

INTRODUÇÃO

A Esquistossomose mansônica

A esquistossomose é uma importante parasitose, sendo considerada a segunda maior doença tropical, superada apenas pela malária, devido a sua importância e repercussão econômica e de saúde pública. Está diretamente relacionada a áreas de extrema pobreza com expressivo comprometimento dos serviços de saneamento básico e educação sanitária igualmente deficiente.

Estima-se que mais de 600 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas para esquistossomose e mais de 200 milhões estejam infectadas no mundo (Vennervald & Dunne, 2004). No Brasil sua ocorrência está restrita as regiões Norte, Nordeste, e no norte das regiões Sul e Sudeste (Coura & Amaral, 2004) (Figura 1).

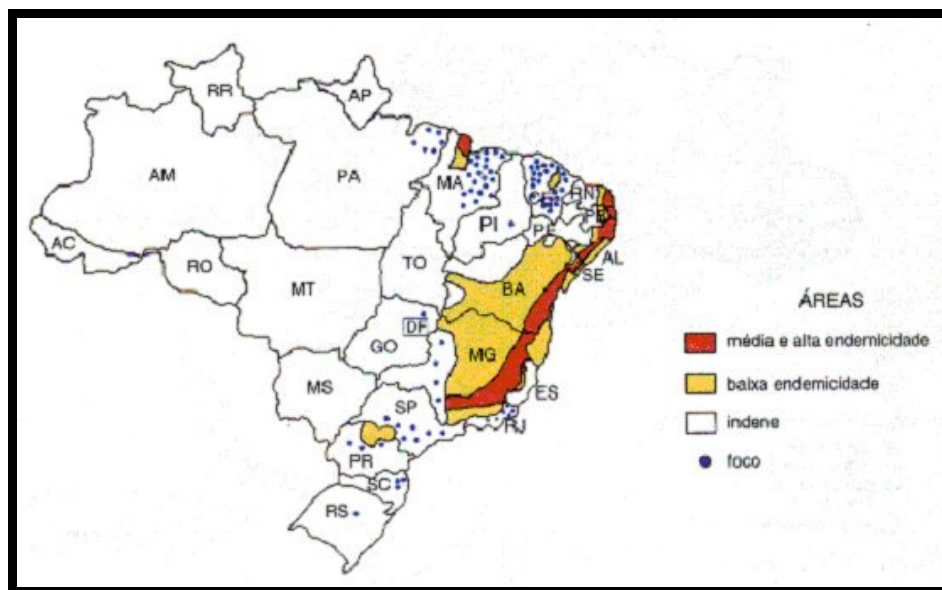


Figura.1 – Mapa de distribuição da esquistossomose no Brasil (Coura & Amaral, 2004).

A doença, no Brasil é causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Diferentemente de outros trematódeos, os representantes da família Schistosomatidae, onde está a espécie *S. mansoni*, apresentam sexos separados. O macho mede cerca de 0,6 a 1,4 cm de comprimento, possui corpo cilíndrico, com duas ventosas – uma oral anterior e uma ventral posterior - e sua coloração é branca. As fêmeas têm o corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que o do macho (1,2 a 1,4 cm), parece mais escura e acinzentada por conter em seu tubo

digestivo um pigmento derivado da digestão de sangue (a hemozoína). Os indivíduos dessa espécie apresentam ainda tegumento complexo e trato digestivo incompleto (Fig. 2).

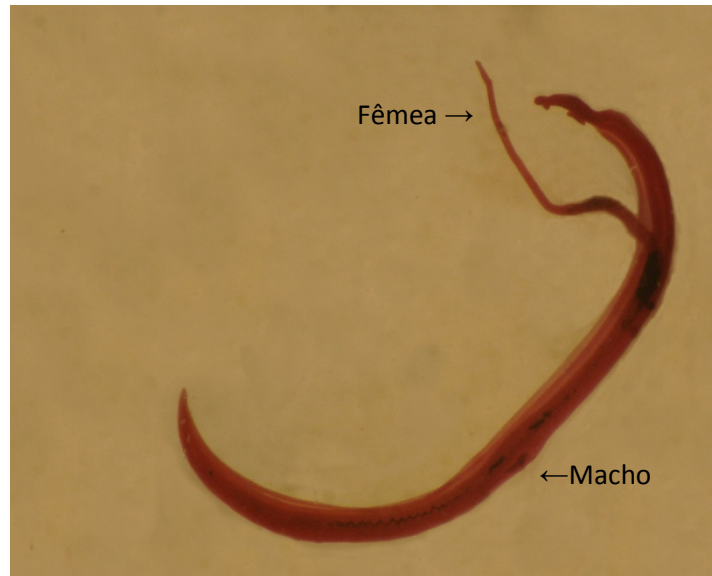


Figura. 2 – Vermes adultos de *Schistosoma mansoni* – Carmim clorídrico, 4x.

Fonte: Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto – UERJ

O *S. mansoni* possui um ciclo de vida com dois estágios distintos que alternam gerações entre um hospedeiro intermediário (invertebrado) e um hospedeiro definitivo (vertebrado) (Fig. 3). Três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* - *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* - são os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no Brasil (Pessoa & Martins, 1982). Durante a infecção dos vertebrados, o ovo apresenta-se como o estágio de maior relevância na indução de eventos relacionados à interação parasito-hospedeiro.

Esquistossomose

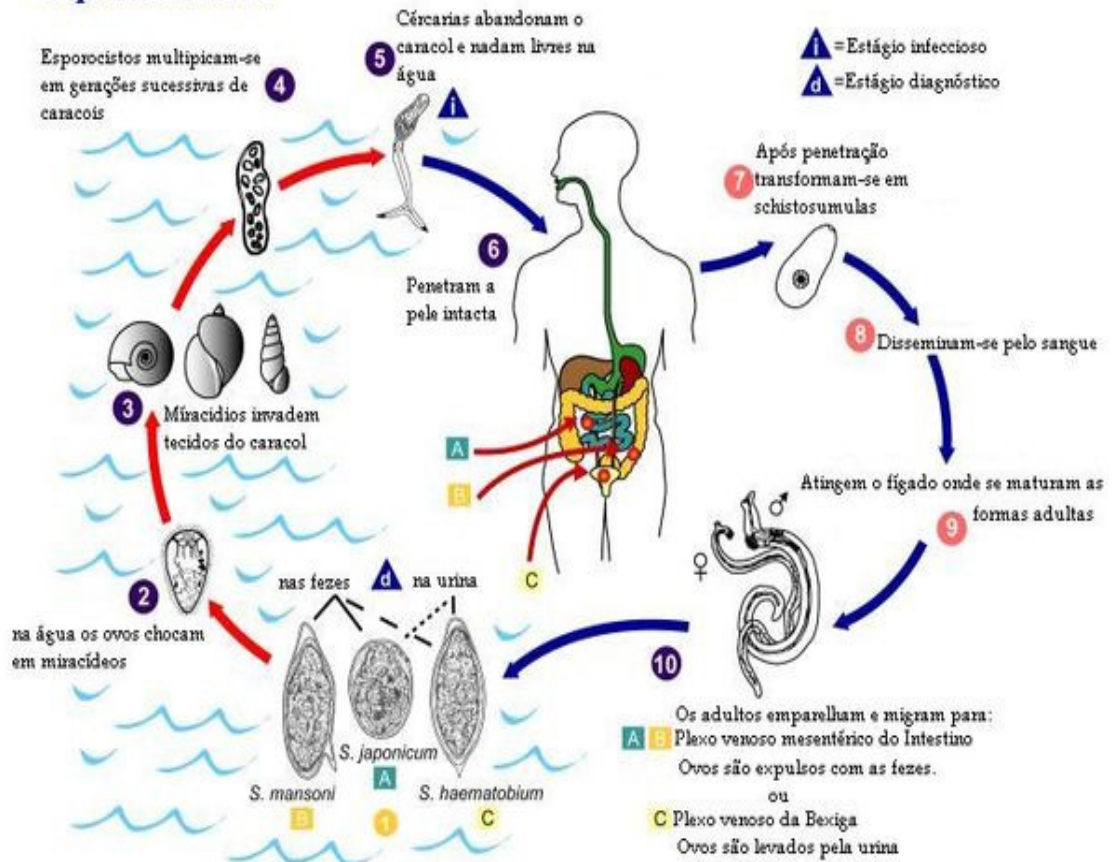


Figura. 3 – Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

Fonte: adaptado de [www. http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Schistosomiasis.htm](http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Schistosomiasis.htm)

Os vermes adultos vivem acasalados no sistema porta-hepático, com a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho, por período médio de dois a cinco anos. Em seu habitat definitivo, preferencialmente nas veias do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas, a fêmea fecundada inicia a postura dos ovos. As fêmeas põem seus ovos um a um, aproximadamente 300 por dia, quatro a cinco semanas após a infecção. Estes ovos imaturos atravessam as paredes dos vasos atingindo à luz intestinal e posteriormente o meio externo juntamente com as fezes.

Quando entram em contato com a água, os ovos eclodem e uma larva ciliada de vida livre, o miracídio, é liberada. A penetração do miracídio no caramujo é ativa, auxiliada por enzimas proteolíticas. Dentro do hospedeiro intermediário, através de um processo assexuado de poliembrionia, o miracídio transforma-se em esporocisto primário em cerca de oito a dez

dias, posteriormente em esporocisto secundário e finalmente em cercária, estágio infectante para o hospedeiro vertebrado.

As cercárias deixam o caramujo quatro a seis semanas após a infecção e circulam pela água por até 72h buscando um hospedeiro definitivo adequado. A eliminação de cercárias é estimulada pela luz e ocorre principalmente durante o dia. Um caramujo infectado por um miracídio pode lançar milhares de cercárias todos os dias. Ao encontrar um hospedeiro, as cercárias penetram pela pele, transformam-se em esquistossômulos, caem na corrente sanguínea e migram pelos pulmões em direção ao fígado. Essas formas evolutivas maturam em quatro a seis semanas na veia porta e como vermes adultos, migram para as veias do plexo hemorroidário superior ou para as veias mesentéricas, onde o ciclo recomeça. Entretanto, muitos ovos não conseguem atingir a luz intestinal ficando retidos em órgãos como o intestino delgado, baço e fígado. Embora o hospedeiro sofra poucos danos diretos dos vermes adultos, os ovos retidos iniciam uma intensa resposta inflamatória do tipo granulomatosa (Bica et al., 2000; Andrade, 2009).

Na maioria dos casos, a infecção humana pelo *S. mansoni* é assintomática. Segundo Rey (2001), a gravidade da doença leva em consideração a linhagem do parasito, a carga infectante, a frequência com que ocorrem as infecções, a idade e a vitalidade das cercárias, as características do hospedeiro e seu meio, a ocorrência ou não de outras infecções anteriores, o grau de imunidade desenvolvida, a carga parasitária acumulada ao longo dos anos e o tempo de duração da infecção.

O controle da esquistossomose é complexo e a eficiência dos serviços de saneamento básico, educação sanitária, bem como outras medidas de enfoque político-administrativo apresenta-se como elementos importantes no controle da doença ou de sua morbidade.

Relação entre esquistossomose mansônica e lipídeos

As relações fisiológicas existentes entre os parasitos e hospedeiros são complexas e representam uma tentativa de manter um estado de equilíbrio entre diversos componentes. Parasitos que habitam o sangue como o *S. mansoni* apresentam várias características peculiares, principalmente na dependência de lipídios (Wuhrer et al., 2000). A dependência do parasito em relação ao seu hospedeiro pode envolver não só o lipídio como também uma variedade de outros nutrientes como carboidratos, ácidos graxos e moléculas específicas como proteínas e hormônios (Mendonça et al., 2000; Salzet et al., 2000). Por isso, determinadas

modificações no metabolismo do hospedeiro podem afetar o parasito e a evolução da infecção (Neves et al., 2001; Neves et al., 2002; Simões et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Corrêa et al. 2011).

É comum associar *S. mansoni* com disfunções hepáticas e dislipoproteinemia (Lima et al., 1998). Lipídios são componentes fundamentais na manutenção da infecção esquistossomótica no hospedeiro vertebrado, pois são importantes na defesa do parasito à resposta imune do hospedeiro (Furlong & Caulfield, 1988). O soro humano induz o parasito a expressar uma proteína de superfície que funciona como receptor de colesterol circulante. Esta associação proteína de superfície e colesterol protege os vermes da citotoxicidade mediada por eosinófilos (Rumjanek & McLaren, 1981; Rumjanek et al., 1983; Tempone et al., 1997). Expressando antígenos do hospedeiro em seu tegumento, os esquistossômulos “assemelham-se” ao tecido do hospedeiro evitando, desse modo, o ataque do sistema imune (Bica et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que uma dieta rica em colesterol pode alterar o curso da infecção esquistossomótica. A administração prolongada de uma dieta hiperlipídica a camundongos infectados por *S. mansoni* culminou em um aumento do número de ovos viáveis eliminados pelo parasito tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção (Neves et al., 2007a; Alencar et al., 2009). Isso está relacionado ao fato do colesterol ser um estímulo positivo sobre o aparelho reprodutor dos vermes adultos de ambos os sexos, aumentando, assim a produção de ovos viáveis.

Alterações de natureza histopatológica também são observadas. Camundongos submetidos à dieta apresentaram granulomas em vários estágios de desenvolvimento, uma grande variação dos tipos celulares característicos do processo inflamatório, degeneração hepática esteatótica e pontos de necrose (Neves et al., 2007a). Estudos quantitativos demonstraram redução significativa no número e volume dos hepatócitos e sinusóides (Neves et al., 2006b).

Estudos avaliando intestino, coração e pulmão afetados pela infecção esquistossomótica demonstraram que a associação esquistossomose mansônica x dislipidemia também resultam em alterações significativas nesses órgãos de camundongos. Intestinos de animais na fase aguda e crônica da infecção esquistossomótica demonstraram alterações significativas nas vilosidades intestinais, além de uma expressiva diferença qualitativa e quantitativa de granulomas encontrados nos diferentes segmentos dessa estrutura (Alencar et al., 2012).

Quando analisado o tecido cardíaco, a administração de uma dieta rica em colesterol resultou na redução de fibras cardíacas, redução da densidade de número de cardiomiócitos e cardiomiócitos com maior área tanto na fase aguda quanto na crônica da infecção esquistossomótica, conforme descrito por Góes (2011). Este mesmo autor descreve alterações de natureza histopatológica também no tecido pulmonar de animais submetidos à mesma dieta.

