócito com alteração nuclear, próximo a infiltrado leucocitário e microesteatose hepática; f) Degeneração hidrópica em hepatócitos. (GC) granulomas em confluência; (estrela) – necrose tissular; (seta) – alteração nuclear nos hepatócitos; (cabeça de seta) – células de Kupffer; (círculo) – área de degeneração hidrópica no tecido; (quadrado tracejado) - diferentes tamanhos dos núcleos dos hepatócitos; (IC)- Infiltrado Celular; (H)- Hiperemia; (quadrado)- microesteatose hepática. Cortes corados em H&E. Barras=60 µm. Fonte: A autora, 2024.

4.4.2 Análises Quantitativas do fígado

4.4.2.1 Estereologia- Método D36

Para avaliação do percentual da densidade de volume de estruturas do tecido hepático, utilizou-se a técnica esterelógica D36. Conforme a Tabela 5, as estruturas avaliadas foram: hepatócitos, sinusóides, esteatose, infiltrado celular e células de Kupffer.

O percentual de volume de hepatócitos apresentou diferença significativa, nos Grupos I (-13%; p=0,0195) e DI (-15%; p=0,008), que foram menores quando comparados ao Grupo CS.

Não foram encontradas diferenças estatísticas no percentual da densidade de volume dos sinusóides. Em relação à esteatose hepática, não foram detectadas nos Grupos CS e I.

Como observado na Tabela 5, não houve presença de infiltrado celular no Grupo CS. No entanto, os Grupos I e DI apresentaram maior presença dessas estruturas em relação ao Grupo D, com diferenças significativas: Grupo I x D (+233%; p=0,008) e Grupo DI x D (+200%; p=0,0151).

Com relação às células de Kupffer, o percentual da densidade de volume destas estruturas foi menor nos Grupos CS (-80%; p=0,007), Grupo D (-60%; p=0,006) e Grupo DI (-40%; p=0,026), quando comparados ao Grupo I (Tabela 5).

Tabela 5- Densidade do volume determinada por estereologia D36 (%) das estruturas do fígado de camundongos Swiss Webster diabéticos e/ou infectados pelo *S. mansoni* (média ± erro-padrão).

Parâmetros	Grupos			
	CS	I	D	DI
<i>Hepatócitos</i>	83±2	72±3 ^a	76±3	70±5 ^a
<i>Sinusóides</i>	16±2	12±3	17±3	17±2
<i>Esteatose</i>	-	-	2±1	2±1
<i>Infiltrado Celular</i>	-	10±5 ^b	3±1	9±4 ^b
<i>Células de Kupffer</i>	1±1 ^c	5±2	2±1 ^c	3±1 ^c

Legenda: CS: Não infectado e não diabético; I: Infectado; D: Diabético; DI: Diabético e Infectado. (^a): Diferença significativa (p< 0,05) comparado ao Grupo CS; (^b): Diferença significativa (p< 0,05) comparado ao Grupo D; (^c): Diferença significativa (p< 0,05) comparado ao Grupo I.
Fonte: A autora, 2024.

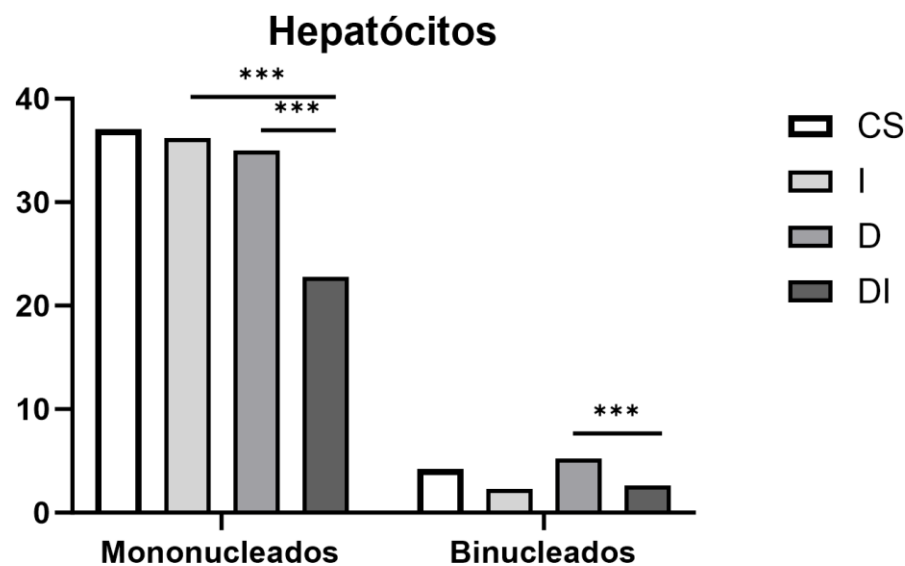
4.4.2.2 Avaliação da remodelação do fígado

A capacidade de remodelação hepática frente aos danos causados pela infecção por *Schistosoma mansoni* e/ou diabetes mellitus, foi avaliada pela quantificação dos hepatócitos mononucleados e binucleados.

Na análise dos hepatócitos mononucleados, observou-se que o Grupo DI (22 ± 5) apresentou uma menor quantidade destas células quando comparado aos Grupos D (35 ± 8) (-37%; $p=0,001$) e Grupo I (36 ± 12) (-38%; $p=0,001$). Não houve diferenças significativas em nenhum grupo quando comparado ao Grupo CS (37 ± 9).

Avaliando a quantidade de hepatócitos binucleados, obtivemos os seguintes resultados: Grupo CS (4 ± 3); Grupo I (2 ± 1); Grupo D (5 ± 3) e Grupo DI (2 ± 1). Houve diferença significativa apenas entre os Grupo DI e D (-60%; $p=0,001$).

Gráfico 2– Quantificação dos hepatócitos mononucleados e binucleados em fígado de camundongos Swiss Webster diabéticos e/ou infectados pelo *S. mansoni*. (média $\pm$ desvio-padrão).



Legenda: CS: Não infectado e não diabético; I: Infectado; D: Diabético; DI: Diabético e Infectado. (***)Diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: A autora, 2024.

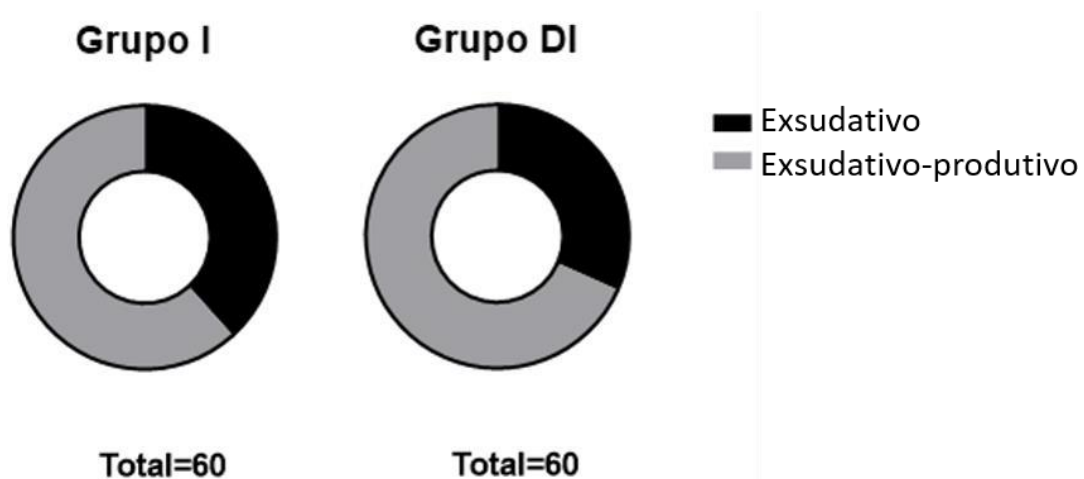
4.5 Avaliação qualitativa e quantitativa dos granulomas hepáticos

4.5.1 Estágios de desenvolvimento dos granulomas hepáticos

Para a classificação dos estágios evolutivos, analisou-se 60 granulomas hepáticos em cada grupo. Lenzi et al., 1998 classificou os granulomas hepáticos em duas fases pré-granulomatosas - fraca e/ou inicial reativa (IR) e exsudativa (E) e três fases granulomatosas - exsudativa-produtiva (EP), produtiva (P) e involutiva (I). Entre os granulomas analisados neste estudo, foram identificados somente os estágios exsudativo (E) e exsudativo-produtiva (EP).

