

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos decorrentes da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos à dieta hipoprotéica

Carina de Paula Pacanaro Oliveira

Belo Horizonte

2013

Carina de Paula Pacanaro Oliveira

Avaliação dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e parasitológicos decorrentes da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamsters (*Mesocricetus auratus*) submetidos à dieta hipoprotéica

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Élide Mara Leite Rabelo

Co-orientação: Prof^ª. Dr^ª. Jacqueline Isaura Alvarez Leite

Belo Horizonte

2013

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Parasitologia Molecular, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG em colaboração com o Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional - Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFMG - e o Laboratório de Patologia Clínica – Escola de Veterinária da UFMG.

Dedico este trabalho a meus pais,
minhas irmãs, meu marido
e meu querido filho

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida, por estar sempre comigo e ter me guiado até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB/UFMG, em especial à Coordenação, a Sibeles e a Sumara, que sempre estiveram dispostas a ajudar.

À Elida Rabelo, minha orientadora, por ser essa pessoa tão maravilhosa e especial. Agradeço pela oportunidade de fazer parte deste grupo, pelo total apoio e amizade.

A minha co-orientadora Jacqueline Alvarez Leite, pelas orientações e por me receber tão bem em seu laboratório.

Ao professor Paulo Ricardo Paes de Oliveira, do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, especialmente a Mariana Pádua que me auxiliou nas análises hematológicas e a estagiária Carolina.

Aos Laboratórios de Leishmanioses, de Fisiologia de Insetos Hematófagos e de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, pela disponibilidade sempre que precisei.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Sílvia pela ajuda valiosa na preparação deste trabalho, pela dedicação e carinho.

Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia Molecular Thayse, Fernando, Lorrana, Sydnei, Bruna, Gabriela, Willian, Ione, Vivian, Flaviane, Ana Flávia, Diana, Júlia, Jéssica, Paula e Camila. Agradeço especialmente à Luciana e a Ana Cristina por sempre estarem dispostas a ajudar.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia, especialmente ao Carlos Manoel do biotério de manutenção da Parasitologia, ao José Carlos, Seu Nery, Tatiana, César e a todos os professores do Departamento.

A minha “irmãzinha” Fabiana que me acompanhou desde o início e se mostrou uma verdadeira amiga em todos os momentos.

Aos amigos do Labin pela boa vontade em ensinar, especialmente ao Edenil, meu colaborador e Alda, que sempre me ajudou. Agradeço também a Fabíola, Lorryne, Lílian, Sol, Ana Carina, Carolina, Lana, Raquel e Gisele.

A turma do pepino, melhor turma de mestrado da Parasitologia da UFMG, aos agregados PG e Vítor, por sempre nos ajudar, e ao professor Alan, que me ensinou que “Mestre não é quem sempre ensina, mas quem, de repente, aprende”.

Ao Anderson Gomes que foi um grande incentivador e amigo.

Aos meus sogros, D. Sônia e Sr. Antônio que me ajudaram o cuidar do João quando eu mais precisei, e a tia Eliane, que também sempre me ajudou prontamente.

Aos meus familiares e amigos, especialmente minha madrinha tia Marli e meus avós, por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu pai, José Roberto, pelos ensinamentos deixados, pela inteligência, caráter e força que me serviram de inspiração para ser uma pessoa melhor.

A minha mãe Mirna, por ser esta mulher guerreira, que sozinha, conseguiu estudar e criar muito bem suas três filhas. Obrigada por sempre estar ao meu lado, em todos os momentos, mesmo quando estamos longe, está sempre no meu coração.

As minhas irmãs, Camila e Carolina pelo total apoio, amor incondicional, união e amizade verdadeira.

Ao meu marido, Fernando Augusto, pelo apoio e incentivo quando decidi cursar o mestrado. Obrigada pela compreensão, paciência e carinho.

Aos desenhos animados: Tom & Jerry, Pica-pau, BEN 10, entre outros, que ajudaram a entreter o Joãozinho enquanto eu precisava estudar e não podia lhe dar toda a atenção necessária.

Ao meu filho, João Augusto, obrigada pela alegria que trouxe em minha vida, por ser meu companheiro, meu sentido de viver, meu amigo e por me fazer sentir a verdadeira felicidade e o mais puro amor.

RESUMO

Os ancilostomídeos infectam aproximadamente 740 milhões de pessoas em todo o mundo e podem levar a manifestações clínicas graves em seu hospedeiro. Estudos prospectivos de coorte no Brasil mostram altas taxas de reinfeção por ancilostomídeos em crianças desnutridas que já haviam sido tratadas, em comparação a crianças bem nutridas. Além disso, as infecções por geohelmintos podem piorar o estado nutricional da população afetada. Este estudo visa esclarecer os efeitos do estado nutricional do hospedeiro no curso da infecção por *Ancylostoma ceylanicum* e como a infecção afeta o estado nutricional do hospedeiro, através de um modelo experimental. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) imunocompetentes são permissíveis ao desenvolvimento do ancilostomídeo *A. ceylanicum*, que também pode infectar seres humanos. Assim, larvas infectantes de terceiro estágio (L3) administradas por via oral no hamster se desenvolvem no intestino delgado em vermes adultos. Neste experimento, avaliou-se a influência do estado de desnutrição, em hamsters submetidos à dieta hipoprotéica e infectados com *A. ceylanicum*. Foram utilizados quatro grupos experimentais: Grupos CN e CI: Grupos Controle, alimentados com rações preparadas com quantidade ideal de proteínas (25,0%) e Grupos DN e DI: Grupos Desnutridos que receberam uma dieta hipoprotéica, preparada com 6,0% de proteínas. Todos os grupos foram alimentados *ad libitum* com as suas respectivas dietas durante quatro semanas antes da infecção por *A. ceylanicum*, e todos os grupos permaneceram com suas dietas até o final do experimento. Os animais dos grupos CI e DI foram infectados oralmente com 50 L3, por gavagem, 28 dias após o início do tratamento com suas dietas específicas. Vinte e dois dias após a infecção, os animais foram eutanasiados e os vermes adultos recuperados e contados. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso, hemograma completo, glicemia de jejum, teor de lipídeos corporais, proteínas totais no soro e número de ovos por grama de fezes (OPG). Observou-se que o grupo desnutrido infectado apresentou patogenicidade mais grave demonstrada pela redução significativa na concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e hematócrito, comparativamente com o grupo desnutrido não infectado. Pode-se observar um aumento na recuperação dos parasitos adultos e na quantidade de OPG do grupo desnutrido em relação ao grupo controle, porém a taxa de oviposição das fêmeas do grupo DI foi menor do que do grupo CI. Estes achados confirmam a hipótese de que a condição nutricional do hospedeiro apresenta uma forte influência no curso da infecção, agravando a patogenicidade.