O baço

O baço é um órgão linfóide de coloração vermelho escuro localizado à esquerda na cavidade abdominal. Situa-se abaixo do diafragma e atrás do estômago. É um órgão alongado e aproximadamente triangular em corte transversal. O aspecto macroscópico e tamanho do baço vai variar dependendo da espécie do hospedeiro e da presença ou não de lesão.

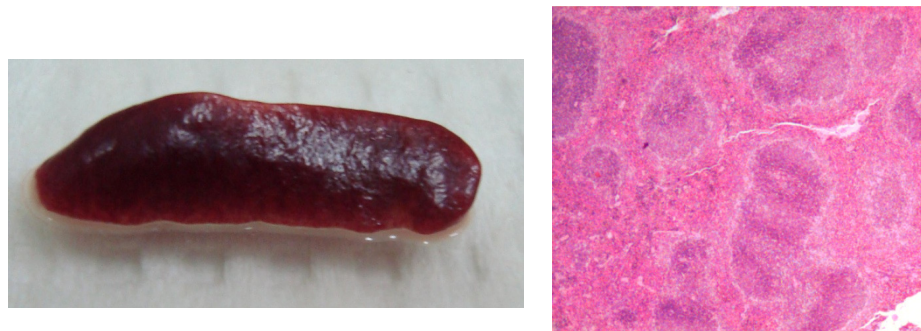


Figura 4 – Aspecto macroscópico (esquerda) e microscópico (direita) do baço de camundongos não infectados alimentados com dieta padrão corados com Hematoxilina & Eosina (4X). Fonte: Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto – UERJ)

As funções do baço estão diretamente relacionadas à circulação sistêmica. Ele é composto de dois compartimentos funcionais e morfológicamente distintos, a polpa vermelha e a polpa branca. A polpa vermelha é um filtro que remove do sangue material estranho ao organismo e eritrócitos danificados. É também um local de armazenamento de ferro, hemácias e plaquetas. Em roedores, é um sítio de hematopoiese, particularmente em animais em estágio fetal e neonatal. A polpa branca, localizada ao redor da arteríola central é composta de três subcompartimentos: a bainha linfóide periarteriolar (PALS), o folículo linfóide e a zona marginal que é rica em macrófagos. As células T são encontradas predominantemente nas PALS e as células B nos folículos

linfóides. O baço é rodeado por uma cápsula composta por tecido fibroso, que o divide em lóbulos, por meio de septos conectivos, que formam uma estrutura de sustentação, e nos quais existem fibras musculares lisas, responsáveis pela contração e pela distensão deste órgão. O baço é o maior órgão linfóide secundário contendo cerca de um quarto de linfócitos do organismo e é responsável por iniciar as respostas imunes a antígenos por via sanguínea (Nolte et al., 2002; Balogh et al., 2004).

O papel do baço na esquistossomose mansônica

Entre as manifestações clínicas da esquistossomose mansônica, a mais grave é a forma hepatoesplênica que se caracteriza pelo aumento considerável do baço e do fígado. A estreita relação entre o fígado e o baço observadas na patogenia da infecção esquistossomótica deve ser consideradas quando se procede a análise da forma esplênica da doença. O crescimento do baço é determinado na esquistossomose mansônica por duas variáveis: primeiro a ação constante da pressão e estase sanguínea sobre a estrutura esponjosa do baço e, adicionalmente, um processo de hiperatividade imunológica. Esplenite reacional surge quando os primeiros ovos maduros aparecem no fígado (Kelner et al., 1982; Freitas et al., 1999; Andrade, 2004; Andrade, 2008; Andrade, 2009).

As alterações no baço podem ter influência na dinâmica dos processos vasculares, uma vez que a esplenomegalia contribui com maior fluxo sanguíneo e maior pressão para o sistema porta (Andrade et al., 1998). Entretanto, estudos anteriores (Magalhães & Coutinho-Abath, 1961) já demonstravam que a esplenomegalia na esquistossomose poderia surgir antes da instalação da hipertensão portal, que não havia relação entre o peso do baço e o grau de hipertensão portal e que havia acentuação da esplenomegalia em animais com infecção repetida.

Em seus estudos, Andrade & Andrade (1965) relataram uma série de alterações morfológicas que não as congestivas do tipo esplenomegalia, detectadas através de estudos histopatológicos associados a técnicas histoquímicas. A utilização destes métodos histoquímicos permitiu a comprovação de que na esplenomegalia da esquistossomose as células reticulares são mais numerosas do que se pode avaliar após o emprego dos métodos histológicos.

Algumas das alterações histopatológicas foram confirmadas em estudos posteriores por Freitas e colaboradores (1999), onde a dilatação dos sinusóides, a alterações na

morfologia da polpa branca e um importante envolvimento de fatores celulares, provavelmente decorrente de uma estimulação via humoral, foram observadas.

Importância do baço no metabolismo do lipídio

A importância do baço no metabolismo lipídico tem sido alvo de vários estudos (Wysocki et al., 1998; Petroianu et al., 2008), embora ainda não haja um consenso sobre o papel deste órgão. Estudos em pacientes com esplenomegalia demonstram uma redução do colesterol plasmático (Gilbert et al., 2004). Outros autores observaram aumento do colesterol plasmático e de triglicérides após esplenectomia total ou parcial (Petroianu et al., 2006). Recentemente, Dinis e colaboradores (2009) comparando animais em diferentes dietas esplenectomizados concluíram que o baço, na ausência de uma patologia, apresenta um importante papel na regulação nos níveis plasmáticos de lipídios.

Embora seja um órgão afetado durante o curso da infecção esquistossomótica nada se sabe sobre possíveis alterações neste órgão em animais dislipidêmicos infectados.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Investigar os efeitos de uma dieta hipercolesterolêmica sobre a organização do tecido esplênico de camundongos na fase aguda da infecção esquistossomótica e comparar com camundongos alimentados com dieta padrão.

1.2 Específicos

- Caracterizar, por análise histológica, as possíveis alterações no tecido esplênico decorrentes da infecção;
- Quantificar as principais células envolvidas na resposta inflamatória (eosinófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, plasmócitos, fibroblastos e neutrófilos);
- Realizar estudo quantitativo da polpa branca do baço por análise histomorfométrica;
- Realizar estudo quantitativo da polpa branca, vermelha e centro germinativo do baço por estereologia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os órgãos utilizados neste experimento foram obtidos de animais submetidos às etapas experimentais de rotina para os experimentos realizados no Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto, conforme abaixo descrito.

2.1 Origem dos animais

Vinte fêmeas *Swiss Webster* provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL- IOC- FIOCRUZ) foram mantidas em caixas de polipropileno (40 x 33 cm) forradas com maravalha e tampadas por grades. As caixas foram acomodadas em salas apropriadas com temperatura e umidade controladas. Os roedores foram expostos a ciclos de luz artificiais e escuros (12/12 horas). Os experimentos seguiram as normas éticas para manuseio e estudos com animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fiocruz com o número: Ceua L-0036/07.

Logo após o desmame (21 dias), os animais foram separados em dois grupos. O grupo experimental, formado por 10 animais, recebeu dieta específica composta por banha de porco, gema de ovo, farinha de trigo, amido de milho (caseína 47% carboidrato, 24% proteína, 29 % lipídios), a fim de induzir o aumento do colesterol (segundo Neves et al., 2006a). O grupo controle, formado também por 10 animais, recebeu uma ração industrializada para camundongos de laboratório Nuvilab CR-1-NUVITAL Nutrients Ltda., Colombo, Paraná, Brasil (60% carboidratos, 28% proteínas, 12% lipídios).

Após completarem seis meses sob administração da dieta, foi realizada a dosagem lipídica sendo utilizados apenas aqueles animais que estavam com níveis de colesterol aumentados, caracterizando a dislipidemia, no grupo da dieta. Após a realização da bioquímica os animais foram infectados com aproximadamente 50 cercárias do *S. mansoni*, cepa BH (Belo Horizonte, Brasil), por via subcutânea (Martinez et al., 2003). As cercárias foram obtidas após a exposição dos caramujos (*B. glabrata*) à luz artificial. Após a infecção os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n=5/cada): dieta hipercolesterolêmica não infectado (HFC), dieta padrão (SC), dieta hipercolesterolêmica infectado (IHFC) e dieta normal infectado (ISC).

Nove semanas após de infecção, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Uma incisão mediana foi feita no abdome dos camundongos para retirada do baço

para análise histopatológica. Após a retirada do órgão, para a análise biométrica, sua massa foi determinada através do método de Scherle, onde a massa do órgão equivale ao volume de líquido (mm^3) deslocado de um recipiente (Scherle, 1970).

2.2 Processamento histológico e técnicas de coloração para microscopia de luz

Os baços dos animais foram clivados e fixados em formol-Millonig modificado por Carson (pH 7,4) (Carson et al., 1973) à temperatura ambiente. O material foi submetido a processamento histológico de rotina: desidratação em série alcoólica gradual, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo com 5 μm e fixados em lâminas pela ação do calor em estufa a aproximadamente 58°C. As etapas estão descritas na Tabela 1.

Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) (Junqueira & Carneiro, 1995), Lennert's Giemsa (Lennert, 1978) e Picrosirius (Junqueira et al. 1978) conforme descrito na tabela 2. Para avaliação histopatológica foi usada microscopia de campo claro.

Tabela 1. Obtenção de um preparado histológico permanente: etapas do processamento histológico da fixação do órgão até a montagem da lâmina.

Etapas	Finalidades	Duração
1. Fixação: Solução Millonig – formol tamponado.	Preservar a morfologia e a composição química dos tecidos.	Mínimo de 48 horas.
2. Desidratação: Série alcoólica crescente, indo do etanol 80°GL até o etanol absoluto.	Remover a água dos tecidos.	Cerca de 15 minutos em cada série alcoólica.
3. Diafanização: Xilol, começando por uma mistura de etanol absoluto/xilol 1:1, seguido de dois banhos em xilol puro.	Embeber o material em xilol, substância miscível com a parafina.	Cerca de 15 minutos para cada série.
4. Impregnação: Parafina líquida, derretida em estufa a 58°C.	Permitir a obtenção de cortes ultrafinos já que a parafina penetra nos espaços intercelulares, impregnando todo o tecido, dando depois de solidificada certa dureza ao tecido.	Cerca de 15 minutos para cada série.
5. Inclusão: O material foi colocado em um molde contendo parafina e deixado fora da estufa para que esta solidificasse.	Obtenção do bloco de parafina, contendo o material incluído.	O tempo necessário para que a parafina solidificasse.
6. Corte: Realizados em mi-	Obtenção de cortes seriados com 5 µm de	Esta etapa não teve

crótomo.	espessura.	duração pré-determinada.
7. Coloração realizada em 3 etapas – eliminação da parafina, hidratação em álcool e coloração.	Dar contraste aos componentes do tecido.	Tempo variável conforme cada corante.
8. Desidratação.	Retirar água do tecido a fim de permitir sua perfeita visualização e a difusão dos corantes.	Tempo variável
9. Diafanização pós coloração.	Tornar os cortes transparentes.	Cerca de 5 minutos para cada série
10. Montagem.	Manter o material próprio para estudo por muitos anos.	Tempo de secagem do bálsamo do Canadá.

Tabela 2. Técnicas de coloração empregadas.

Técnica	Finalidade	Interpretação
1- Hematoxilina e Eosina (HE)	Estudo e caracterização morfológica	Cora o núcleo de roxo e o citoplasma de róseo
2- Lennert's Giemsa	Visualização de células	Cora o núcleo de azul e o citoplasma de violeta
3- Picrossirius	Visualização de fibras colágenas	Cora fibras colágenas de vermelho

2.3 Avaliação histopatológica

Para o exame histopatológico do tecido esplênico foi utilizada a análise visual. As alterações detectadas foram posteriormente estudadas por método quantitativo apropriado como será descrito nos capítulos posteriores. Todas as estruturas típicas do tecido esplênico, como polpa branca, centro germinativo e polpa vermelha, foram minuciosamente avaliadas em diferentes aumentos e comparadas com as mesmas estruturas em seus respectivos grupos controle.

A análise dos cortes histológicos foi realizada em um microscópio Nikon Eclipse E200, capturadas por uma câmera digital e transferidas para um computador contendo um software de análise de imagens (Image Pro Plus - Media Cybernetics, USA).

2.4 Análise estereológica

Para análise estereológica foi utilizado o método de contagem de pontos (D36). O exame do material foi realizado através de microscópio Nikon Eclipse E200, a imagem foi capturada por uma câmera digital e transferida para um computador. Sobrepondo a tela foi inserida um sistema teste composto de 36 pontos (Pt) (Mandarim-de-Lacerda, 2003), conforme figura 5. O baço foi analisado considerando a polpa branca (Vvpb), a polpa vermelha (Vvpv) e o centro germinativo (Vvcg). Foi avaliado, de forma aleatória, um mínimo de dois cortes por animal e cinco campos por lâmina. A densidade de volume (Vv) dos compartimentos do tecido esplênico foi calculado através da equação $Vv = Pp/Pt$ (%), onde Pp corresponde aos pontos que tocam as estruturas.