No Grupo I, 38% dos granulomas medidos estavam no estágio exsudativo (E) enquanto os outros 62% no estágio exsudativo-produtiva (EP). Embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa ao compararmos os grupos, no Grupo DI observou-se um número um pouco menor de granulomas exsudativos (32%) e maior do tipo exsudativo-produtiva (68%), conforme gráfico 2.

Gráfico 3- Distribuição percentual dos estágios evolutivos (exsudativo – E; exsudativo-produtiva - EP) dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (I) e diabéticos (DI).



Legenda: I: Infectado; DI: Diabético e Infectado. Total de Granulomas: 60.
Fonte: A autora, 2024.

4.5.2 Morfometria e quantificação de colágeno do granuloma

Para a análise morfométrica dos granulomas, foram medidas tanto a área quanto perímetro, cujo os resultados obtidos estão representados na Tabela 6. Analisou-se os resultados da morfometria independente do estágio dos granulomas (área geral e perímetro geral) e, também, dos dois estágios que estiveram presentes nos grupos (exsudativo e exsudativo-produtivo).

Quanto à área e perímetro gerais não foram observadas diferenças significativas na comparação entre os grupos ($p > 0,05$).

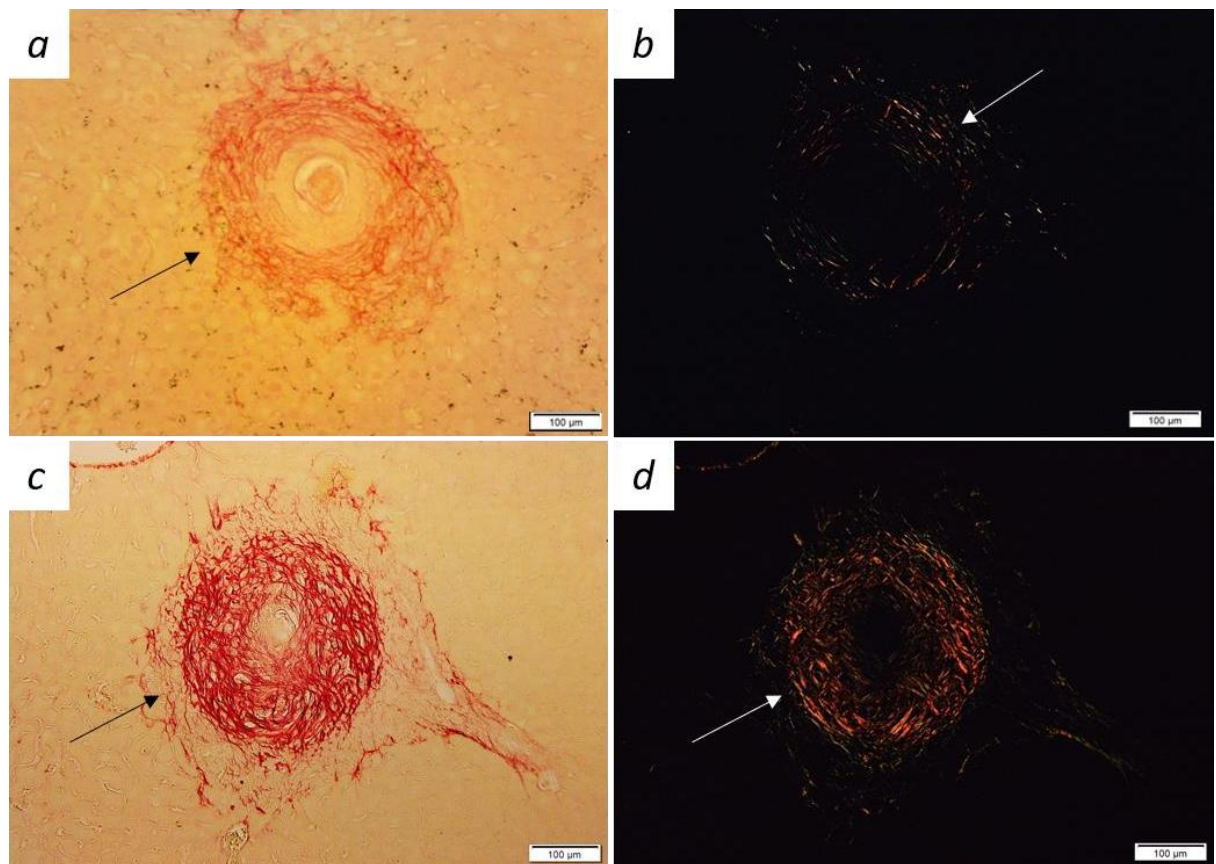
Ao compararmos as medidas de área e perímetro apenas dos granulomas do tipo exsudativo (E), não se observou diferença com significância estatística ($p > 0,05$). Esta mesma análise foi realizada com os granulomas no estágio exsudativo-produtivo (EP), e também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos que obtiveram valores semelhantes entre eles, de acordo com a Tabela 6. Sobre a quantificação de colágeno, foi constatada diferença significativa entre os grupos, com aumento de 76% do Grupo DI comparado ao Grupo I ($p = 0,0159$) (Figura 20; Tabela 6).

Tabela 6- Análise morfométrica dos granulomas (área x perímetro) e quantificação de colágeno (%) do tecido hepático e de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (I) e diabéticos (DI) (média $\pm$ desvio-padrão).

Parâmetros	Grupos	
	I	DI
Área Geral (μm) ²	128449 $\pm$ 63249	140065 $\pm$ 56446
Perímetro Geral (μm)	1421 $\pm$ 366	1477 $\pm$ 305
Exsudativos		
Área(μm) ²	71174 $\pm$ 19787	80271 $\pm$ 21408
Perímetro(μm)	1068 $\pm$ 168	1151 $\pm$ 178
Exsudativos-Produtivos		
Área(μm) ²	164052 $\pm$ 54022	167775 $\pm$ 44811
Perímetro(μm)	1641 $\pm$ 270	1628 $\pm$ 221
Colágeno (%)	3,46 $\pm$ 1,54	6,09 $\pm$ 1,95*

Legenda: I: Infectado; DI: Diabético e Infectado. (*) Diferença significativa ($p < 0,05$) comparado ao Grupo I.
Fonte: A autora, 2024.

Figura 20- Depósito de colágeno em fígado de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e diabéticos ou não.