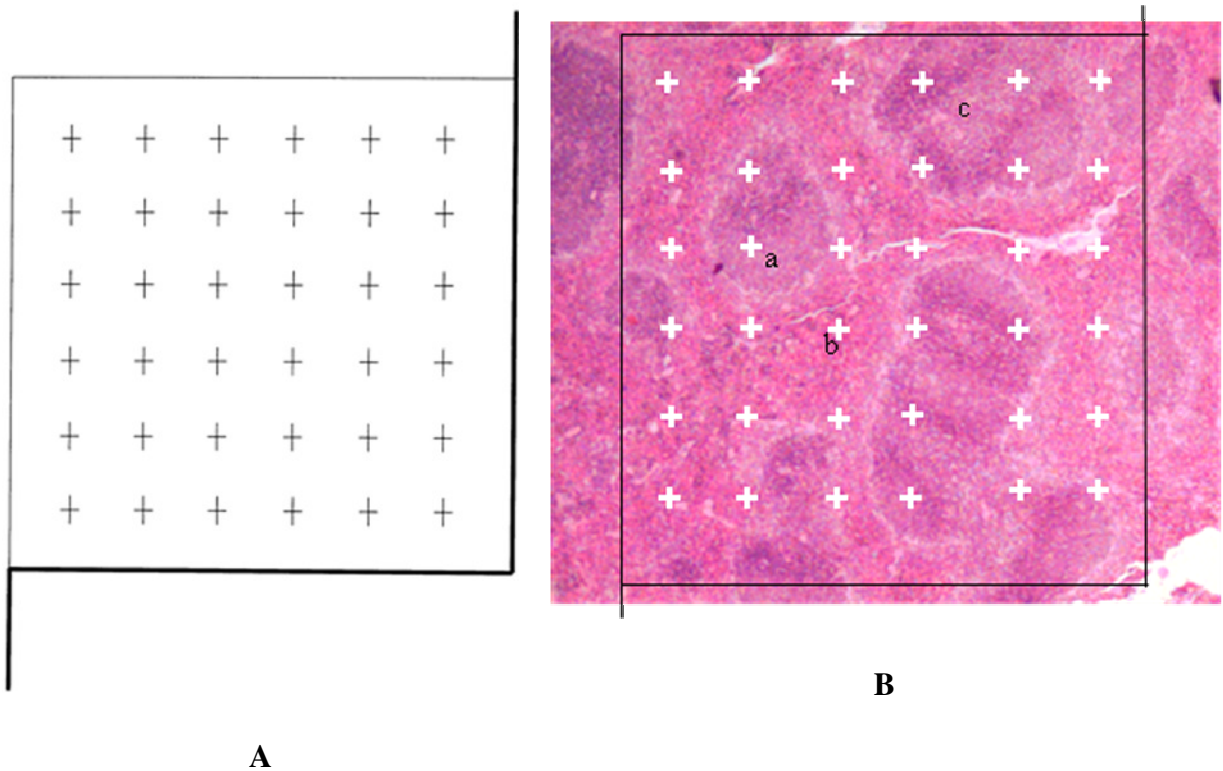


Figura 5 – Esquema de análise estereológica. **A** - Grade contendo 36 pontos. **B** - Fotomicrografia de tecido esplênico mostrando polpa branca (a), polpa vermelha (b) e centro germinativo (c) (Imagem digital de material embebido em parafina e corado com Hematoxilina-Eosina) após a sobreposição do sistema teste.

2.5 Análise morfométrica

A análise morfométrica da polpa branca foi realizada de forma aleatória em 15 campos por lâmina, sendo duas lâminas por animal. As imagens foram captadas por câmara digital acoplada em um microscópio (aumento de 10x) que, por sua vez, estava ligado a um computador contendo o software de análise de imagens (Image Pro Plus - Media Cybernetics, USA). Após o estabelecimento dos campos e captura das imagens, foram determinados o maior e o menor diâmetro de cada polpa branca.

2.6 Quantificação dos tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória

A quantificação das células características da resposta inflamatória foi realizada na polpa vermelha do tecido esplênico. Foram avaliadas duas lâminas por animal, num total de

dez campos por lâmina. A resposta inflamatória era composta de infiltrado celular leucocitário e de raros granulomas presentes somente nos animais que recebam dieta padrão. A quantificação de eosinófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, plasmócitos, fibroblastos e neutrófilos foi realizada de acordo com Lenzi e colaboradores (1998). Os campos foram escolhidos de forma aleatória e as imagens analisadas em objetiva de imersão.

2.7 Quantificação de megacariócitos na polpa vermelha

A quantificação dos tipos celulares megacariócitos foi realizada utilizando o software (Image Pro Plus – Media Cybernetics, USA). A contagem das células foi feita em área pré-determinada de 600 μm x 800 μm (48000 μm^2), em aumento de 10x. Apenas foram consideradas para contagem as células cujos núcleos foram visualizados. Para cada animal foram examinadas duas lâminas, sendo lidos cinco campos por lâmina, num total de 10 campos por animal.

2.8 Análise estatística

Os dados foram estatisticamente analisados usando o software GraphPad InStat (versão 3.01 GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os grupos foram comparados usando o teste T de Student ou Anova com pós teste de Tukey. As medidas com valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativamente diferentes (Vieira 1991).

3 RESULTADOS

3.1 Análise Biométrica

Os animais infectados alimentados com dieta padrão Nuvilab e com dieta hipercolesterolêmica apresentaram alteração no tamanho dos órgãos. Os baços recuperados desses animais apresentaram aumento significativo ($p=0,0042$), equivalente a 150% no grupo controle e 35% no grupo que recebeu dieta hipercoleristêmica. O aumento no tamanho do órgão, caracterizado como hipertrofia, é uma reação característica de animais esquistossomóticos.

Tabela 3 - Volume do baço (g) de camundongos esquistossomóticos alimentados com dieta hipercoleristêmica ou dieta normal.

Variáveis	Grupos				<i>P-valores</i>
	SC	HFC	ISC	IHFC	
Volume do Baço	0.16±0.089	0.26±0.134	0.40±0.125*	0.35±0.109▶	0.0042

(*) Diferença significativa ISC – dieta padrão infectado e SC – dieta padrão, (▶) diferença significativa entre IHFC – Dieta hipercolesterolêmica infectado e SC - dieta padrão.

3.2 Avaliação histopatológica

Durante a análise histopatológica, apenas os animais infectados alimentados com dieta padrão apresentaram granulomas, embora raros. Estes granulomas apresentavam-se no estágio exsudativo-produtivo, sendo caracterizado por intensa reação inflamatória ao redor do ovo com discreta presença de fibroblastos e fibrócitos (Figura 6).

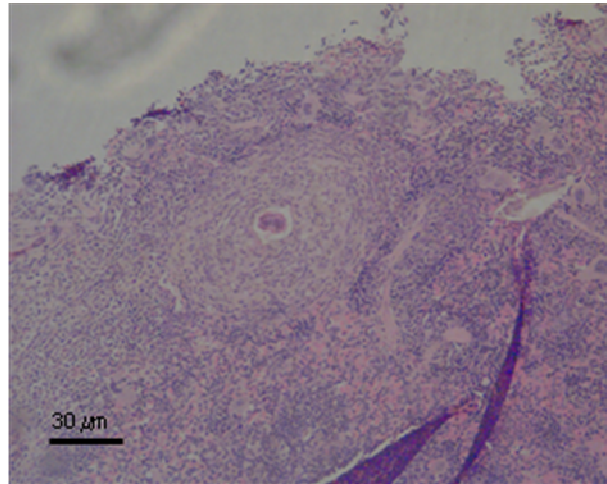


Figura 6 – Fotomicrografia do granuloma esplênico exsudativo-produtivo de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* alimentados com dieta padrão (H&E - 20x).

Houve uma expressiva alteração no arranjo estrutural original do tecido esplênico nos grupos infectados (dieta hipercolesterolêmica e padrão) e não infectado (dieta hipercolesterolêmica). Nos grupos infectados as alterações observadas sugerem uma não individualização da polpa branca e uma aparente redução no tamanho dessa estrutura. Em algumas regiões do tecido parece haver somente vestígios da polpa branca. Nos animais não infectados alimentados com dieta hipercolesterolêmica, a análise sugere que polpa branca e polpa vermelha, em algumas regiões do tecido, confundem-se, não sendo possível fazer distinção entre estas estruturas (Figura 7 – B e Figura 8 - A e B).

Conforme observado (Figura 7 - E e Figura 8 – E), os animais infectados (ISC e IHFC) apresentaram uma intensa e complexa reação inflamatória em consequência da infecção esquistossomótica, não determinada pela presença de granuloma local. Esta reação é caracterizada por infiltrado celular que preenche parte da polpa vermelha destes animais. Ainda na polpa vermelha, foi detectada a presença de maior concentração de hemácia, aparentemente superior ao observado nos animais controle.

A polpa branca dos animais que receberam a dieta rica em colesterol (HFC e IHFC) assim como nos animais infectados que receberam dieta padrão (ISC) apresentou-se alterada. Foi observada uma intensa atividade mitótica dos linfócitos localizados na polpa branca dos animais infectados (Figura 7 B e F; Figura 8 – A, B e F).

Observamos um conjunto de células típicas de reação inflamatória (polimorfonucleares e células de Mott), que normalmente não são encontradas no tecido esplênico, principalmente nos animais infectados (ISC e IHFC). Nos animais não infectados,

como não eram *germ free*, raras células de Mott foram vistas espalhadas no tecido. Polimorfonucleares foram encontrados apenas nos animais infectados, independentemente da dieta (ISC e IHFC), sendo encontradas preferencialmente na polpa branca (Figuras 7 e 8 - F). Megacariócitos foram observados em todos os grupos, entretanto eram mais abundantes nos animais infectados se comparados ao observado no grupo controle. Esse fato sugere um retorno deste órgão à função hematopoiética (Figuras 7 e 8 - C e D). A hemossiderina, pigmento típico do tecido esplênico foi menos abundante nos animais infectados se comparados aos animais controles.

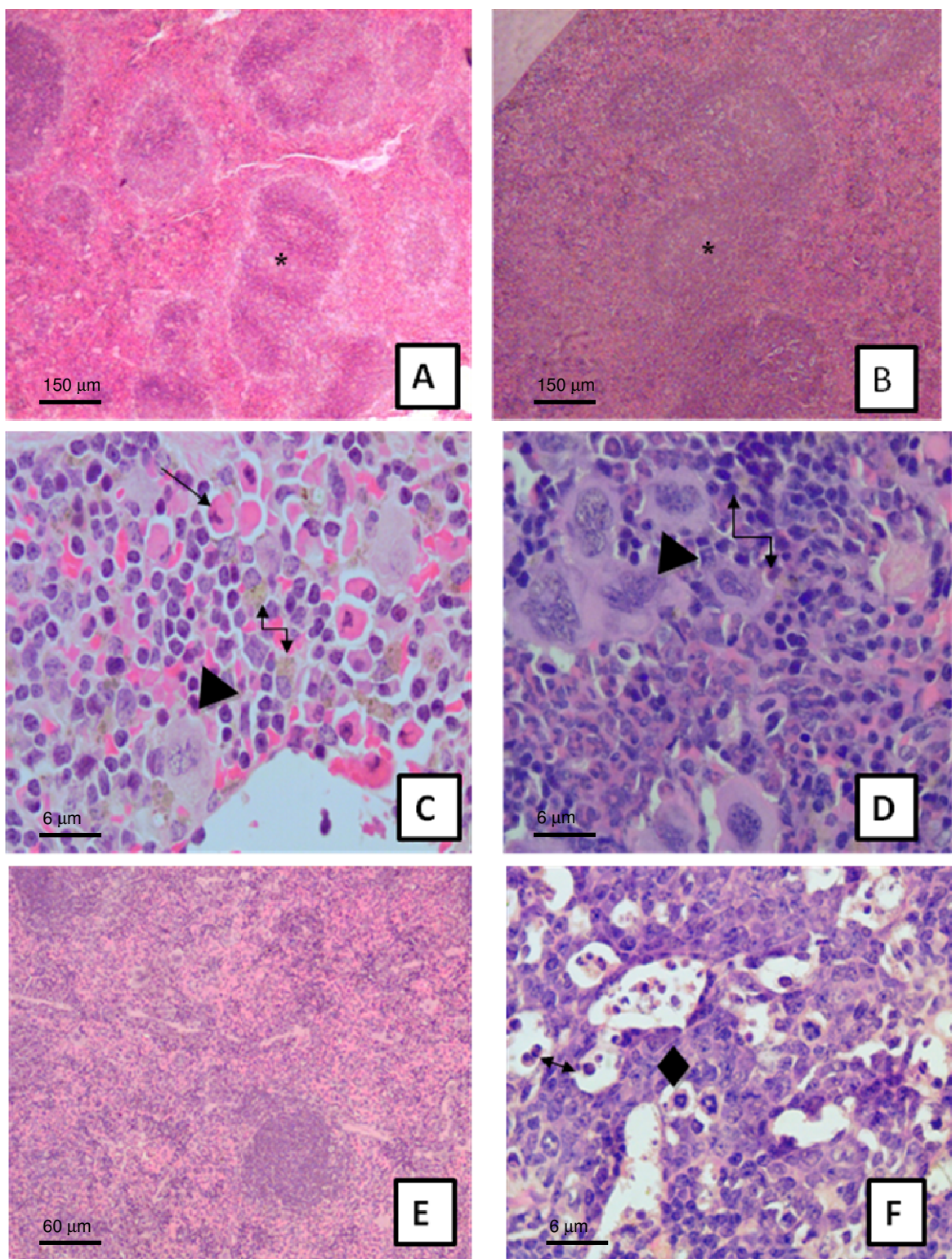


Figura 7 – Fotomicrografias do tecido esplênico (H&E) de camundongos *SW* alimentados com dieta padrão, não infectados (SC) ou infectado com *Schistosoma mansoni* (ISC). Grupo SC – **A**: Visão geral de tecido esplênico e em **C**: Célula de Mott (→), Megacariócitos (▶) e Hemossiderina (↔). Grupo ISC – **B**: Visão geral do tecido esplênico, **D**: Megacariócitos (▶) e Hemossiderina (↔), **E**: Infiltrado Celular difuso no parênquima esplênico e em **F**: Polimorfonuclear (↔) e Mitose (◆).