Legenda: Deposição de colágeno (setas) em áreas de granuloma e em região perivascular, onde pode se observar deposição de colágeno no grupo apenas infectado (a,b). Nos grupos infectados e diabéticos (c,d) ocorreu maior depósito de colágeno nessas áreas. Lâminas coradas com picrosirius (a,c). Imagens obtidas por meio da polarização de luz de lâminas coradas com picrosirius (b,d).

Fonte: A autora, 2024.

4.5.3 Quantificação dos diferentes tipos celulares nos granulomas

Para a quantificação celular foram considerados os seguintes tipos de leucócitos que compõem o granuloma: macrófagos, células gigantes, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos e plasmócitos. Através do sistema de escore, as células foram consideradas como: ausentes (-); raras (+/-); poucas (+); muitas (++) ou em abundância (+++).

A análise dos tipos celulares (Tabela 7) encontrados nos granulomas exsudativos do Grupo I mostrou: abundantes macrófagos e eosinófilos; poucos neutrófilos e linfócitos; raros plasmócitos e células gigantes e, ausência de fibroblastos. Nos granulomas do tipo exsudativo-

produtivo o perfil das células foi: muitos macrófagos e eosinófilos; poucos linfócitos e fibroblastos; e raros plasmócitos, células gigantes e neutrófilos.

Nos granulomas exsudativos no Grupo DI, animais diabéticos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*, o padrão celular encontrado foi: abundantes macrófagos e eosinófilos; muitos neutrófilos (diferentemente do Grupo I); poucos linfócitos, plasmócitos e células gigantes e, ausência de fibroblastos. O perfil de células nos granulomas exsudativos-produtivos deste grupo foi diferente do encontrado no Grupo I: os macrófagos eram abundantes; muitos eosinófilos e fibroblastos, e raros neutrófilos, células gigantes, linfócitos e plasmócitos.

Tabela 7 – Quantificação dos diferentes tipos de células dos granulomas hepáticos de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e diabéticos ou não.

Leucócitos	<u>Grupos</u>			
	I		DI	
	E	EP	E	EP
<i>Macrófagos</i>	+++	++	+++	+++
<i>Células gigantes</i>	+/-	+/-	+	+
<i>Eosinófilos</i>	+++	++	+++	++
<i>Neutrófilos</i>	+	+/-	++	+
<i>Linfócitos</i>	+	+	+	+
<i>Fibroblastos</i>	-	+	-	++
<i>Plasmócitos</i>	+/-	+/-	+	+

Legenda: I: Infectado; DI: Diabético e Infectado E: exsudativo; EP: exsudativo-produtivo. (-) ausentes; (+/-) raras; (+) poucas; (++) muitas; (+++) abundante.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos o comportamento da infecção esquistossomótica quando combinada a patógenos não infecciosas, vem sendo alvo de vários estudos. Neste sentido, a presente pesquisa teve como objetivo, determinar os efeitos do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) induzida por estreptozotocina (STZ) na infecção esquistossomótica em modelo murino experimental, com ênfase nas alterações nos helmintos e no fígado.

O uso da STZ como modelo para o estudo do diabetes mellitus é bem consolidado na literatura e há diversos protocolos descritos tanto para a indução do tipo 1 como para o tipo 2 (Hulstijn et al., 2011; Amer et al., 2023;), com variações nas dosagens, vias de administração, associação com outras drogas (Arab-Sadeghabadi et al., 2018), além do tipo de dieta que será ofertado aos animais. Para o estabelecimento do DM1, inúmeras pesquisas empregam dose única de STZ (Silva et al., 2011), geralmente entre 30 mg/kg e 180 mg/kg, ou múltiplas dosagens menores (Stancic et al., 2022), a depender da idade e modelo animal utilizado no experimento. A STZ causa destruição seletiva das células β -pancreáticas devido a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) levando a uma deficiência na produção de insulina. Os resultados obtidos na glicemia de jejum em nosso estudo, mostraram que a dose empregada de STZ foi eficiente para o estabelecimento do DM1.

Hulstijn et al., (2002), demonstrou em seu estudo que a STZ, aplicada em dose única (180 mg/kg) em camundongos esquistossomóticos (indução do diabetes após a infecção), afetou a oogênese e espermatogênese, causando esterilização nos helmintos de *S. mansoni*. Desse modo, para se evitar a exposição dos helmintos aos efeitos tóxicos desta droga, primeiramente induzimos o DM no modelo experimental, para 30 dias depois infectar os animais.

Ao analisarmos os resultados dos dados biométricos nos grupos com infecção esquistossomótica, Grupos I e DI, constatou-se aumento significativo da massa corporal destes animais. Esse ganho de massa pode ser devido ao aumento de órgãos envolvidos na infecção como fígado (hepatomegalia) e baço (esplenomegalia), causado pela formação dos granulomas e, consequente, hipertensão portal decorrentes desta parasitose (Costa-Silva et al., 2002; Neves et al., 2006; Góes et al., 2012). Nos animais do Grupo D (animais diabéticos), também houve aumento da massa corporal em relação ao grupo controle (CS). O DM é uma desordem metabólica de múltipla etiologia, caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, gordura e proteínas, como resultado da deficiência na produção e/ou ação da insulina. Inúmeros autores destacam a perda de peso como um dos sintomas do DM. No entanto, há também na literatura (Alberti et al., 1998; Bastardas et al., 2007) autores

citando que a gravidade das alterações decorrentes destes distúrbios metabólicos, pode progredir e ocasionar aumento de massa corporal, como visto no presente trabalho.

Neves et al., (2007a) em seus estudos sobre os efeitos da dislipidemia durante a esquistossomose na fase aguda, demonstraram o favorecimento dos helmintos adultos, acarretando em aumento na quantidade de ovos liberados pelas fêmeas e, consequentemente, aumento dos danos ao hospedeiro. Em estudos anteriores, a associação do diabetes e a esquistossomose demonstrou uma diminuição nos níveis de glicose sérica, associado ao consumo de grandes quantidades desse açúcar do hospedeiro pelos vermes adultos, com auxílio de proteínas transportadoras de glicose (SGTP1 e SGTP4 do inglês *Schistosoma glucose transponder*) espalhadas ao longo de todo o seu tegumento (Hulstijn et al., 2001, 2011; You et al., 2014). A glicose é uma molécula de fundamental importância para o desenvolvimento do *S. mansoni*, tendo em vista que é utilizada para que escapem do sistema imunológico do hospedeiro, migrem pelos tecidos e invadam o sistema vascular. Os produtos metabólicos derivados da glicose, como polissacarídeos e glicoproteínas, são incorporados à superfície do seu tegumento, criando uma camada de moléculas do hospedeiro e tornando o *S. mansoni* menos visível ao sistema imunológico (Hambrook e Hanington, 2021).

Possivelmente, a hiperglicemia corrobora a maior quantidade de helmintos recuperados no Grupo DI, que apresentou aumento no número de machos e fêmeas e na infectividade. Em camundongos obesos infectados, o número total de vermes recuperados foi significativamente maior do que aqueles recuperados do grupo de controle infectado (Amer et al., 2023). Alencar et al., 2009 relataram aumento na carga de vermes em animais infectados alimentados com dieta rica em gordura, associando este aumento à modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro. Condições como obesidade, dislipidemia e diabetes mellitus no hospedeiro, demonstraram estar correlacionadas com o aumento da carga de *S. mansoni*, pois nestas situações, o ambiente em que o parasito vive, apresenta uma maior quantidade de recursos disponíveis, beneficiando-o (Amer et al., 2023). Hulstijn et al., (2011) e Amer et al, (2023) em seus estudos, também associaram o DM1 e a esquistossomose, no entanto, sem aumento na quantidade de helmintos recuperados. Deve se considerar que a metodologia utilizada nestes trabalhos citados diverge com esta pesquisa, pois os animais foram infectados 7 dias após a indução do DM1 por STZ.

Embora tenhamos observado um aparente benefício que o aumento de glicose ocasionou para a infecção esquistossomótica, com o aumento no número de parasitos recuperados, quando se analisou o tegumento e o sistema reprodutor dos helmintos, constatou-se alterações importantes que podem prejudicar o ciclo reprodutivo deste parasito, e possivelmente, explicam o maior número de ovos imaturos e mortos encontrado neste grupo.

Preliminarmente, por meio da microscopia de campo claro, observou-se um aumento significativo na espessura do tegumento dos helmintos machos do Grupo DI quando comparados ao Grupo I. O tegumento é uma estrutura complexa— uma bicamada dupla lipídica — formando a interface entre o parasito e o hospedeiro. Este componente tem papel fundamental para sobrevivência do helminto, sendo crucial para a sua defesa, para que escapem da resposta imune do hospedeiro. E, na aquisição de nutrientes, incluindo carboidratos, aminoácidos, lipídios, lipoproteínas, bem como na excreção de produtos catabólicos, como o ácido láctico (Pereira et al., 2011).

Na análise do tegumento por MEV, observou-se entumescimento, acarretando em diminuição na profundidade dos sulcos intertuberculares e consequente achatamento dos tubérculos. O tegumento é a estrutura primordial para a longevidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. E esta longevidade, depende especialmente de dois processos: o ajuste às condições ambientais do hospedeiro e uma estratégia eficaz para evasão do sistema imunológico (McManus et al., 2020).

Em vista disso, o *S. mansoni* utiliza glicose por meio de transportadores específicos, SGTP1 e SGTP4 (You et al., 2014), localizados em seu tegumento, que facilitam a importação desta molécula da corrente sanguínea do hospedeiro (Krautz-Peterson et al., 2010; McKenzie et al., 2018). Em um ambiente hiperglicêmico, ocorre regulação positiva destes transportadores, promovendo maior captação de glicose e suprimindo as necessidades energéticas do parasito para seu crescimento e reprodução (You et al., 2014). Porém, ao mesmo tempo em que se aproveitam deste ambiente rico em glicose, possivelmente os helmintos também precisam se adaptar, mediante a este meio ainda mais hostil, devido a inflamação decorrente do DM1.

Um hospedeiro com hiperglicemia expõe o helminto a um ambiente com inflamação sistêmica, pois o DM1 está associado a um aumento de vários biomarcadores inflamatórios, que desempenham um papel significativo na patogênese do DM e suas complicações (Sater et al., 2023). Pesquisas indicam que a hiperglicemia crônica desencadeia uma cascata de respostas inflamatórias, levando a níveis elevados de citocinas específicas e marcadores como: IL1- β e IL1- α (Fatima et al., 2016; Gouda et al., 2018), TNF- α e Proteína C-Reativa (PCR) (Arroyo et al., 2013). Sugere-se então que, este aumento na espessura do helminto, deve-se a uma adaptação a este ambiente com maior inflamação em que está inserido. Devido à sua plasticidade fenotípica, comum aos trematódeos (Neves et al., 2004) o aumento na espessura do tegumento pode servir como uma barreira protetora contra ataques do sistema imunológico do hospedeiro (Augusto et al., 2019). Nesta interação (parasito x hospedeiro), a morfologia, o metabolismo e o comportamento do parasito em curto prazo se adaptam buscando o sucesso da infecção e do seu desenvolvimento (Xavier, 2013; Augusto et al., 2019).

A associação da infecção experimental pelo *S. mansoni* e a ingestão de etanol à 18% por 28 dias, constatou diversas alterações morfológicas no helminto, como: danos no tegumento dos parasitos machos com modificações nos espinhos e tubérculos, descamação tegumentar e lesões erosivas (Brandão-Bezerra et al., 2019), demonstrando o quanto o ambiente em que está inserido, interfere diretamente nesta estrutura primordial para sua sobrevivência.

As alterações encontradas no oograma e no sistema reprodutor dos helmintos observadas em nossos estudos, possivelmente explicam a menor excreção fecal de ovos em camundongos diabéticos encontrados nos trabalhos de Hulstijn, et al., (2001, 2011). Além disto, foi observado em estudos anteriores, maior número de ovos mortos imaturos e um baixo número de ovos maduros em camundongos diabéticos, sustentando a hipótese de que, em camundongos com DM1, a maturação dos ovos é prejudicada (Amer et al., 2023).

As alterações metabólicas decorrentes de altos níveis de glicose no hospedeiro, podem impactar significativamente no sistema reprodutivo do *S. mansoni*, afetando sua morfologia e suas capacidades reprodutivas por vários mecanismos. Estudos apontam que a glicosilação de proteínas no tegumento do helminto, pode impactar no sistema reprodutor, particularmente, por meio da regulação na produção de ovos e mecanismos de evasão imunológica (Hulstijn et al., 2001, 2011; Reis et al., 2024). Este processo de glicosilação, é mediado principalmente por glicosil hidrolases, como a α -N-acetilgalactosaminidase (SmNAGAL), que desempenha um papel preponderante na coordenação da oviposição em fêmeas (Hulme et al., 2021). Reis et al., (2024), demonstraram que uma dieta com alta carga glicêmica modula a gravidade da esquistossomose, afetando potencialmente a atividade do SmNAGAL e consequentemente a carga parasitária em geral. Neste sentido, a glicosilação de proteínas devido à hiperglicemia do hospedeiro, não pode ser descartada como um mecanismo originador do comprometimento visto no sistema reprodutor dos helmintos, acarretando então, em aumento na quantidade de ovos imaturos (Hulstijn et al. 2001), sendo necessários mais estudos que abordem esta questão. Camundongos esquistossomóticos com desnutrição proteica apresentaram alterações importantes no sistema reprodutor e tegumento dos vermes adultos, quando comparados aos animais esquistossomóticos alimentados com ração padrão (Neves et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Barros et al., 2009). A associação da esquistossomose e uma dieta rica em lipídios, também gerou modificações no sistema reprodutivo dos helmintos (Neves et al., 2007). Estes estudos demonstram que o *S. mansoni* depende da fisiologia do hospedeiro e qualquer modificação neste equilíbrio pode acarretar em danos a morfologia do parasito

A infecção esquistossomótica causa graves danos ao fígado, que são bem documentados, entretanto o impacto da associação com outras doenças, como o DM1 são

escassos. Durante a infecção, as fêmeas iniciam a oviposição nas veias do mesentério, e alguns ovos acabam sendo carregados pela corrente sanguínea, ficando retidos, devido ao calibre dos vasos, principalmente no fígado. Os antígenos provenientes destes ovos retidos, mobilizam a produção das interleucinas, estimulando uma resposta imunológica de perfil Th2 (Candido et al., 2017). Este tipo de resposta induz o linfócito B a produzir IgE e IgG, e a diferenciação de eosinófilos, mastócitos e macrófagos M2 (Candido et al., 2017). Estes tipos celulares são importantes componentes dos granulomas hepáticos ao redor dos ovos (Castro et al., 2018). Com o progresso da inflamação inicia-se a proliferação de fibroblastos a partir da periferia do granuloma, com deposição de colágeno (Cheever et al., 2002; Lins et al., 2008) acarretando em expansão de fibras no espaço portal e intra-hepático e obstrução da veia porta (Costa-Silva et al., 2002; Neves et al., 2006; Alencar et al., 2009).