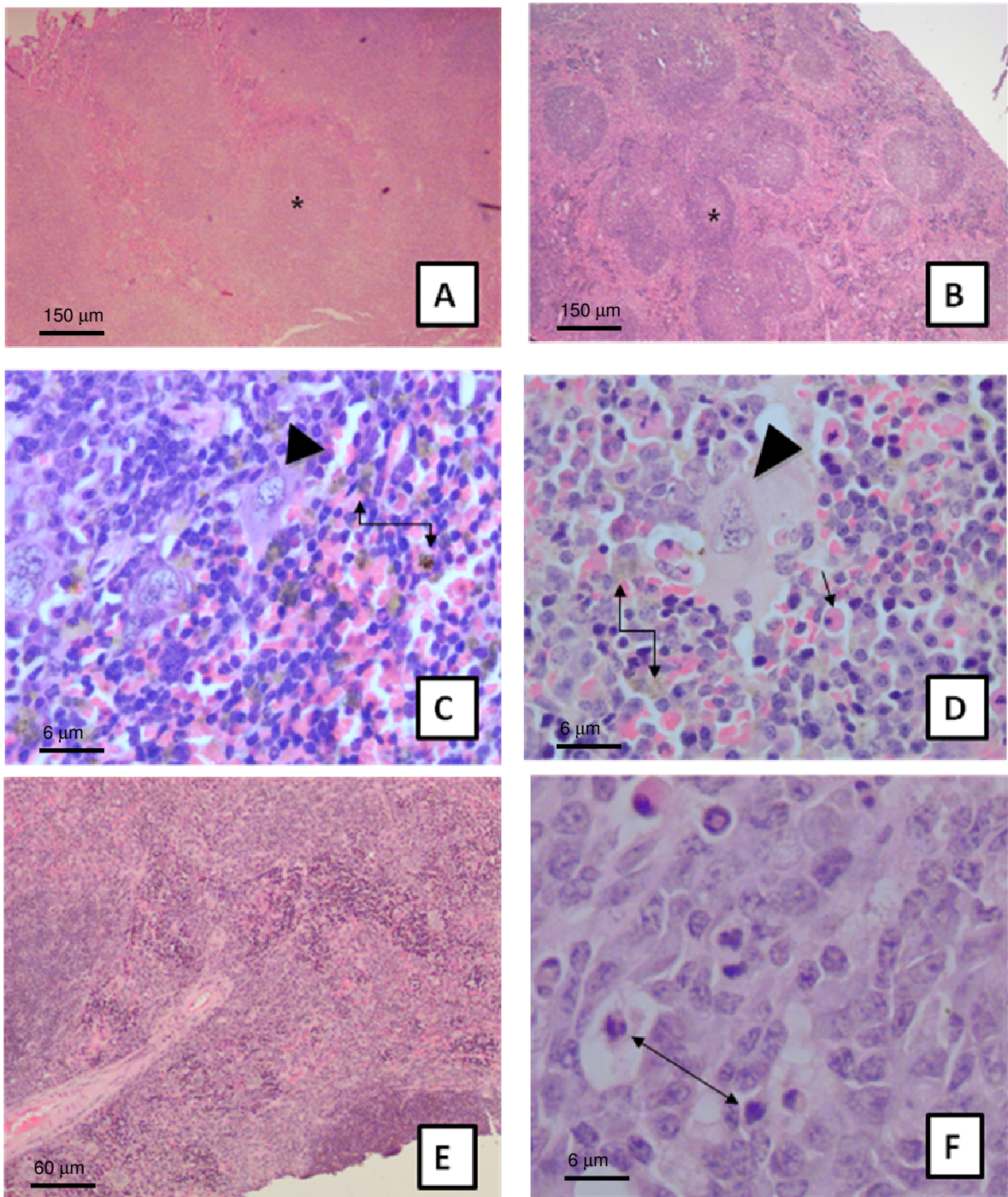


Figura 8 – Fotomicrografias do tecido esplênico (H&E) de camundongos *SW* alimentados com dieta hipercoeristêmica, não infectados (HFC) ou infectados com *Schistosoma mansoni*

(IHFC). Grupo HFC – **A**: Visão geral e em **C**: Megacariócitos (►) e Hemossiderina (↕). Grupo IHFC – **B**: Visão geral, **D**: Célula de Mott (→), Megacariócitos (►) e Hemossiderina (↕), **E**: infiltrado Celular difuso no parênquima esplênico e em **F**: Polimorfonuclear (↔).

3.3 Análise estereológica

A análise estereológica demonstrou que houve desorganização da estrutura esplênica quando considerados os diferentes compartimentos analisados (Figura 9).

Nos animais infectados a polpa branca apresentou redução significativa ($p < 0,01$) quando comparados aos seus respectivos controles (SC=53%, ISC=33%, HFC=63%, IHFC=45%). A polpa vermelha destes animais apresentou variação inversa à observada na polpa branca, ou seja, nos animais infectados houve aumento significativo ($p < 0,01$) desta estrutura quando comparado aos respectivos controles (SC=42%, ISC=60%, HFC=36%, IHFC= 52%).

No centro germinativo foi observada diferença significativa ($p < 0,01$) entre os animais infectados alimentados com dieta padrão (7%) e os animais alimentados com dieta hiperlipídica (3%).

Entretanto, a maior alteração foi observada entre o grupo ISC quando comparado ao grupo HFC, onde os valores variaram entre 33% e 63% para a polpa branca, 60% e 36% para a polpa vermelha e 7% e 2% para o centro germinativo, respectivamente.

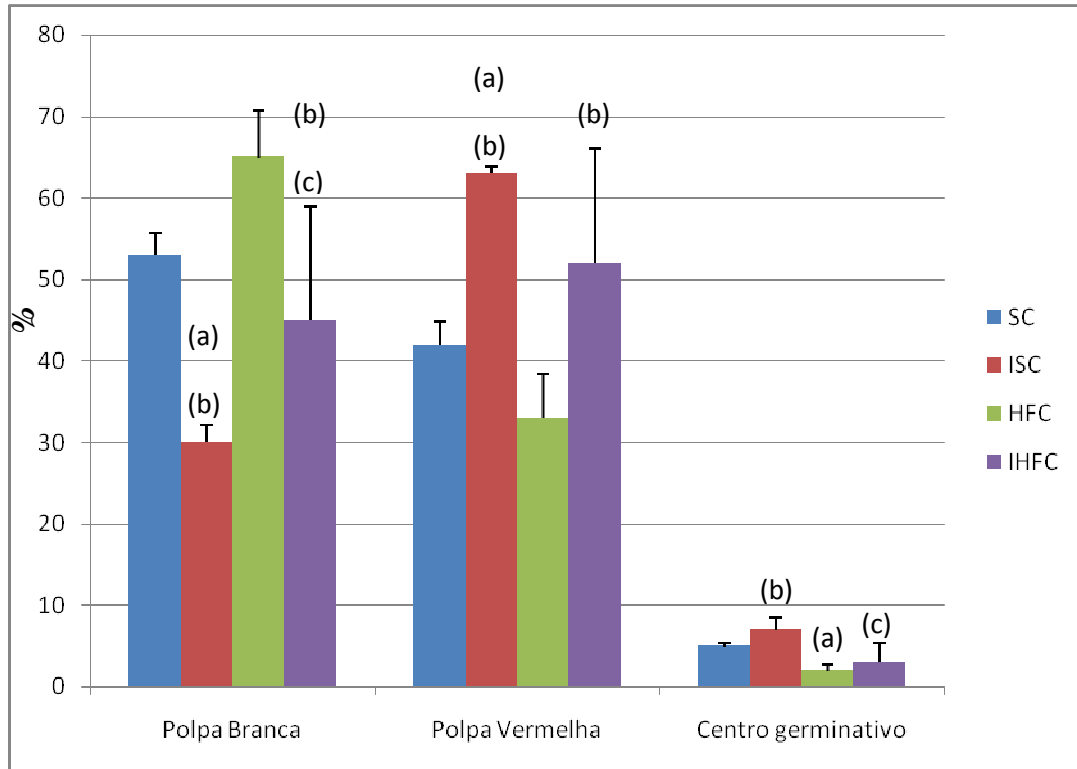


Figura 9 – Densidade de volume dos compartimentos do tecido esplênico, sendo $p \leq 0,05$, se (a) quando comparado com o grupo SC, (b) com o grupo HFC, (c) com o grupo ISC. Legenda: SC- Dieta padrão, ISC – Dieta padrão infectado, HFC – Dieta hipercoleristêmica, IHFC – Dieta hipercoleristêmica infectado.

3.4 Análise morfométrica

A morfometria realizada na polpa branca não demonstrou alteração significativa quando considerado o menor diâmetro desta estrutura. Entretanto, quando considerado o maior diâmetro, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos infectados, como demonstra a tabela 4.

Tabela 4- Avaliação morfométrica do menor e maior diâmetro (μm) da polpa branca do tecido esplênico de camundongos SW alimentados com dieta padrão e com dieta hipercooleristêmica, infectados ou não com *Schistosoma mansoni*.

Variável	Grupos				P-valores
	SC	ISC	HFC	IHFC	
Menor diâmetro	1107,5±279	924±316	1113,3±434	1360,3±1612	0,1568
Maior diâmetro	1389,5±425	1157,5±399*	1378,7±515	1435,1±434	0,0137

SC- Dieta padrão, ISC – Dieta padrão infectado, HFC – Dieta hipercolesterolêmica, IHFC – Dieta hipercolesterolêmica infectado. *Diferença significativa entre ISC e IHFC.

3.5 Quantificação dos tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória

A análise demonstrou uma pequena variação dos tipos celulares que compõem o infiltrado leucocitário presente na polpa vermelha dos animais infectados alimentados com diferentes dietas.

As células epitelióides, células gigantes e mastócios estavam ausentes em ambos os grupos. Os eosinófilos apresentaram-se ausentes nos animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica, porém nos animais alimentados com dieta padrão poucas células foram encontradas. Fibroblastos apresentaram-se em pouca quantidade (+), enquanto plasmócitos e macrófagos foram encontrados mais (+++) distribuídos no tecido esplênico em ambos os grupos.

Neutrófilos e linfócitos apresentaram sua distribuição reduzida nos animais alimentados com dieta hipercooleristêmica (+, ++) quando comparados com os animais alimentados com dieta padrão (++, +++), respectivamente.

3.6 Quantificação de células megacariócitos na polpa vermelha

A contagem demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,01$) de 43,27% no número de células observadas nos animais ISC quando comparado aos animais IHFC.

Tabela 5- Quantificação de células megacariócitos presentes na polpa vermelha do tecido esplênico (número de células por área - $48000 \mu\text{m}^2$).

Variável	Grupos				<i>P-valores</i>
	SC	ISC	HFC	IHFC	
Nº de células por área	8,6±3,0	10,4±2,8*	6,3±1,7	5,9±1,8	0,0087

SC- Dieta padrão, ISC – Dieta padrão infectado, HFC – Dieta hipercoleristêmica, IHFC – Dieta hipercoleristêmica infectado. *Diferença significativa entre ISC e IHFC.

4 DISCUSSÃO

Há um acentuado interesse sobre as relações entre tipos de dietas e a progressão de doenças, tais como alterações nos órgãos e sobrevida de camundongos (Mark et al., 1984). Distúrbios metabólicos, atualmente, é objeto de estudo de vários autores, pois, quando presentes, constituem influência determinante no curso da infecção esquistossomótica (Hulstijn et al., 2001; Coutinho, 2004; Neves et al., 2007a; Corrêa et al., 2011).

As alterações desencadeadas por uma dieta hipercolesterolêmica em modelos murinos experimentais demonstraram que a dislipidemia assume caráter relevante no curso da infecção esquistossomótica. Camundongos submetidos à dieta hipercolesterolêmica apresentaram um maior número e variedade de granulomas tanto no fígado quanto no intestino (Neves et al., 2007a; Alencar, 2008), uma grande variação dos tipos celulares característicos do processo inflamatório, degeneração hepática esteatótica e pontos de necrose (Neves et al., 2007a). Estudos quantitativos demonstraram redução significativa no número e no volume dos hepatócitos e sinusóides (Neves et al., 2006b). A dependência do parasito pelo lipídio circulante, as alterações morfológicas e a maior produção e eliminação de ovos tanto na fase aguda, quanto na fase crônica, descritas por Neves e colaboradores (2007a,b) e Alencar e colaboradores (2009) justificam a importância do estudo desta associação.

Os danos observados no fígado, descritos no trabalho de Neves e colaboradores (2007a), podem ter repercussão na estrutura e função do tecido esplênico, fato observado em estudo anterior que sugere que a recíproca também pode ocorrer (Andrade et al. 1998).

O crescente aumento da distribuição da dislipidemia no mundo (Caterston et al., 2004) pode estar associado a uma superposição destas regiões com as áreas de prevalência de esquistossomose mansônica. Este dado vem de encontro à necessidade cada vez maior de estudos da associação destas duas morbidades, seja na população humana ou em modelos experimentais.

As pesquisas deste tipo de dieta associada à esquistossomose mansônica já elucidaram algumas das questões acerca do comportamento da infecção esquistossomótica sobre o fígado (Neves et al., 2006b), o intestino (Alencar et al., 2012), o coração e o pulmão (Góes, 2011), alguns dos órgãos que mais sofrem injúrias durante a infecção. Os aspectos da infecção esquistossomótica sobre o baço foram descritos por alguns autores (Andrade & Andrade, 1965; Andrade et al., 1998; Freitas et al., 1999; Maia et al., 2007) entretanto, estudos que contemplem as alterações esplênicas decorrentes da associação dessas duas morbidades em modelos murinos ainda não foram explorados.

Estudos do nosso grupo demonstraram que a administração de uma dieta hipercolesterolêmica se mostrou eficaz na indução da dislipidemia em camundongos, visto que os animais apresentaram diferenças na massa corporal e no colesterol total (Neves et al., 2006a; Neves et al., 2007a,b; Alencar et al., 2009, Góes, 2011). O presente estudo demonstrou que há também um aumento no volume do baço em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, entretanto, sem a infecção esquistossomótica. Este resultado está de acordo com os apresentados por Erickson e colaboradores, 1980.

Aspectos histopatológicos observados no tecido esplênico apontam uma série de alterações ocorridas não só pela presença da infecção, mas também pela administração da dieta hipercolesterolêmica nos diferentes compartimentos do tecido esplênico.

A polpa branca dos animais infectados alimentados com dieta normal apresentou atrofia, corroborando os trabalhos de Andrade & Andrade (1965) e Freitas e colaboradores (1999). Este dado sugere que a dieta hiperlipídica não teve influência nos resultados observados nos animais infectados alimentados com dieta hipercolesterolêmica (IHFC). Estes resultados são confirmados pela análise estereológica que indicou redução significativa da polpa branca nos animais infectados em relação aos seus respectivos controles, tanto nos animais alimentados com dieta padrão quanto naqueles que receberam dieta hipercolesterolêmica (-20% e -18%, respectivamente). Entretanto, a análise histopatológica sugeriu que a administração da dieta hipercolesterolêmica, isoladamente, parece ter sido responsável por exacerbada hipertrofia da polpa branca, uma vez que esta estrutura apresentou-se nestes animais com seu contorno quase imperceptível.

A presença de polimorfonucleares na polpa branca de animais infectados (ISC e IHFC), provavelmente, resultou de um esforço do organismo em responder à infecção esquistossomótica. A permeabilidade dos vasos sanguíneos associada à necessidade de eliminar os antígenos que já se encontram alojados no fígado destes animais (Neves et al., 2007a), determina a chegada, destes tipos celulares neste tecido. Outro indício foi a presença de células Mott na polpa vermelha destes animais, uma vez que estas células são formadas por acúmulo excessivo de imunoglobulinas no citoplasma de linfócitos B ativados durante a infecção. Estudos experimentais já demonstraram que a estimulação antigênica na esquistossomose provoca diferenciação plasmocitária e secreção de gamaglobulina (Andrade, 1962).

A polpa vermelha apresentou alterações, algumas já descritas por outros autores (Andrade & Andrade, 1965; Altunkaynak, et al, 2007; Freitas et al., 1999). A presença de ovos na polpa vermelha do tecido esplênico já havia sido descrito em infecções naturais e

experimentais, tanto na fase aguda (Silva-Souza & Vasconcelos, 2005) quanto na fase crônica da infecção esquistossomótica (Arruda et al., 1993). Nos animais infectados foi observada uma concentração aparentemente superior de hemácias, sugerindo a presença de focos hemorrágicos como descrito por Andrade & Andrade (1965) e Freitas e colaboradores (1999).

Embora o acúmulo de hemossiderina no tecido esplênico de camundongos seja um achado descrito como normal na literatura (Cesta, 2006; Suttie, 2006) em lesões não proliferativas, o depósito local de hemossiderina pode estar associado a áreas de hemorragia secundária por tumores malignos e a regiões de fibrose (Suttie, 2006). Outros autores (Altunkaynak et al., 2007) observaram o depósito de hemossiderina também no tecido esplênico de ratos infectados com esquistossomose mansônica alimentados com dieta hiperlipídica. No presente trabalho foi observado o acúmulo deste pigmento no tecido esplênico de animais não infectados (SC e HFC), fato que está relacionado a atividade de macrófagos no processo de reciclagem de hemácias danificadas (Cesta, 2006). Neste estudo, os depósitos de hemossiderina em macrófagos presentes na polpa vermelha assemelham-se aos achados de Suttie, 2006. Estes resultados estão de acordo com estudos em ratos onde os animais também receberam a dieta rica em gordura (Altunkaynak et al., 2007).

Alguns autores (Cesta, 2006; Suttie, 2006) descrevem o baço como um sítio de hematopoiese extramedular, especialmente em animais jovens (período fetal e neonatal) e em fêmeas de roedores. O aumento da hematopoiese extramedular pode resultar de insulto hematotóxico, anemia sistêmica e infecções em outra parte do corpo e consiste, basicamente, da presença de células precursoras eritróides, mielóides e megacariócitos ou a associação dos três. A hematopoiese extramedular pode ser visto como uma hiperplasia (não neoplásica) difusa da polpa vermelha. O relato de alguns autores (Cesta, 2006; Suttie, 2006) fundamenta os resultados encontrados no presente trabalho, onde a análise histopatológica demonstrou um aumento de células megacariócitos nos grupos infectados (ISC e IHFC) quando comparados aos seus respectivos controles (SC e HFC), demonstrando assim o papel da infecção esquistossomótica neste sistema. Entretanto, a análise quantitativa do material revelou diferença significativa entre os grupos infectados (ISC e IHFC), mostrando que a dieta hiperlipídica atuou como um fator negativo reduzindo a hematopoiese nos animais deste grupo.

A presença de um intenso infiltrado celular que preenchia parte da polpa vermelha dos animais infectados (ISC e IHFC) demonstrou uma riqueza de células do sistema imune. Macrófagos, linfócitos, eosinófilos, polimorfonucleares e plasmócitos são células tipicamente presentes no tecido esplênico de animais infectados com *S. mansoni* (Andrade & Andrade,

1965). Em experimentos com camundongos esplenectomizados com diferentes tempos de infecção, Andrade e colaboradores (1998) observaram a presença de linfócitos, eosinófilos e plasmócitos, concluindo que não houve diferença qualitativa entre os grupos. No presente estudo, a análise qualitativa e quantitativa também não apresentou expressiva diferença entre os tipos celulares analisados. Somente foi observada uma discreta redução dos eosinófilos, neutrófilos e linfócitos presentes nos animais dislipidêmicos, entretanto este achado não constitui um padrão de mudança suficientemente consistente que pudesse ser relacionadas à administração da dieta.

Atualmente vários autores vêm utilizando a estereologia no estudo do tecido esplênico (Milićević et al., 1996 a,b; Milićević & Milićević, 1997, Altunkaynak et al., 2007) não só por ser uma ferramenta eficaz na análise de estruturas morfológicas bidimensionais, usando parâmetros quantitativos tridimensionais, mas também por proporcionar a possibilidade de comparação de imagens atuais à imagens de arquivo, facilitando o diagnóstico (Mandarim-de-Lacerda, 1999). O uso desta ferramenta em nossos estudos foi fundamental para a confirmação ou não de algumas alterações detectadas pela análise histopatológica como também possibilitou a comparação dos nossos resultados aos descritos na literatura. A redução da polpa branca (SC -20% e HFC - 21%) e o aumento da polpa vermelha (SC + 18% e HFC + 16%) observado nos grupos infectados em relação aos seus respectivos controles, está de acordo com alterações observadas em pacientes cujo baço sofreu injúrias ou traumas, seja em modelos murinos experimentais (Milićević et al., 1996a) ou em humanos (Milićević et al, 1996b). Com os nossos resultados fica demonstrado que agressões de diferentes naturezas (dieta ou/e infecção esquistossomótica) podem causar graus diferenciados de desestruturação no tecido esplênico. Entretanto, a dieta hipercolesterolêmica se mostrou como fator importante na determinação do aumento na polpa branca, nos animais infectados (+15%) e da redução do centro germinativos dos animais infectados (-4%) e não infectados (-3%) quando comparados aos que receberam dieta padrão. Os estudos morfométricos realizados na polpa branca dos animais infectados confirmaram a diferença observada na análise estereológica dos animais alimentados com dieta padrão. Com isso, reafirmando a importância do papel da dieta hipercoeristêmica na desestruturação destes compartimentos do tecido esplênico e por conseqüência na imunidade, uma vez que a polpa branca constitui o sítio de maturação dos linfócitos e o centro germinativo o local onde existem linfoblastos e pro-linfócitos B em diferenciação.

5 CONCLUSÕES

- A dieta hipercolesterolêmica provoca alterações nos compartimentos (polpa branca e centro germinativo) do tecido esplênico;
- A dieta hipercolesterolêmica pode ter reduzido a maturação e diferenciação de linfócitos nos animais infectados;
- A dieta hipercolesterolêmica atuou como um fator negativo, reduzindo a hematopoiese nos animais infectados.
- A infecção esquistossomótica promove danos ao tecido esplênico, em alguns casos, acentuados na associação com a dieta hiperlipídica;

REFERÊNCIAS

- Alencar ACMB. Características parasitológicas e estruturais do intestino de camundongos esquistossomóticos, submetidos a uma dieta hiperlipídica [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Pós-graduação em Ciências Médicas. Faculdade de Ciências Médicas; 2008.
- Alencar ACMB, Neves RH, Águila MB, Mandarim-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; 608: 13-16.
- Alencar ACMB, Neves RH, de Oliveira AV, Machado-Silva JR. Changes in the small intestine of schistosoma mansoni-infected mice fed a high-fat diet. *Parasitology*, 2012; 138:1-10.
- Altunkaynak BZ, Ozbek E, Altunkaynak M E. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. *Saudi Med J*, 2007; 28:353-357.
- Andrade ZA. Aspectos experimentais da esplenomegalia da esquistossomose. *Rev Inst Med Trop*, 1962; 4:249-255.
- Andrade ZA, Andrade SG. Patologia do baço na esquistossomose hepatoesplênica. *Rev Inst Med Trop*, 1965; 7:218-227.
- Andrade ZA, Silva LM, Souza, MM, Sadgursky M, Barbosa A, Oliveira IR. Role of the spleen on the pathogenesis of schistosomal periportal (pipestem) fibrosis of the liver: an experimental approach. *Am J Trop Med Hyg*, 1998; 59:557-562.
- Andrade ZA. Schistosomal hepatopathy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004; 99:51-57.
- _____. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Acta Trop*, 2008; 108:79-82.
- _____. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol*, 2009; 31: 656-663.
- Arruda SM, Santoro F, Sadigursky M. Evaluation of spleen cell population and effect of splenectomy on granuloma modulation in BALB/c mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1993; 88:97-102.
- Balogh P, Horváth G, Szakal AK. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem Cytochem*, 2004 ;52:1287-1298.
- Bica I, Hamer DH, Stadecker MJ. Hepatic schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*, 2000; 14: 583-604.
- Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy. A re-evaluation. *Am J Clin Pathol*, 1973; 59: 365-373.

Caterson ID, Hubbard V, Bray GA, Grunstein R, Hansen BC, Hong Y, Labarthe D, Seidell JC, Smith Jr SC. Prevention Conference VII: Obesity, a Worldwide Epidemic Related to Heart Disease and Stroke: Group III: Worldwide Comorbidities of Obesity. *Circulation*, 2004; 110: e476-483.

Cesta M F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 2006; 34: 455-465.

Corrêa CL, Lisboa PC, de Oliveira E, de Moura EG, de Oliveira RM, Gomes A C, Machado-Silva JR. The outcome of acute schistosomiasis infection in adult mice with postnatal exposure to maternal malnutrition. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011; 106: 584-593.

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

Coura EM, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian Endemic Áreas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004; 99: 13-19.

Dinis APG, Marques RG, Simões FC, Diestel CF, Caetano CER, Secchin DJF, Neto JF, Portela MC. Plasma lipid levels of rats fed a diet containing pork fat as a source for lipids after splenic surgery. *Lipids*, 2009; 44: 537-543.

Erickson KL, McNeill CJ, Gershwin ME, Ossmann JB. Influence of dietary fat concentration and saturation on immune ontogeny in mice. *J Nutr*. 1980 11:1555-1572.

Freitas CRL, Barbosa Jr AA, Fernandes ALM, Andrade ZA. Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999; 94: 815-822.

Furlong ST, Caulfield JP. *Schistosoma mansoni*: sterol and phospholipid composition of cercariae, schistosomula, and adults. *Exp Parasitol*, 1988; 65: 222-231.

Góes VC. Envolvimento cardíaco e pulmonar na esquistossomose aguda e crônica de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental. Faculdade de Ciências médicas; 2011.

Gilbert HS, Ginsberg H, Fagerstrom R, Brown WV. Characterization of hypocholesterolemia in myeloproliferative disease: Relation to disease manifestations and activity. *Am J Med*, 2004; 71: 595-602.

Hulstijn M, Oliveira RMF de, Moura EG de, 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: 393-396.

Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*, 1978; 41: 267-274.

Junqueira LC, Carneiro J. Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 260p, 1995.

Kelner KL, Kirchick HJ, Peck EJ Jr. Differential sensitivity of estrogen target tissues: the role of the receptor. *Endocrinology*, 1982; 111: 1986-1995.

Lennert K. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Berlin: *Springer-Verlag*, 833p, 1978.

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

Lima VL, Sena VL, Stewart B, Owen JS, Dolphin PJ. An avaluation of the marmoset *Callithrix jacchus* (sagui) as an experimental model for the dyslipoproteinemia of human schistosomiasis mansoni. *Biochim Biophys Acta*, 1998; 1393:235-43.

Magalhaes FA, Coutinho-Abath E. Splenic reactions in Swiss albino mice to single and multiple infections with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*, 1961; 10:356-364.

Maia MD, Lopes EPA, Ferraz AAB, Barros FMR, Domingues ALC, Ferraz EM. Evaluation of splenomegaly in the hepatosplenic form of mansonic schistosomiasis. *Acta Trop*, 2007; 101:183-186.

Mandarim-de-Lacerda CA. What is the interest of normal and pathological, morphological research to be quatitative? The example of the stereology. *Braz J Morphol Sci*, 1999; 16:130-139.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*, 2003; 75: 469-486.

Martinez EM, Neves RH, de Oliveira RM, Machado-Silva JR, Rey L. Parasitological and morphological characteristics of Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* in *Mus musculus*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2003; 36: 557-564.

Mark DA, Alonso DR, Quimby F, Thaler HT, Kim YT, Fernandes G, Good RA, Weksler ME. Effects of nutrition on disease and life span. I. Immune responses, cardiovascular pathology, and life span in MRL mice. *Am J Pathol*, 1984;117:110-124.

Mendonça RL, Escrivá H, Bouton D, Laudet V, Pierce RJ. Hormones and nuclear receptors in schistosome development. *Parasitol Today*, 2000; 16: 233-240.

Milićević NM, Cuschieri A, Xuereb A, Milićević Z. Stereological study of spleen tissue compartments from traumatically injured and cancer patients. *Gen Diagn Pathol*, 1996a; 142: 41-44.

Milićević Z, Cuschieri A, Xuereb A, Milićević NM. Stereological study of tissue compartments of the human spleen. *Histol Histopathol*, 1996b; 11: 833-836.

Milićević NM, Milićević Z. Stereological study of splenic tissue compartments in FK506-treated rats. *Histol Histopathol*, 1997; 12: 995-1001.

Neves RH, Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Oliveira SA, Coutinho EM, Lenzi HL, Gomes DC. 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: 1013-1016.

Neves RH, Oliveira AS, 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: 405-407.

Neves RH, Alencar ACMB, Águila MB, Mandarim-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*, 2006a; 24:625-632.

Neves RH, Alencar AC, Aguilá MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006b; 101: 253-260.

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

Neves RH, Alencar ACM de B, Águila, M, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC. Light and confocal microscopic observation in adult *Schistosoma mansoni* collected from mice fed a high-fat diet. *J Helminthol*, 2007b; 81: 361-368.

Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology*, 2002; 106: 299-307.

Oliveira AS, 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; 98: 623-627.

Pessôa SB, Martins AV. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872p.

Petroianu A, Veloso DFM, Costa GR, Albert LR. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. *Rev Assoc Med Brasil*, 2006; 52: 56-59.

Petroianu A, Veloso DFM, Alberti LR, Vasconcelos L de S. Plasma lipid alterations after total splenectomy, subtotal splenectomy and splenic auto-implants in rats. *Gastroenterology*, 2008; 23: e221-e224.

Rey L. Parasitologia – Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem na Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 828p.

Rumjanek FD, McLaren DJ. *Schistosoma mansoni*: modulation of schistosomular lipid composition by serum. *Mol Biochem Parasitol*, 1981; 3: 239-252.

- Rumjanek FD, McLaren DJ, Smithers SR. Serum-induced expression of a surface protein in schistosomula of *Schistosoma mansoni*: a possible receptor for lipid uptake. *Mol Biochem Parasitol*, 1983; 9: 337-350.
- Salzet M, Capron A, Stefano GB. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitol Today*, 2000; 16: 536-540.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*, 1970; 26: 57-63.
- Silva-Souza N, Vasconcelos SD. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) Infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). *Rev Pat Trop*, 2005; 34:145-150.
- Simões C, Neves RH, Barros L de A, Brito PD, Cravo CO, de Moura EG, Machado-Silva JR. Parasitological characteristics of *Schistosoma mansoni* infection in Swiss mice with underlying malnutrition. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97: 143-147.
- Suttie AW. Histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 2006; 34:466-503.
- Tempone AJ, Bianconi ML, Rumjanek FD. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Cell Biochem*, 1997; 177: 139-144.
- Vieira S. Introdução à Bioestatística. Rio de Janeiro. *Ed Campus*, 203 pp, 1991.
- Vennervald BJ, Dunne D. Morbidity in schistosomiasis: an update. *Curr Opin Infect Dis*, 2004; 17:439-47.
- Wuhrer, M.; Dennis, R.D.; Doenhoff, M.J.; et al. Stage-associated expression of ceramide structures in glycosphingolipids from the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1524: 155-161.
- Wysocki A, Drozd W, Dolecki M. Splenomegaly and plasma lipids. *Przeegl Lek*, 1998; 55: 365-7.