O estudo histopatológico do fígado dos animais do Grupo D, revelou alterações decorrentes do DM1, (como focos de infiltrados celulares, microesteatose hepática, hiperplasia e hipertofia de hepatócitos) bem como danos químicos (sugere-se endonucleases desnaturadas nos hepatócitos), causados pelo uso da STZ. Pesquisas indicam que o STZ não afeta apenas as células β -pancreáticas, mas também leva a estresse oxidativo significativo e alterações no parênquima hepático. Şanci et al., (2024), constatou que a STZ induz estresse oxidativo, levando à peroxidação lipídica e diminuição da atividade enzimática antioxidante no fígado, promovendo lesões ao órgão. Pesquisas abordando este tema, também relatam maiores níveis séricos de enzimas hepáticas, como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), indicando lesão hepatocelular (Bae e Ahn, 2022).

Em estudos anteriores, onde avaliou-se os danos hepáticos manifestados em ratos diabéticos, induzido por STZ, foram vistos: hiperemia na área venosa central, aumento dos espaços sinusoidais, áreas de necrose, danos às células hepáticas, aumento de células em apoptose e microesteatose hepática (Mahata et al., 2021), corroborando os danos hepáticos encontrados no grupo diabético (Grupo D).

A hiperglicemia promove condições inflamatórias e estresse oxidativo, ao desencadear a ativação do fator de transcrição nuclear kappa, (NF- κ B) (Hamway et al., 2022) que por sua vez, estimula a atividade de genes pró-apoptóticos em células hepáticas aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo é uma condição de desequilíbrio entre a proporção de oxidantes e antioxidantes, causando um aumento de radicais livres de oxigênio. Sabe-se, que o fígado desempenha papel primordial na desintoxicação do organismo, por meio antioxidantes potentes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GSH) (Mahata et al., 2021). Neste contexto, a hiperglicemia reduz a atividade destes

antioxidantes (SOD, GSH e CAT), aumentando assim a produção de ROS que contribui para danos ao fígado.

No Grupo DI (animais diabéticos e esquistossomóticos), grupo foco deste estudo, o tecido hepático apresentou manifestações decorrentes da DM1 induzida pela STZ, e também, lesões características da infecção pelo *S. mansoni* causadas pela presença dos granulomas hepáticos (como áreas com infiltrado celular, necrose, presença de fibrose). No entanto, notou-se uma maior intensidade destes danos, devido a estas situações em concomitância.

Para a análise quantitativa das degenerações hepáticas em estudos científicos (Neves et al., 2006a) a estereologia é bastante utilizada. As técnicas estereológicas utilizam a estatística probabilística e a geometria para estimar parâmetros tridimensionais de um tecido ou órgão, a partir da análise de cortes bidimensionais (Mandarim-de-lacerda, 2003). Por meio da técnica D36, observou-se no Grupo DI, menor densidade de volume de hepatócitos e de células de Kuppfer e aumento nos infiltrados celulares. Não somente, por meio da quantificação de células, observou-se um número menor de hepatócitos mononucleados e binucleados (este último somente comparado ao Grupo D) neste grupo. Diante destes dados, sugere-se que a inflamação presente, decorrente da DM1, somada à presença dos granulomas esquistossomóticos, que formam grandes infiltrados celulares, levou à uma intensa desorganização no parênquima hepático, contribuindo para estas alterações. Neves et al, (2006) também observaram mudanças quantitativas intensas na estrutura hepática em camundongos esquistossomóticos e dislipidêmicos demonstrando que a infecção por esquistossomose mansônica pode de fato sobrecarregar a lesão hepática com base em uma situação já patológica.

Estudos apontam que o fígado possui uma capacidade única de remodelação em resposta a uma ampla gama de lesões físicas e químicas (Wu et al., 2023). Em mamíferos pode-se repor até 70% da massa e funcionalidade deste órgão quando lesionado (Bangru e Kalsotra, 2020; Wu et al., 2023). No entanto, esta remodelação hepática pode ser comprometida após certas lesões xenobióticas, infecções, inflamações crônicas ou consumo excessivo de álcool por exemplo (Cordero-Espinoza e Huch, 2018; Chembazhi et al, 2021). Estes dados corroboram a diminuição de hepatócitos mono e binucleados encontradas neste grupo (DI). Possivelmente, a intensidade das lesões causadas pela esquistossomose e DM1 em simultâneo, comprometeram a capacidade de restauração deste órgão.

Amer et al., (2023) também associou a DM1 induzida por STZ, e a infecção pelo *S. mansoni*, e ao analisar os granulomas hepáticos, encontrou predominância de granulomas em estágio E e EP (exsudativo e exsudativo-produtivo, respectivamente), sem diferenças estatísticas nas medidas dos granulomas entre os grupos, em concordância com nosso estudo.

O aumento do colágeno presente nos granulomas esquistossomóticos de hospedeiros diabéticos (Grupo DI), pode estar relacionado com a intensa resposta inflamatória gerada nesta comorbidade. Essa relação é evidenciada pelo papel de várias células e citocinas (Wang et al., 2023) que contribuem tanto para a inflamação quanto para a fibrose na esquistossomose (Souza et al., 2020; Silva et al., 2024).

As células estreladas hepáticas (CEH), localizadas no espaço de Disse, no fígado, são a principal fonte de colágeno no fígado e adquirem fenótipo de miofibroblastos passando a depositar matriz extracelular em regiões com lesão (HAYASHI et al., 1999; LEE et al., 2007). A ativação das CEH e sua subsequente deposição de colágeno é estimulada pelas citocinas: TGF- β (Wang et al., 2023), IL-6 (Kagan et al., 2017), IL-4, IL-13 (Sugimoto et al., 2005) IL-1 β e TNF- α (Robert et al., 2016). Como já mencionado anteriormente, a intensa resposta inflamatória decorrida neste grupo, pode gerar níveis aumentados das citocinas citadas, acarretando em maior estímulo e consequente aumento na deposição de colágeno neste grupo.

Estes resultados evidenciam a importância de novas análises como a dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias que ajudarão a esclarecer melhor o estado inflamatório.

Em suma, pode-se sugerir que o DM1 associado a esquistossomose aguda experimental pode aumentar o número de helmintos recuperados, alterar a espessura do seu tegumento e o seu sistema reprodutivo, além de exacerbar os danos ao parênquima hepático do hospedeiro. Por fim, destaca-se que um ambiente hiperglicêmico que poderia favorecer o helminto, na verdade produz efeitos muito prejudiciais à sua morfologia e à saúde do hospedeiro, desregulando a dinâmica parasitária e demonstrando a dinâmica complexa envolvida nesta relação.