APÊNDICE – A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice.

Título: A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice.

Esse artigo foi submetido ao *Experimental Parasitology*

From: **EP (ELS)** <ep@elsevier.com>

Date: 2012/3/15

Subject: Experimental Parasitology Submission: Manuscript Number Assigned

To: machado@uerj.br

Ms. No.: EP-12-97

Title: A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice.

Corresponding Author: Dr. José Roberto Machado-Silva

Authors: Adriana M Silva, Msc; Christiane L Corrêa, PhD; Renata H Neves, PhD;

Dear Dr. Machado-Silva,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: EP-12-97

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/ep/>

Your username is: machado@uerj.br

If you cannot remember your password, please click the "Send Username/Password" link on the login page.

Thank you for submitting your work to Experimental Parasitology.

Kind regards,

D. Jones

Experimental Parasitology

A high-fat diet associated with acute schistosomiasis mansoni causes disorganization in splenic architecture in mice.

Adriana Matias da Silva^a, Christiane Leal Corrêa^b, Renata Heisler Neves^{a,c}, José Roberto Machado-Silva^{a,*,1}

^aLaboratory of Helminthology Romero Lascasas Porto, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Immunology and Parasitology, School of Medical Sciences, Biomedical Center, Rua Prof. Manoel de Abreu 444/5^o Floor, Vila Isabel, 20511-070 Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratory of Experimental Pathology, Gama Filho University, Rua Manoel Vitorino, 553 - Piedade Rio de Janeiro - RJ, 20740-900, Rio de Janeiro, Brazil

^cLaboratory of Helminth Parasites of Vertebrates, Oswaldo Cruz Institute, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding author: machado@uerj.br (José Roberto Machado-Silva)

¹ Brazilian Council of Science and Technology (CNPq) fellow

ABSTRACT

To date, the effect of the changes promoted by hypercholesterolemia and experimental schistosomiasis infection on splenic architecture has remained elusive. In this paper, we compared spleen from control and infected mice fed either high-fat (29% lipids) or standard diet (12% lipids), assessing spleen volume by liquid displacement and splenic disorganization by histopathology, morphometry and stereology. Infected mice showed higher spleen volume than in corresponding uninfected mice (Student's t-test, P=0.004). The white pulp

compartment was reduced, red pulp and germinal center were enhanced (Student's t-test, $P < 0.01$). Microscopic examination showed cellular infiltrates characterized by polymorfonuclear cells, with intensive lymphocytic mitosis and Mott cells. Hemosiderin deposits tended to be in less extent in infected mice compared with uninfected controls. The red pulp compartment showed a significantly (Student's t-test, $P = 0.008$) increased average number of megakaryocytes compared with uninfected mice, which may be associated with hematopoietic reconstitution. High-fat fed mice showed larger white pulp than controls (Student's t-test, $P = 0.013$). Standard fed mice showed exudative-productive granuloma distributed only sparsely in the red pulp, whereas a tissue reaction characterized by a cell infiltration in high-fat fed mice was found. The results of the present study suggest that there is a significant relationship between high-fat diet intake and splenic disorganization such as a decrease in the numerical density of white pulp and, red pulp and germinal center hyperplasia. Such structural disorganization due to co-morbidities (schistosomiasis and dyslipidemia) may affect the microenvironments of the spleen that are necessary for the generation of immune responses to antigens.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, splenic architecture, high-fat diet, histopathology, morphometry, stereology

1. Introduction

Neglected tropical diseases (Hotez et al., 2008) and nutritional disorder such as undernourishment (Casapia et al., 2007; Gyorkos et al., 2011) represent a public health concern because affect vulnerable communities. It is advocated that high cholesterol level is considered to be one of the leading risks to health worldwide (Ordúñez, 2011). Although hypercholesterolaemia in whole populations have fallen substantially in most developed countries (Capewell and Ford, 2011), it remains a growing health challenge in low-income and middle-income countries (Farzadfar et al., 2011).

The spleen is a secondary lymphoid organ composed of several tissue compartments and plays important roles in fluid volume regulation, modulation of immune responses and

hematopoiesis (Cesta, 2006; Simões et al., 2007). The red pulp is site of extramedullary hematopoiesis, plays a blood filter removing foreign material, degenerate and aged erythrocytes, while the white pulp plays important role in and modulation of immune responses (Cesta, 2006). In animal studies, it has been demonstrated that splenectomy resulted in decreasing levels of lipid levels, which point out the role of the spleen in lipid metabolism (Fatouros et al., 1995; Petronianu et al., 2006; Simões et al., 2007; Paulo et al., 2007; Dinis et al., 2009).

Schistosomiasis mansoni, caused by the blood dwelling fluke *Schistosoma mansoni*, is one the most prevalent neglected tropical water-borne disease (Gryseels et al., 2006). It is estimated that among 120 million symptomatic individuals, 20 million often develop severe morbidity (Chitsulo et al., 2000; Steinmann et al., 2006). Acute schistosomiasis is a clinical syndrome often seen in nonimmune individuals 3 to 6 weeks after exposure during a bath in an endemic area (Epelboin et al., 2010). The clinical manifestation can range from fever, muscular pain to mild hepatomegaly and blood eosinophilia (Andrade and Azevedo, 1987). Histological analysis shows a high cellular immune response against cercarial skin invasion, migrating schistosomula and to soluble egg antigens (Lambertucci, 2010). With ageing of the infection, some individuals progress to the chronic phase. Pathology is due to large numbers of eggs that become trapped in tissues such as the liver, in which the host reaction results in a granulomatous inflammation (Stavitsky, 2004; Baptista and Andrade, 2005). This stage is characterized by extensive hepatic fibrosis, portal hypertension, ascites, esophageal varices, collateral circulation and splenomegaly (van der Werf et al., 2003; Gryseels et al., 2006; Lambertucci, 2010). This disorder has high disability weight (King and Dangerfield-Cha, 2008). Histological examination evidences pronounced changes in spleen micro-architecture in chronic schistosomiasis mansoni (Andrade et al., 1998; Freitas et al., 1999). In regard to acute infection, spleen enlargement and splenitis (Andrade and Azevedo, 1987), as well as diffuse hyperplasia of both red and white pulps and intense active congestion of the splenic sinuses have been reported (Souza et al., 2009).

Recently, another role for the spleen has been proposed (Tarantino et al., 2011). Human studies showed that patients with fatty liver had greater mean spleen volume than normal subjects (Tsushima and Endo, 2000). Fatty liver, or steatosis, refers to a histopathologic condition characterized by an excess accumulation of lipids, primarily triacylglycerol (TG), within hepatocytes (Burt et al., 1998). During the last decade, hepatic

changes in chronic schistosomiasis impacting on splenic structure and function have been reported (Andrade et al., 1998).

Long-term feeding a high-fat diet leads to dyslipidemia, increased liver mass and hepatic steatosis (Neves et al., 2006a,b), splenomegaly, sinusoidal dilatation and macrophages filled with hemosiderin droplets (Altunkaynak et al., 2007). In addition, fat diet caused histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome (Neves et al., 2007a; Alencar et al., 2009, de Alencar et al., 2012). Although the association between liver steatosis and fatty diet with spleen architecture has been evidenced, the features of the splenic microenvironments using a murine model of hypercholesterolemia during experimental schistosomiasis have not yet done. Our aim for this study was to test the hypotheses raised from our previous investigations that high-fat diet associated with schistosomiasis promotes intensive quantitative changes in mice tissue.

Based on stereology, morphometry and histopathology, we shown disorganized splenic architecture of infected mice compared to uninfected mice. Most importantly, spleens of infected animals showed white pulp hypoplasia, red pulp and germinal center hyperplasia. Those animals also presented marked increased in major diameter of white pulp as well as the megakaryocytes abundance than in corresponding mice controls. The deposition of hemosiderin within the splenic parenchyma of infected mice was less abundant than uninfected group. The white pulp also evidenced intensive lymphocytic mitosis, Mott cells, hemosiderin deposits and germinal center hyperplasia. Altogether data demonstrate, for the first time, that the high-fat diet promotes damage to splenic tissue in mice during the acute phase of schistosomiasis infection.

2. Material and methods

2.1. Ethics statement

All procedures were conducted in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All procedures were approved by the local Commission for Ethics in the Use of Animals (Permission L-0036/07; CEUA- FIOCRUZ).

2.2. Experimental animals and housing

The animals, chow regimen, experimental infection and lipid profiles (total cholesterol) have been previously reported (Neves et al., 2007a). Briefly, Swiss Webster female mice were housed in stainless-steel cages with wood shavings as bedding and kept under environmentally-controlled conditions (temperature, $21\pm 1^\circ\text{C}$, humidity, $60\pm 10\%$ and light/dark cycle, 12/12 h). Mice were fed either a high-fat diet containing 47% carbohydrates, 24% proteins, 29% lipids (5.7 kcal/g body wt/day) or a normal diet containing 12% fat, 28% protein and 60% carbohydrate (4.6 kcal/g body wt/day) plus water *ad libitum*.

2.3. Schistosomiasis infection and lipid profile

After six months of feeding on their respective diets, 20 mice were each subcutaneously infected with ~ 50 *S. mansoni* (BH strain) maintained in *Biomphalaria glabrata* snails. Infection allowed maturing for nine weeks representing the acute phase of infection. Total serum cholesterol was assayed both the day before experimental infection and at necropsy, using the colorimetric enzymatic method.

2.4. Source of material

Mice fed a high fat diet (n=10) and controls (n=10) were euthanized by jugular section (hypovolaemic shock) at week nine post-infection and spleen tissue was removed. Spleen volume (SV) was recorded by the Scherle liquid displacement method (Scherle, 1970).

2.5. Histological assessment

Spleen from control and infected mice were fixed in neutral buffered formaldehyde for 48 h at room temperature (Carson et al., 1973) and paraffin embedded. Spleen sections (5 μm) were stained with haematoxylin-eosin, Lennert's Giemsa and Picrosirius for histopathological, morphometric and stereological evaluation by light microscope. Representative images of the white pulp, red pulp and germinal center were acquired under a Nikon Eclipse E200 camera coupled to an Olympus BX41 microscope (Tokyo, Japan) and analyzed with the software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

2.6. Quantitative assessment

2.6.1. Spleen stereology

The spleen was analyzed considering the following compartments: white pulp (V[vwp]), red pulp (V[vrp]) and germinative center (V[vgc]) (Fig.1). Two sections per spleen were utilized for the analysis using the systematic field sampling technique and five microscopic fields were randomly inspected on each section. All determinations were performed at a magnification of $\times 100$ using a test system composed of 36 test points. The volume density of spleen compartments was calculated from the equation: $V_v = P_p/P_t$ (%), where P_p represents the points hitting the structures (Mandarim-de- Lacerda, 2003). Representative images were acquired, Nikon Eclipse E200 camera coupled to an Olympus BX41 microscope (Tokyo, Japan) and analyzed with the software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

2.6.2. Spleen morphometry

For the quantitative analysis of white pulp, 15 fields were randomly chosen on each slide and were evaluated. HE-stained sections were captured with a digital camera (Nikon Eclipse E200 camera) connected to a microscope (Olympus BX41 microscope Tokyo, Japan). The camera output was processed and analyzed by image analyzer software (Image-Pro Plus 3—Media Cybernetics, US). The major and minor diameter of white pulp was calculated (Neves et al., 2007a).

2.6.3. Megakaryocyte quantification

For each animal, megakaryocytes number was quantified in the red pulp by counting 5 high power fields equaling approximately $48000 \mu\text{m}^2$. Representative images were acquired, Nikon Eclipse E200 camera coupled to an Olympus BX41 microscope (Tokyo, Japan) and analyzed with the software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

3. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm Standard error media. Statistical analysis was performed using the GraphPad InStat (version 3.01 GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Groups were compared using a Student's t-test. Values of $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

4. Results

4.1. Biometry, histological assessment and morphometry

Total spleen weights increased significantly ($P=0.004$) in infected mice, regardless of diet (ISC, $0.40\pm 0.12\text{g}$; IHFC, $0.35\pm 0.10\text{g}$) compared with control (SC, $0.16\pm 0.08\text{g}$; HFC, $0.26\pm 0.13\text{g}$). The high fat-fed mice (HFC and IHFC) and standard control diet (ISC) have disorganized splenic architecture compared with uninfected control (SC), for which no histopathology was evident. In addition, lymphocytes, eosinophils and neutrophils were in less extent in mice fed high-fat diet than controls.

To further determine if the differences between above results were due to diet or infection, we next examined the features of both white and red pulp. Our major findings demonstrated that both diet and infection determined perturbations in splenic compartment. Splens from uninfected mice presented loss of the white and red pulp limits in high-fat fed mice (HFC) (Fig. 2B). However, quantitative evaluation of white pulp was not statistically significant ($P<0.05$) between groups for control diet (SC, $1389.5\pm 425\mu\text{m}$) and high-fat diet (HFC, $1378.7\pm 515\mu\text{m}$).

With respect to infected mice, the main changes were exudative-productive granulomas (Fig. 2C) distributed only sparsely in the red pulp in ISC mice groups, whereas a tissue reaction characterized by a cell infiltration in high-fat fed mice was found (Fig. 2D). Histopathological analysis also showed an apparently higher concentration of red blood cells in this group than that observed in control animals. The red pulp compartment showed a significantly ($P=0.008$) increased average number of megakaryocytes (ISC, 10.4 ± 2.8 ; IHFC, 5.9 ± 1.8) compared with uninfected mice (SC, 8.6 ± 3.0 ; HFC, 6.3 ± 1.7). This may be associated with hematopoietic reconstitution.

Microscopic examination of white pulp from uninfected spleen (SC) revealed a normal morphological appearance (Fig. 2A). In contrast, infected mice (ISC and IHFC) showed cellular infiltrates scattered within the white pulp and were characterized by polymorfonuclear cells, with intensive lymphocytic mitosis and Mott cells (Fig. 2E and 2F) Hemosiderin deposits observed in the red pulp tended to be in less extent in infected mice compared with uninfected controls.

The quantitative evaluation of white pulp was statistically significant ($P=0.013$) between controls (ISC, $1157.5\pm399\mu\text{m}$) and high-fat diet (IHFC, $1435.1\pm434\mu\text{m}$).

Stereological assessment

Stereological findings confirmed aforementioned results indicating that both diet and infection lead to changes in the splenic compartments. The white pulp ($V[\text{vwp}]$) was significantly reduced for infected mice (ISC -20%; IHFC -18%, $P<0.01$) compared with controls (SC=53%; HFC=63%). The red pulp ($V[\text{vrp}]$) was significantly increased for infected animals (ISC +18%; IHFC +16%, $P<0.01$) compared with uninfected animals (SC=42%; HFC=36%). The germinative center ($V[\text{vgc}]$) was higher for infected mice fed either high-fat diet (IHFC +1%, $P<0.01$) or standard chow (ISC +2%, $P<0.01$).

5. Discussion

Studies carried out in both humans and animals models have revealed that the increased intake of dietary fat leads to higher levels of serum cholesterol (Aguila et al., 2004; Mohr et al., 2004; Siri-Tarino et al., 2010). Fat diet consumption may result in liver (Neves et al., 2006a,b), intestine (Alencar et al., 2012), and kidney and heart injuries (Panchal and Brown, 2011). Animal studies showed that feeding high-fat diet induces fatty liver or steatosis (Catta-Preta et al., 2011) which is characterized by an excess accumulation of lipids, primarily triacylglycerol (TG), within hepatocytes (Burt et al., 1998). In recent years, clinical and laboratory studies have demonstrated that steatosis also affects other liver insults (Federico et al., 2010) and spleen (Tarantino et al., 2011). Thus, patients with fatty liver had greater mean spleen volume than normal subjects (Tsushima and Endo, 2000).

Because there is an association between fatty liver and spleen (Tarantino et al., 2011) and hepatic changes impact on splenic structure and function in chronic schistosomiasis (Andrade et al., 1998), we asked whether acute infection is also impaired. Our previous observation that hypercholesterolemia promoted hepatic steatosis (Neves et al., 2006a,b) represents a clear detrimental effect of fat diet.

Over the last several years, a large number of design-based stereological studies have proved the usefulness of quantitative approach to evaluate questions in biomedical sciences such as hepatic (Mandarim-de Lacerda et al., 2010), cardiac (Mühlfeld et al., 2010), renal (Altunkaynak et al., 2008) and splenic research (Milićević et al., 1996a,b; 2010). Examination of the white pulp of infected mice by stereology showed lower density of volume than in corresponding uninfected controls, in accordance with those observations in Balb/c mice (Arruda et al., 1993). In addition, we observed high fat diet-associated splenomegaly, which is consistent with previous studies using a rat model (Altunkaynak et al., 2007). An explanation is that both infection due to antigenic stimulation (Dumont et al., 1975, Elmore, 2006) and high-fat diet (Altunkaynak et al., 2007) may result in a significant enhancement of spleen followed by alterations on its architecture (Andrade and Azevedo, 1987; Arruda et al., 1993). Nevertheless, it appeared that high-fat diet may have less intensively impacted the histology of the splenic compartment than standard diet, which was consistent with morphometric findings.

The white pulp plays a pivotal role in the development of specific immune responses and is densely populated with T and B lymphocytes, producing antibodies against pathogens (Cesta, 2006; Tarantino et al., 2011). Hence, splenic organization is central to the efficient functioning of the immune response (Tarlinton et al., 2003). Although the role of dietary lipids on the immune functions has been reported (Erickson et al., 1980; Pablo et al., 2002), as well as changes in the key enzyme activities of glucose and glutamine metabolism in the lymphoid organs (Guimarães et al., 1995), the exact mechanism by which fat diet negatively impacts the white pulp is not fully understood (Cesta, 2006; Federico et al., 2010; Tarantino et al., 2011). In contrast to our data, hyperplasia of white pulp was associated with the expansion of activated CD4⁺ T-cell subpopulation in chronic human schistosomiasis (Teixeira-Carvalho et al., 2002). Whether different times of infection can account for such controversial results remains to be determined.

Spleen stereology and histopathology demonstrated both red pulp expansion and germinal center hyperplasia. One discrepancy between our results and previous studies (Silva-Souza and Vasconcelos 2005) was the characteristics of the inflammatory response to eggs sparsely lodged within the red pulp. While we observed exudative-productive granulomas, those authors evidenced a discrete peri-ovular reaction. This disagreement could be attributed to host susceptibility characteristics, denoting some morpho-functional determinism in the response to schistosomal infection is dependent on the animal species (Costa-Silva et al., 2002). In contrast, mice fed high-fat diet showed an exacerbated inflammatory response, albeit without to egg presence. A possible explanation is that both fat diet (Altunkaynak et al., 2007) and the acute immune response to antigens from mature eggs deposited in the liver may have contributed to splenomegaly. These assumptions are based on previous data demonstrating that lipids-rich diet may favor hatching soluble eggs antigens (Hanna et al., 2005) as well as the production of sperm and oocyte in *S. mansoni* adult worms (Neves et al., 2007b). In this regard, the modulating of cellular signaling appears to be the mechanism whereby cholesterol favors schistosome reproduction (Neves et al., 2007b).

The present study also demonstrates higher number of megakaryocytic cells which is an indication of hematopoietic activity (Cesta, 2006) and an apparent higher concentration of red blood cells than in corresponding control animals, suggesting the presence of hemorrhagic foci (Andrade and Andrade, 1965; Freitas et al., 1999). Our finding suggests that infection did not impair the extramedullary hematopoiesis in the red pulp during ongoing splenomegaly (Cesta, 2006). The intake of a dyslipidaemic diet resulted in lower number of megakaryocytic cells than standard diet group. More definitive experiments will be required to settle the mechanisms whereby megakaryocytic cells are reduced in number.

Hemosiderin is a granular brown denatured product of ferritin (Wang et al., 2010). Macrophages in the spleen are involved in the regular storage; relocation and recycling of iron-compounds of effete or damaged red blood cells (Cesta, 2006). In this study, hemosiderin deposits within macrophages in the red pulp were seen (Sutie, 2006). These results are concordant with rat studies in which animals also fed high fat diet (Altunkaynak et al., 2007). Nevertheless, it appeared to be in less extent than in corresponding uninfected controls. Although interactions of fat and iron metabolism have been reported (Cooksey et al., 2010), the mechanisms responsible for these phenomenon are unclear and warrant further investigation. Histological examination also revealed Mott cells that are found in large

numbers in lymphoid organs (Alanen et al., 1985; Shultz et al., 1987). Those are plasma cells containing intracellular inclusions of unreleased immunoglobulin components, as a result of a block in the normal secretion pathway of immunoglobulins (Russell bodies) (Tarlinton et al., 1992). Additionally, Mott cells can be observed rarely in normal animals, because results of extreme antigenic loads or pathologic states, potentially explaining our findings (Schweitzer et al., 1991). Nevertheless, we still do not know the role of these cells in schistosomiasis.

Concluding remarks

The results of the present study suggest that there is a significant relationship between high-fat diet intake and splenic disorganization such as a decrease in the numerical density of white pulp and, red pulp and germinal center hyperplasia. Such structural disorganization due to co-morbidities (schistosomiasis and dyslipidemia) may affect the microenvironments of the spleen that are necessary for the generation of immune responses to antigens.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support from the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq and the State of Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho Research Foundation– FAPERJ.

References

- Aguila, M.B., Sa Silva, S.P., Pinheiro, A.R., Mandarim-de-Lacerda, C.A. 2004. Effects of long-term intake of edible oils on hypertension and myocardial and aortic remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension* 22,921-929.
- Alanen, A., Pira, U., Lassila, O., Roth, J., Franklin, R.M. 1985. Mott cells are plasma cells defective in immunoglobulin secretion. *European Journal of Immunology* 15, 235-242.

- Alencar, A.C.M.B., Neves, R.H., Águila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Gomes, D.C., Machado-Silva, J.R. 2009. High-fat chow has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 608-613.
- Alencar, A.C.M.B., Neves, R.H., de Oliveira, A.V., Machado-Silva, J.R. 2012. Changes in the small intestine of *Schistosoma mansoni*-infected mice fed a high-fat diet. *Parasitology* 138:1-10.
- Andrade, Z.A., Andrade, S.G. 1965. Patologia do baço na esquistossomose hepatoesplênica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 7, 218-227.
- Andrade, Z.A., Azevedo, T.M. 1987. A contribution to the study of acute schistosomiasis (an experimental trial). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 82, 311-317.
- Andrade, Z. A., Silva, L.M., Souza, M. M., Sadgursky, M., Barbosa, A., Oliveira, I.R. 1998. Role of the spleen on the pathogenesis of schistosomal periportal (pipestem) fibrosis of the liver: an experimental approach. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 557-562.
- Andrade, Z.A. 2005. Regression of hepatic fibrosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 514-520.
- Altunkaynak, B.Z., Ozbek, E., Altunkaynak, M.E. 2007. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet. *Saudi Medical Journal* 28, 353-357.
- Altunkaynak, M.E., Ozbek, E., Altunkaynak, B.Z., Can, I., Unal, D., Unal, B. 2008. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *Journal of Anatomy* 212, 845-852.
- Arruda, S.M., Santoro, F., Sadigursky, M. 1993. Evaluation of spleen cell population and effect of splenectomy on granuloma modulation in BALB/c mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88, 97-102.
- Baptista, A.P., Andrade, Z.A. 2005. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 183-185.

- Burt, A.D., Mutton, A., Day, C.P. 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology* 15, 246-258.
- Capewell, S., Ford, E.S. 2011. Why have total cholesterol levels declined in most developed countries? *BMC Public Health* 11, 641.
- Casapia, M., Joseph, S.A., Gyorkos, T.W. 2007. Multidisciplinary and participatory workshops with stakeholders in a community of extreme poverty in the Peruvian Amazon: development of priority concerns and potential health, nutrition and education interventions. *International Journal for Equity in Health* 6, 6.
- Catta-Preta, M., Mendonca, L.S., Fraulob-Aquino, J., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A. 2011. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Archiv* 459, 477-485.
- Cesta, M. F., 2006. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic Pathology* 34, 455-465.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77, 41-51.
- Cooksey, R.C., Jones, D., Gabrielsen, S., Huang, J., Simcox, J.A., Luo, B., Soesanto, Y., Rienhoff, H., Abel, E.D., McClain, D.A. 2010. Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep^{-/-}) mouse. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298, E1236-1243.
- Costa-Silva, M., Rodrigues-Silva, R., Hulstijn, M. 2002. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 129-142.
- Dinis, A.P.G., Marques, R.G., Simões, F.C., Diestel, C.F., Caetano, C.E.R., Secchin, D.J.F., Neto, J.F., Portela, M.C. 2009. Plasma lipid levels of rats fed a diet containing pork fat as a source for lipids after splenic surgery. *Lipids* 44, 537-543.
- Dumont, A.E., Becker, F.F., Warren, K.S., Martelli, A.B. 1975. Regulation of spleen growth and portal pressure in hepatic schistosomiasis. *American Journal of Pathology* 78, 211-24.

- Elmore, S.A. 2006. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicologic Pathology* 34, 648-55.
- Epelboin, L., Jauréguiberry, S., Estève, J.B., Danis, M., Komajda, M., Bricaire, F., Caumes, E. 2010. Myocarditis during acute schistosomiasis in two travelers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82, 365-367.
- Erickson, K.L., McNeill, C.J., Gershwin, M.E., Ossmann, J.B. 1980. Influence of dietary fat concentration and saturation on immune ontogeny in mice. *Journal of Nutrition* 10, 1555-1572.
- Farzadfar, F., Finucane, M.M., Danaei, G., Pelizzari, P.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Singh, G.M., Lin, J.K., Stevens, G.A., Riley, L.M., Ezzati, M. 2011. National, regional, and global trends in serum total cholesterol since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 321 country-years and 3.0 million participants. *Lancet* 377, 578-586.
- Fatouros, M., Bourantas, K., Bairaktari, E., Elisaf, M., Tsolas, O., Cassioumis, D. 1995. Role of the spleen in lipid metabolism. *British Journal of Surgery* 82, 1675-1677.
- Federico, A., D'Aiuto, E., Borriello, F., Barra, G., Gravina, A.G., Romano, M., De Palma, R. 2010. Fat: a matter of disturbance for the immune system. *World Journal of Gastroenterology* 16, 4762-4772.
- Freitas, C.R., Barbosa, A.A. Jr., Fernandes, A.L., Andrade, Z.A. 1999. Pathology of the spleen in hepatosplenic schistosomiasis. Morphometric evaluation and extracellular matrix changes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 815-822.
- Guimarães, A.R., Kuga, E., Torres, R.P., Colquhoun, A., Curi, R., Mancini Filho, J. 1995. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acid-rich diets. *Biochemistry and Molecular Biology International* 36, 451-461.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L. 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet* 368, 1106-1118.
- Gyorkos, T.W., Maheu-Giroux, M., Casapía, M., Joseph, S.A., Creed-Kanashiro, H. 2011. Stunting and helminth infection in early preschool-age children in a resource-poor

- community in the Amazon lowlands of Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105, 204-208.
- Hanna, S., Gharib, B., Lepidi, H., Montet, J.C., Dumon, H., de Reggi, M. 2005. Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. *Parasitology Research* 96, 6-11.
- Hotez, P.J., Brindley, P.J., Bethony, J.M., King, C.H., Pearce, E.J., Jacobson, J. 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation* 118, 1311-1321.
- King, C.H., Dangerfield-Cha, M. 2008. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illness* 4,65-79.
- Lambertucci, J.R. 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 422-435.
- Mandarim-de-Lacerda, C.A. 2003. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75, 469-486.
- Mandarim-de-Lacerda, C.A., Fernandes-Santos, C., Aguila, M.B. 2010. Image analysis and quantitative morphology. *Methods in Molecular Biology* 611, 211-225.
- Milićević, N.M., Cuschieri, A., Xuereb, A., Milićević, Z. 1996a. Stereological study of spleen tissue compartments from traumatically injured and cancer patients. *General and Diagnostic Pathology* 142, 41-44.
- Milićević, Z., Cuschieri, A., Xuereb, A., Milićević, N.M. 1996b. Stereological study of tissue compartments of the human spleen. *Histology and Histopathology* 11, 833-836.
- Milićević, N.M., Trbojević-Stanković, J.B., Drachenberg, C.B., Milićević, Z. 2010. Stereologic analysis of tissue compartments of gunshot-injured and blunt-injured spleen. *Pathology and Oncology Research* 1669-73.
- Mohr, M., Klempt, M., Rathkolb, B., de Angelis, M.H., Wolf, E., Aigner, B. 2004. Hypercholesterolemia in ENU-induced mouse mutants. *Journal of Lipid Research* 45, 2132-2137.