CONCLUSÃO

Concluiu-se neste trabalho que o diabetes mellitus pode modificar aspectos da infecção esquistossomótica experimental, alterando o tegumento e o sistema reprodutivo dos helmintos, e exacerbando os danos ao parênquima hepático do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- Al-Awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9051426.
- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998;15(7):539-53.
- Alencar ACMB, Neves RH, Águila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Gomes DC, Machado-Silva JR. High fat diet has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(4):608–13.
- Alencar AMBC, Santos TS, Neves RH, Lopes Torres EJ, Nogueira-Neto JF, Machado-Silva JR. Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult *Schistosoma mansoni* in hypercholesterolemic mice. *Exp Parasitol*. 2016 Aug;167:115-23
- Amer AS, Othman AA, Dawood LM, El-Nouby KA, Gobert GN, Abou Rayia DM. The interaction of *Schistosoma mansoni* infection with diabetes mellitus and obesity in mice. *Sci Rep*. 2023 Jun 9;13(1):9417.
- Andrade ZA. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(5):51–7.
- Arab-Sadeghabadi Z, Ziamajidi N, Abbasalipourkabir R, Mohseni R. Garlic (*Allium sativum*) increases SIRT1 and SIRT2 gene expressions in the kidney and liver tissues of STZ- and STZ+niacinamide-induced diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018 Sep 25;29(5):463-7.
- Augusto RC, Duval D, Grunau C. Effects of the environment on developmental plasticity and infection success of *Schistosoma* parasites – an epigenetic perspective. *Front Microbiol*. 2019;10:1475.
- Bae C, Ahn T. Albumin infusion ameliorates liver injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Med-Czech*. 2022;67(5):245-56.
- Bangru S, Kalsotra A. Cellular and molecular basis of liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;100:74-87.
- Barros LA, Neves RH, de Moura EG, Machado-Silva JR. Effects of low-protein diet on *Schistosoma mansoni* morphology visualized by morphometry and confocal laser scanning microscopy. *J Helminthol*. 2009 Mar;83(1):13-21
- Bastardas MF, Miserachs MB, Cumeras AR, León MC, Canadell MG, Fernández DY, et al. Hepatomegalia por depósito de glucógeno hepático y diabetes mellitus tipo 1 [Hepatomegaly due to glycogen storage disease and type 1 diabetes mellitus]. *An Pediatr (Barc)*. 2007 Aug;67(2):157-60
- Bezerra FSM, Leal JKF, Sousa MS, Pinheiro MCC, Ramos AN Jr, Silva-Moraes V, Katz N. Evaluating a point-of-care circulating cathodic antigen test (POC-CCA) to detect

- Schistosoma mansoni* infections in a low endemic area in north-eastern Brazil. *Acta Trop.* 2018 Jun;182:264-70
- Bina CJ, Prata A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(2):211-6.
- Birgani GA, Ahangarpour A, Khorsandi L, Moghaddam HF. Anti-diabetic effect of betulinic acid on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic male mouse model. *Braz J Pharm Sci.* 2018;54(2):e17171
- Brandão-Bezerra L, de Carvalho Martins JSC, de Oliveira RMF, Lopes-Torres EJ, Neves RH, Corrêa CL, et al. Long-term ethanol intake causes morphological changes in *Schistosoma mansoni* adult worms in mice. *Exp Parasitol.* 2019 Aug;203:30-5.
- Brandão-Bezerra L, Rosa AAD, Oliveira RMF, Neves RH, Corrêa CL, Machado-Silva JR. Impact of acute schistosomiasis mansoni and long-term ethanol intake on mouse liver pathology. *Exp Parasitol.* 2022;242:108388.
- Brasil. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas. 2024. p. 116.
- Brasil. Boletim Epidemiológico de Doenças Tropicais Negligenciadas. Número Especial. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2021 Mar.
- Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, McManus DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 2009 Apr;31(4):163-76.
- Candido RRF, Pierre TGS, Jones MK, Graeff-Teixeira C. Evaluation of the immunogenicity of *Schistosoma mansoni* egg surface. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(5):652-7.
- Caraballo L. The tropics, helminth infections and hygiene hypotheses. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018 Feb;14(2):99-102.
- Castro VN, Rodrigues JL, Cardoso DT, Resende SD, Magalhães FC, Souza DC, et al. Systemic cytokine and chemokine profiles in individuals with *Schistosoma mansoni* infection and low parasite burden. *Front Immunol.* 2018 Dec 18;9:2975.
- Chaudhry ZZ, Morris DL, Moss DR, Sims EK, Chiong Y, Kono T, Evans-Molina C. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim.* 2013 Oct;47(4):257-65.
- Cheever AW, Andrade ZA, Warren KS, Nakatani M, Stewart G, Moore J, et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):917-40.
- Chembazhi UV, Bangru S, Hernaez M, Kalsotra A. Cellular plasticity balances the metabolic and proliferation dynamics of a regenerating liver. *Genome Res.* 2021;31(4):576-591. PMID: 33649154.
- Coelho PM, Jurberg AD, Oliveira AA, Katz N. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Aug;104(5):720-3.

- Cooke A, Zaccane P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol.* 2004 Jul;20(7):316-21.
- Cordero-Espinoza L, Huch M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *J Clin Invest.* 2018;128(1):85-96.
- Costa-Silva M, Rodrigues-Silva R, Hulstijn M, Neves RH, De Souza Panasco M, Lenzi HL, et al. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: Histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(SUPPL. 1):129-42.
- Costain AH, MacDonald AS, Smits HH. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. *Front Immunol.* 2018 Dec 20;9:3042.
- Costain, A. H. Exploring host-immune-microbial interactions during intestinal schistosomiasis. 2023.
- Coutinho EM, Oliveira SA, Barros AF, Silva FL, Ramos RP. Manson's schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(4):359-66.
- van Crevel R, van de Vijver S, Moore DAJ. The global diabetes epidemic: what does it mean for infectious diseases in tropical countries? *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017 Jun;5(6):457-468.
- Duan Q, Xiong L, Liao C, Liu Z, Xiao Y, Huang R, et al. Population based and animal study on the effects of *Schistosoma japonicum* infection in the regulation of host glucose homeostasis. *Acta Trop.* 2018 Apr;180:33-41
- Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. *PLoS One.* 2012;7(6).
- Da Silva Filomeno CE, Costa-Silva M, Corrêa CL, Neves RH, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR. The acute schistosomiasis mansoni ameliorates metabolic syndrome in the C57BL/6 mouse model. *Exp Parasitol.* 2020;212:107889.
- Fatima N, Faisal SM, Zubair S, Ajmal M, Siddiqui SS, Moin S, Owais M. Role of pro-inflammatory cytokines and biochemical markers in the pathogenesis of type 1 diabetes: correlation with age and glycemic condition in diabetic human subjects. *PLoS One.* 2016 Aug 30;11(8)
- Freire N, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Rey L. A Comparative Parasitologic Study on *Biomphalaria glabrata* Snail and C3H/ He Mice Infected with Human and Murine Isolates of *Schistosoma mansoni* Derived from Sumidouro, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(6):783-7.