- Mühlfeld, C., Nyengaard, J.R., Mayhew, T.M. 2010. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovascular Pathology* 19, 65-82.
- Neves, R.H., Alencar, A.C.M.B., Águila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Machado-Silva, J.R., Gomes, D.C. 2006a. Somatic, Biochemical and Hepatic Alterations in Wild Type Mice Chronically Fed High Fat Diet. *International Journal of Morphology* 24, 625-632.
- Neves, R.H., Alencar, A.C., Águila, M.B., Mandarim-De-Lacerda, C.A., Machado-Silva, J.R., Gomes, D.C. 2006b. Hepatic stereology of *Schistosomiasis mansoni* infected-mice fed a high-fat chow. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 253-260.
- Neves, R.H., Alencar, A.C.M. de B., Costa-Silva, M., Aguilá, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Machado-Silva, J.R., Gomes, D.C. 2007a. Long-term feeding a high-fat diet causes histological and parasitological effects on murine *schistosomiasis mansoni* outcome. *Experimental Parasitology* 115, 324-332.
- Neves, R.H., Alencar, A.C.M. de B., Águila, M., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Machado-Silva, J.R., Gomes, D.C. 2007b. Light and confocal microscopic observation in adult *Schistosoma mansoni* collected from mice fed a high-fat diet. *Journal of Helminthology* 81, 361-368.
- Ordúñez, P. 2011. Cardiovascular health in the Americas: facts, priorities and the UN high-level meeting on non-communicable diseases. *International Journal of Cuban Health and Medicine* 13, 06-10.
- Pablo, M.A., Puertollano, M.A., Alvarez de Cienfuegos, G. 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 945-950.
- Panchal, S.K., Brown, L. 2011. Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 351982.
- Paulo, I.C., Paulo, D.N., Kalil, M., Guerra, A.J., Guerzet, E.A., Silva, A.L. 2007. Effects of two types of diet on plasma lipids in rats submitted to splenic surgery. *Revista da Associação Médica Brasileira* 53, 171-177.
- Petroianu, A., Veloso, D.F.M., Costa, G.R., Albert, L.R. 2006. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. *Revista da Associação Médica Brasileira* 52, 56-59.

- Rodrigues, V.L., Otoni, A., Voieta, I., Antunes, C.M., Lambertucci, J.R. 2010. Glomerulonephritis in schistosomiasis mansoni: a time to reappraise. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43, 638-642.
- Scherle, W. 1970. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 26, 57-60.
- Schweitzer, P.A., Taylor, S.E., Shultz, L.D. 1991. Synthesis of abnormal immunoglobulins by hybridomas from autoimmune "viable motheaten" mutant mice. *Journal of Cell Biology* 114, 35-43.
- Silva-Souza, N., Vasconcelos, S.D. 2005. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). *Revista de Patologia Tropical* 34, 145-150.
- Simões, F.C., Marques, R.G., Diestel, C.F., Caetano, C.E., Dinis, A.P., Horst, N.L., Nogueira Neto, J.F., Portela, M.C. 2007. Lipidic profile among rats submitted to total splenectomy isolated or combined with splenic autotransplant. *Acta Cirúrgica Brasileira* 1, 46-51.
- Siri-Tarino, P.W., Sun, Q., Hu, F.B., Krauss, R.M. 2010. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 91, 502-509.
- Shultz, L.D., Coman, D.R., Lyons, B.L., Sidman, C.L., Taylor, S. 1987. Development of plasmacytoid cells with Russell bodies in autoimmune "viable motheaten" mice. *American Journal of Pathology* 127, 38-50.
- Souza, S. S., Souza Neto, J.P., Andrade, Z.A. 2009. Pulmonary changes during acute experimental murine mansoni schistosomiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 42, 5-8.
- Stavitsky, A.B. 2004. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infection and Immunity* 72, 1-12.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6, 411-25.
- Suttie, A.W. 2006. Histopathology of the spleen. *Toxicologic Pathology* 34, 466-503.

- Tarantino, G., Spanò, A., Loi, G., Parisi, A., Tarantino, M., Brancaccio, G., Gaeta, G.B., Riccio, A., 2011. Is spleen circulation impaired in systemic sclerosis and what is the role of liver fibrosis? *World Journal of Gastroenterology* 17, 1606-1613.
- Tarlinton, D., Förster, I., Rajewsky, K. 1992. An explanation for the defect in secretion of IgM Mott cells and their predominant occurrence in the Ly-1 B cell compartment. *European Journal of Immunology* 22,531-539.
- Tarlinton, D., Light, A., Metcalf, D., Harvey, R.P., Robb, L. 2003. Architectural defects in the spleens of Nkx2-3-deficient mice are intrinsic and associated with defects in both B cell maturation and T cell-dependent immune responses. *Journal of Immunology* 170, 4002-4010.
- Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Andrade, Z.A., Cunha-Mello, J.R., Wilson, R.A., Correa-Oliveira, R. 2002. The study of T-cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human *Schistosomiasis mansoni* infection. *Scandinavian Journal of Immunology* 56, 315-322.
- Tsushima, Y., Endo, K. 2000. Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver: correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen. *Digestive Diseases and Sciences* 45, 196-200.
- van der Werf, M.J., Bosompem, K.M., de Vlas, S.J. 2003. Schistosomiasis control in Ghana: case management and means for diagnosis and treatment within the health system. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97,146-152.
- Wang, Y., Juan, L.V., Ma, X., Wang, D., Ma, H., Chang, Y., Nie, G., Jia, L., Duan, X., Liang, X.J. 2010. Specific hemosiderin deposition in spleen induced by a low dose of cisplatin: altered iron metabolism and its implication as an acute hemosiderin formation model. *Current Drug Metabolism* 11, 507-515.

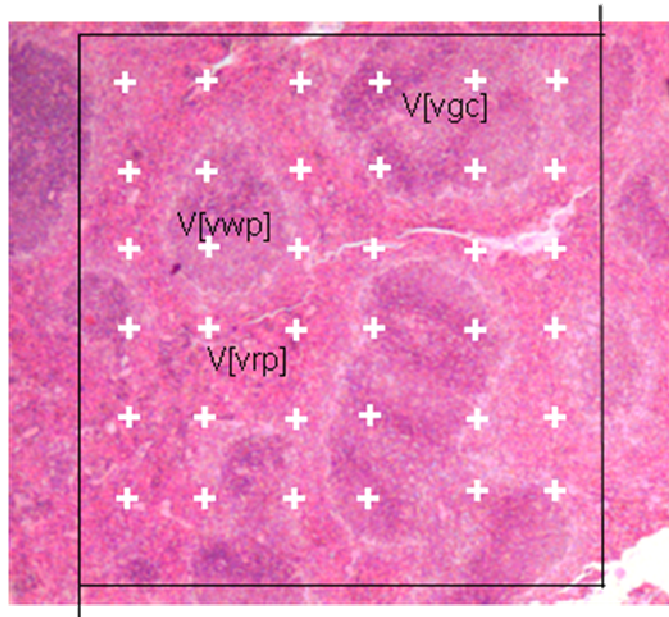


Figure. 1- Photomicrograph of splenic tissue showing white pulp V[vwp], red pulp V[vrp] and germinal center V[vgc] (digital image materials embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin) after superimposition of the test system containing 36 points.

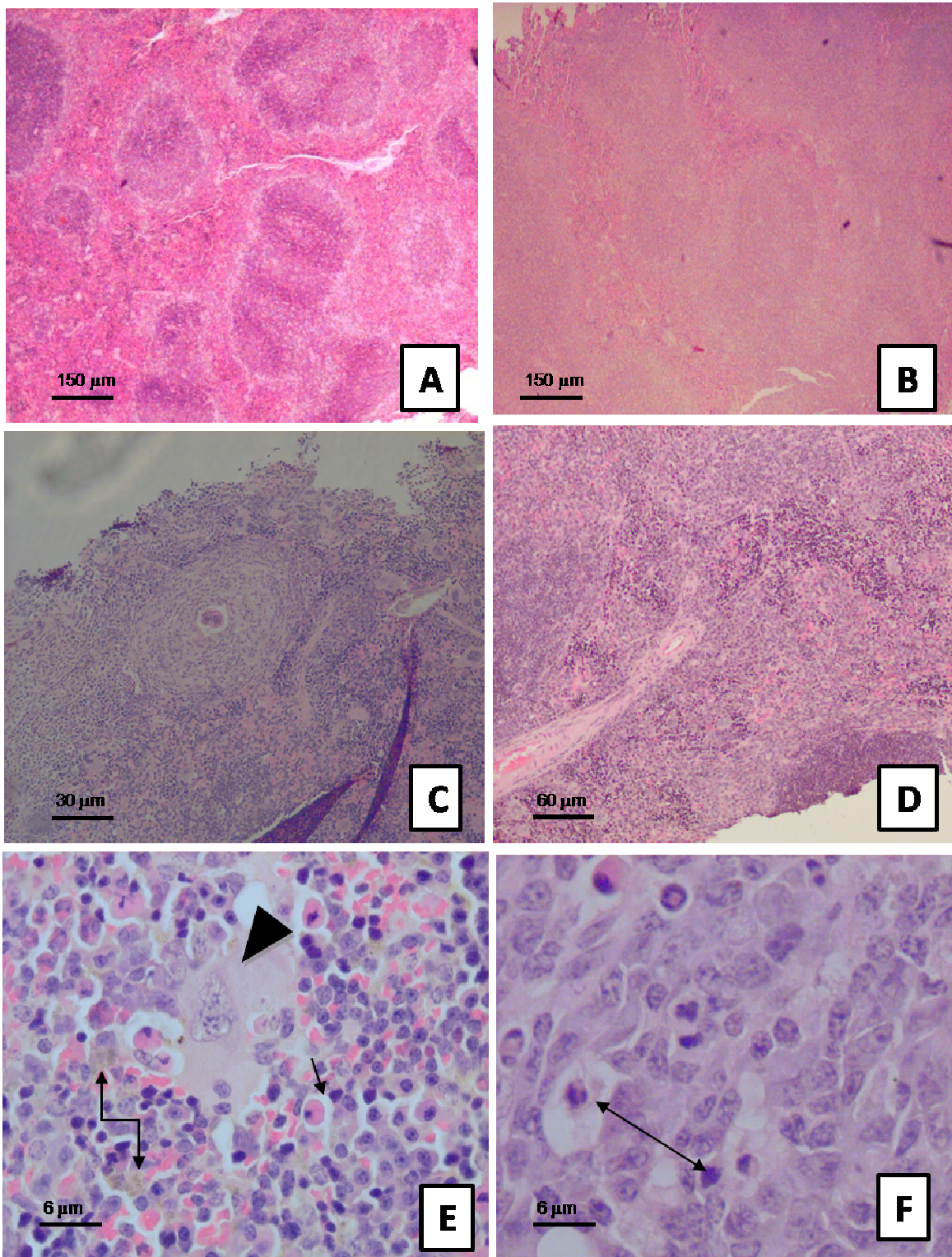


Figure. 2 - photomicrograph of spleen tissue of mice SW fed with standard diet: uninfected (SC) - overview in **A** and infected (ISC) - Exudative-productive granuloma in **C**; and fed high-fat diet: uninfected (HFC) - overview in **B** and infected - cellular infiltrate in **D**; Hemosiderin, Megakaryocyte and cells Mott in **E** and Mitosis in **F**.

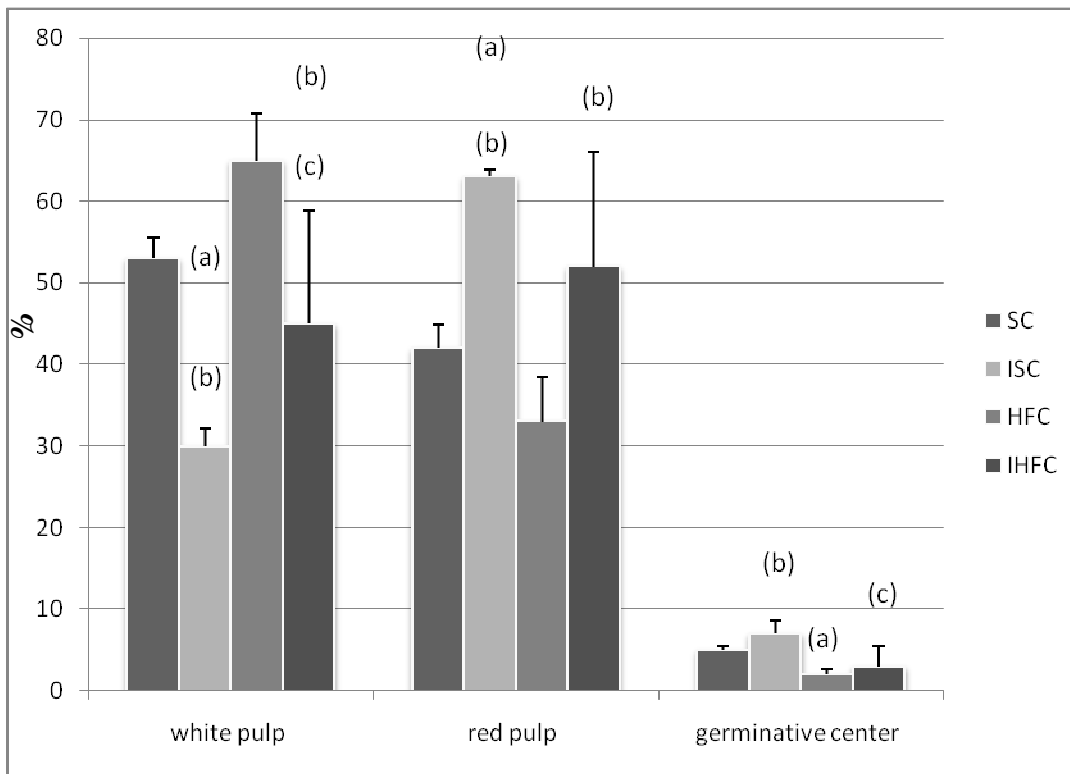


Figure. 3 - Density of the volume of splenic tissue compartments, $p \leq 0.05$, if (a) when compared with the SC group, (b) with the HFC group, (c) with the ISC group. Legend: SC-Diet standard, ISC - Diet Standard infected, HFC -High-fat diet, IHFC - High-fat diet infected.