- Freitas CR, Barbosa AA Jr, Fernandes AL, Andrade ZA. Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(6):815-22.
- Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Sep 1;70:5.47.1-5.47.20.
- Giribabu N, Karim K, Kilari EK, Kassim NM, Salleh N. Anti-inflammatory, antiapoptotic and proliferative effects of *Vitis vinifera* seed ethanolic extract in the liver of streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes in male rats. *Can J Diabetes*. 2018 Apr;42(2):138-149.
- Góes VC, Neves RH, Alencar AC, Oliveira AV, Gomes DC, Machado-Silva JR. Effects of high-fat chow on heart tissue in acute and chronic experimental murine schistosomiasis mansoni. *Parasitology*. 2012 Sep;139(11):1462-70.
- Góes VC, Neves RH, Arnóbio A, Bernardo-Filho M, Machado-Silva JR. Streptozotocin (STZ) and schistosomiasis mansoni change the biodistribution of radiopharmaceutical sodium (99m)Tc-pertechnetate in mice. *Nucl Med Biol*. 2016 Sep;43(9):581-586.
- Gouda M, Matsukawa M, Iijima H. Associations between eating habits and glycemic control and obesity in Japanese workers with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018 Oct 17;11:647-658..
- Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, Agrawal YO. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chem Biol Interact*. 2016 Jan 25;244:49-63.
- Grenfell RFQ, Pedrosa ML, Couto FFB, Almeida A, Coelho PMZ, Katz N. Suitability of commercially available POC-CCA tests for schistosomiasis: Considerations for efficiency, reproducibility and decision making criteria for field application in areas of low endemicity. *J Immunol Methods*. 2019 Sep;472:1-6.
- Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):383–97.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human Schistosomiasis. *Lancet*. 2006;(368(9541)):1106–18.
- Habicht ME, Eppenberger PE, Rühli F. A critical assessment of proposed outbreaks of plague and other epidemic diseases in Ancient Egypt. *Int J Infect Dis*. 2021 Feb;103:217-9.
- Hambrook JR, Hanington PC. Immune evasion strategies of schistosomes. *Front Immunol*. 2021 Feb 4;11:624178.
- Hams E, Aviello G, Fallon PG. The schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunol*. 2013;4:89.

- Hamway Y, Zimmermann K, Blommers MJJ, Sousa MV, Häberli C, Kulkarni S, et al. Modulation of host-parasite interactions with small molecules targeting *Schistosoma mansoni* microRNAs. *ACS Infect Dis*. 2022 Oct 14;8(10):2028-34
- Hayashi N, Matsui K, Tsutsui H, Osada Y, Mohamed RT, Nakano H, et al. Kupffer cells from *Schistosoma mansoni*-infected mice participate in the prompt type 2 differentiation of hepatic T cells in response to worm antigens. *J Immunol*. 1999;163(12):6702–11.
- Hulme BJ, Geyer KK, Forde-Thomas JE, Padalino G, Phillips DW, Ittiprasert W, et al. *Schistosoma mansoni* α -N-acetylgalactosaminidase (SmNAGAL) regulates coordinated parasite movement and egg production. *PLoS Pathog*. 2022 Jan 13;18(1).
- Hulstijn M, Barros L a, Neves RH, Moura EG, Machado-Silva JR. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. *Parasitology*. 2002;126(Pt 1):53–61.
- Hulstijn M, De Oliveira RMF, De Moura EG, Machado-Silva JR. Lower Faecal Egg Excretion in Chemically-induced Diabetic Mice Infected with *Schistosoma mansoni* Due to Impaired Egg Maturation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(3):393–6.
- Hulstijn M, Barros Lde A, Neves RH, de Moura EG, Machado-Silva JR. Parasitological and morphological study of *Schistosoma mansoni* and diabetes mellitus in mice. *Exp Parasitol*. 2011 Sep;129(1):42-7.
- Hussaarts L, García-Tardón N, van Beek L, Heemskerk MM, Haeberlein S, van der Zon GC, et al. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. *FASEB J*. 2015 Jul;29(7):3027-39.
- Jin D, Zhang B, Li Q, Tu J, Zhou B. Effect of punicalagin on multiple targets in streptozotocin/high-fat diet-induced diabetic mice. *Food Funct*. 2020 Dec 1;11(12):10617-34.
- Kastner MRQ, Kohn A, Teixeira ED, Pitanga LC. Estudo Morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, encontrado na espécie humana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1975;IX(5):247–61.
- Kagan P, Sultan M, Tachlytski I, Safran M, Ben-Ari Z .Both MAPK and STAT3 signal transduction pathways are necessary for IL-6- dependent hepatic stellate cells activation. *PLoS ONE* 12(5): e0176173
- Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 30;3:17016
- Katz N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses. Belo Horizonte: CPqRR; 2018. 76 p.

- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972 Nov-Dec;14(6):397-400
- Khan B, Ullah A, Khan MA, Amin A, Iqbal M, Khan S, et al. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of a methanolic extract of *Debregeasia salicifolia* in alloxan-induced diabetic albino mice. *Braz J Biol*. 2024 Dec 15;84.
- Krautz-Peterson G, Simoes M, Faghiri Z, Ndegwa D, Oliveira G, Shoemaker CB, Skelly PJ. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *PLoS Pathog*. 2010 Jun 3;6(6)
- Lambertucci JR. Acute schistosomiasis mansoni: Revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(4):422–35.
- Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology*. 2007;45(3):817–25.
- Lenzi HL, Kimmel E, Schechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RG, et al. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(Suppl. 1):141–51.
- Lins RAB, Souza JS, Andrade ZA, Guerra JL, Araújo CA, Silva TM, Cury PM. Distribution of eosinophils at different stages of hepatic granuloma evolution in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(2):173-8.
- Lovic D, Piperidou A, Zografou I, Grassos H, Pittaras A, Manolis A. The growing epidemic of diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol*. 2020;18(2):104-9.
- Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93 Suppl 1:303–7
- Magliano DJ, Boyko EJ; IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. *IDF Diabetes Atlas*. 10th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2021.
- Mahata LE, Ali H, Murni AW. Effect of streptozotocin on liver histology damage in rat model of gestational diabetes mellitus. *Int J Res Rev*. 2021;8(9):18-22.
- Mandarim-de-lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003;75(4):469–86.
- Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras*. 2009 Jan-Feb;24(1):69-74
- McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Aug 9;4(1):13.

- McManus DP, Bergquist R, Cai P, Ranasinghe S, Tebeje BM, You H. Schistosomiasis-from immunopathology to vaccines. *Semin Immunopathol*. 2020 Jun;42(3):355-371.
- McKenzie M, Kirk RS, Walker AJ. Glucose uptake in the human pathogen *Schistosoma mansoni* is regulated through Akt/protein kinase B signaling. *J Infect Dis*. 2018 Jun 5;218(1):152-64.
- Menezes CA, Montresor LC, Jangola STG, de Mattos AC, Domingues ALC, Júnior AM, et al. FioSchisto's expert perspective on implementing WHO guidelines for schistosomiasis control and transmission elimination in Brazil. *Front Immunol*. 2023 Dec 5;14:1268998.
- Menezes DL, Santos CTJ, Oliveira YL, Campos VT, Negrão-Corrêa DA, Geiger SM, et al. Accuracy study of Kato-Katz and Helmintex methods for diagnosis of schistosomiasis mansoni in a moderate endemicity area in Sergipe, Northeastern Brazil. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Jan 31;13(3):527.
- Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. 2ª ed. EPSJV: IOC, 2010. 254 p.
- Neves RH, Pereira MJ, de Oliveira RM, Gomes DC, Machado-Silva JR. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodent and human isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93 Suppl 1:309–12.
- Neves RH, Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Oliveira SA, Coutinho EM, Lenzi HL, et al. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: A comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(7):1013–6.
- Neves RH, De Oliveira SA, Machado-Silva JR, Coutinho E, Gomes DC. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: A morphometric study focusing on the reproductive system. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):405–7.
- Neves RH, Costa-Silva M, Martinez EM, Branquinho TB, Oliveira RMF de, Lenzi HL, et al.. Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) evidenced by brightfield and confocal laser scanning microscopies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004Mar;99(2):131–6.
- Neves RH, De Lamare Biolchini C, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Branquinho TB, Lenzi HL, et al. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol Res*. 2005;95(1):43–9.
- Neves RH, Alencar ACMDB, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006a;101(SUPPL. 1):253–60.

- Neves RH, Alencar ACMB, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. Somatic, Biochemical and Hepatic Alterations in Wild Type Mice Chronically Fed High Fat Diet. *Int J Morphol*. 2006b;24(4):625–32.
- Neves RH, Alencar ACMB, Aguila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. *J Helminthol*. 2007a;81(4):361–8.
- Neves RH, Alencar ACMB, Costa-Silva M, Águila MB, Mandarin-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, et al. Long-term feeding a high-fat diet causes histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. *Exp Parasitol*. 2007b;115(4):324–32.
- Oliveira SA, Barbosa AA Jr, Gomes DC, Machado-Silva JR, Barros AF, Neves RH, Coutinho EM. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Jul;98(5):623-7
- Oliveira SM, Gomides APM, Mota LMHD, Lima CMBL, Rocha FAC. Intestinal parasites infection: protective effect in rheumatoid arthritis? *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2017 Sep-Oct;57(5):461-5.
- Oyeyemi OT, Corsini CA, Gonçalves G, de Castro Borges W, Grenfell RFQ. Evaluation of schistosomula crude antigen (SCA) as a diagnostic tool for *Schistosoma mansoni* in low endemic human population. *Sci Rep*. 2021 May 18;11(1):10530.
- Pearce EJ, MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(7):499-511.
- Pearce EJ, Kane CM, Sun J, Taylor JJ, McKee AS, Cervi L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunol Rev*. 2004 Oct;201:117-26.
- Pereira AS, Padilha RJ, Lima-Filho JL, Chaves ME. Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2011 Nov;109(5):1395-402.
- Reis LFCD, Cerdeira CD, Silva LCC, Ramos ABSB, Silva JEC, Castro AP, et al. Dietary glycemic and energy load differentially modulates *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation and response to antiparasitic chemotherapy. *Acta Trop*. 2024 Apr;252:107141.
- Rey L. *Parasitologia*. 4a Ed. Guanabara Koogan; 2008.
- Robert S, Gicquel T, Bodin A, Lagente V, Boichot E (2016) Characterization of the MMP/TIMP Imbalance and Collagen Production Induced by IL-1 β or TNF- α Release from Human Hepatic Stellate Cells. *PLoS ONE* 11(4): e0153118.

- Sater MS, AlDehaini DMB, Malalla ZHA, Ali ME, Giha HA. Plasma IL-6, TREM1, uPAR, and IL6/IL8 biomarkers increment further witnessing the chronic inflammation in type 2 diabetes. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2023 Feb 28;44(3):259-69.
- Şancı E, Köksal ÇK, Dağdeviren M, Yiğittürk G, Buhur A, Erbaş O, et al. Oxidative stress and inflammatory markers in streptozotocin-induced acute and subacute toxicity response. *Drug Chem Toxicol.* 2024;1-16.
- Scaratti M, Johann GR, Argenta C, Zanatta EA. Content and semantics validation of an application for adolescents with diabetes mellitus. *Acta Paul Enferm.* 2023;36.
- Schwartz C, Fallon PG. *Schistosoma* "eggs-iting" the host: granuloma formation and egg excretion. *Front Immunol.* 2018 Oct 29;9:2492.
- Silva M, Lima WG de, Silva ME, Pedrosa ML. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011Feb;55(1):46–53
- Da Silva AM, Corrêa CL, Neves RH, Machado-Silva JR. A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice. *Exp Parasitol.* 2012;132(2):193-9.
- Silva JRM, Neves RH, Gomes DC. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, editors. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2008. p. 43-84.
- Silva TD, Gonçalves-Santos E, Gonçalves RV, Souza RLM, Caetano JE, Caldas IS, et al. Matrix metalloproteinases inhibition reveals the association between inflammation, collagen accumulation and intestinal translocation of *Schistosoma mansoni* eggs in vivo. *Int Immunopharmacol.* 2024;127:111353
- Simões C, Neves RH, De Andrade Barros L, Brito PD, Cravo CO, De Moura EG, et al. Parasitological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in Swiss mice with underlying malnutrition. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(SUPPL. 1):143–7.
- Siqueira LMV, Couto FFB, Taboada D, Oliveira ÁA de, Carneiro NF de F, Oliveira E, et al.. Performance of POC-CCA® in diagnosis of schistosomiasis mansoni in individuals with low parasite burden. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;May;49(3):341–7.
- Souza COS, Gardinassi LG, Rodrigues V and Faccioli LH (2020) Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis. *Front. Microbiol.* 11:1973.
- Stancic A, Velickovic K, Markelic M, Grigorov I, Saksida T, Savic N, et al. Involvement of ferroptosis in diabetes-induced liver pathology. *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):9309.

- Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M, et al. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int.* 2005;25(2):420-8.
- Tang CL, Lian Z, Ding FR, Liang J, Li XY. Schistosoma-related molecules as a new strategy to combat type 1 diabetes through immune regulation. *Parasitol Int.* 2024 Feb;98:102818.
- Torres EJ, Nascimento AP, Menezes AO, Garcia J, dos Santos MA, Maldonado A Jr, et al., A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in Brazil: Morphological and histological studies. *Vet Parasitol.* 2011;176(2-3):226-35.
- Toren E, Burnette KS, Banerjee RR, Hunter CS, Tse HM. Partners in crime: beta-cells and autoimmune responses complicit in type 1 diabetes pathogenesis. *Front Immunol.* 2021 Oct 7;12:756548.
- Wang S, He L, Xiao F, Gao M, Wei H, Yang J, et al. Upregulation of GLT25D1 in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via the TGF- β 1/SMAD3 Pathway *In Vivo* and *In vitro*. *J Clin Transl Hepatol.* 2023;11(1):1-1
- Weibel ER. Stereological methods in cell biology: where are we-where are we going? *J Histochem Cytochem.* 1981 Sep;29(9):1043-52.
- Wu MS, Liang JT, Lin YD, Wu ET, Tseng YZ, Chang KC. Aminoguanidine prevents the impairment of cardiac pumping mechanics in rats with streptozotocin and nicotinamide-induced type 2 diabetes. *Br J Pharmacol.* 2008 Jun;154(4):758-64.
- Wu Y, Li N, Shu X, Li W, Zhang X, Lü D, Long M. Biomechanics in liver regeneration after partial hepatectomy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1165651.
- Xavier AM, Tavares D, Guimarães EV, Sarro-Silva MF, Silva AC, de Moraes Neto AH. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non-antihelminthic treated and low-inflammatory mice by transmission electron microscopy (TEM). *Acta Trop.* 2014 Feb;130:51-7.
- Xue Q, Deng Y, Liu Y, Wang Y, Hu W, Huang Y, Yang K. A retrospective analysis of schistosomiasis related literature from 2011-2020: Focusing on the next decade. *Acta Trop.* 2023;238:1-5.
- You H, Stephenson RJ, Gobert GN, McManus DP. Revisiting glucose uptake and metabolism in schistosomes: New molecular insights for improved schistosomiasis therapies. *Front Genet.* 2014;11(5):1–8.
- Zaccone P, Fehérvári Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol.* 2003 May;33(5):1439-49.