Palavras-chave: *Ancylostoma ceylanicum*, hamsters, dieta hipoprotéica.

ABSTRACT

Hookworms infect an estimated 740 million people worldwide and can lead to severe clinical manifestations in their host. Prospective cohort studies in Brazil show high rates of reinfection in malnourished children that had been treated, in comparison with well-nourished children. In addition, geohelminths infections worsen the nutritional status of the population involved. This study aims to clarify the effects of the nutritional status of the host in the course of infection by *Ancylostoma ceylanicum* and how infection affects the nutritional status of the host, using an experimental model. Immunocompetent hamsters (*Mesocricetus auratus*) are permissive to the development of the hookworm *A. ceylanicum*, which can also infect humans. Thus, infective third stage larvae (L3) administered orally in hamster develops into adult worms in the host small intestine. In this experiment, we evaluated the influence of the malnutrition state, in hamsters submitted to a low protein diet and infected with *A. ceylanicum*. We used four experimental groups: Groups CN and CI: Control Groups fed with diets prepared with optimum amount of protein (25,0%) and Groups DN and DI: Malnourished Groups that received a low-protein diet, prepared with 6,0% protein. All groups were fed *ad libitum* with their respective diets for four weeks prior to infection by *A. ceylanicum*, and all groups remained in their diets until the end of the experiment. The animals in groups CI and DI were orally infected with 50 L3, by gavage, 28 days after initiation of treatment with specific diets. Twenty two days after infection, the animals were euthanized and the adult worms recovered from the small intestine to number quantification and sexing. The following parameters were evaluated: weight, complete blood count, fasting glucose, content body lipids, total protein in serum and number of eggs per gram of feces (EPG). It was observed that the infected malnourished group showed more severe pathogenesis demonstrated by significant decrease in hemoglobin concentration, erythrocyte number and packed cell volume, compared to the non-infected malnourished group. It was observed a higher recovery of adults parasites and number of eggs to the undernourished group compared to the control group, however, the females oviposition rate of from the DI group was lower than the CI group. These findings confirm the hypothesis that the host nutritional condition presents a high influence in the course of the infection, aggravating the pathogenesis.

Keywords: *Ancylostoma ceylanicum*, hamsters, low protein diet.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µg	micromolar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	análise de variância
ASP	“ <i>Ancylostoma secreted protein</i> ”
Balb/c	linhagem de camundongos albinos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CI	grupo controle infectado
CN	grupo controle negativo
DALYs	anos de vida ajustados por incapacidade
DI	grupo desnutrido infectado
DN	grupo desnutrido negativo
dpi	dias pós-infecção
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme linked imunossorbent assay”
ES	produtos de excreção/secreção
FDA	“Food and Drug Administration”
g	grama(s)
g	giros
h	hora(s)
Hb	hemoglobina
HCl	ácido clorídrico
HDL	lipoproteínas de alta densidade
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgG	imunoglobulina G
kcal/dia	quilocaloria por dia
kg	quilograma
kJ/dia	quilojoule por dia
L1	larva de primeiro estágio
L2	larva de segundo estágio
L3	larva de terceiro estágio

L4	larva de quarto estágio
mcg	microcentigrama
mg	miligrama
min	minuto
mm ²	milímetro quadrado
M	molar
MG	Minas Gerais
mL	mililitro
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	ovos por grama de fezes
PBS	“Phosphate buffer saline”
PBST	“Phosphate buffer saline” - salina tamponada mais Tween 20
RPMI 1640	meio de cultura desenvolvido pelo <i>Instituto Roswell Park Memorial</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	luz ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
%	Porcentagem

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Causas de morte em crianças até 5 anos de idade de 2000-2003	19
Figura 02: Distribuição mundial da ancilostomose.....	22
Figura 03: Ciclo evolutivo de ancilostomídeos.....	24
Figura 4: Mecanismos de interações nutricionais parasito-hospedeiro.....	25
Figura 05: Delineamento experimental.....	39
Gráfico 1: Consumo de ração em gramas/animal/dia durante o experimento.....	50
Gráfico 2: Consumo de água em mililitros/animal/dia durante o experimento.....	50
Gráfico 3: (A) Variação ponderal em gramas das médias de peso dos grupos de hamsters submetidos às dietas controle ou hipoprotéica durante o período experimental; (B) Peso final em gramas dos grupos de hamsters submetidos às dietas controle ou hipoprotéica; (C) Alteração de peso em gramas dos grupos de hamsters após 28 dias de experimento; (D) Alteração de peso em gramas dos grupos de hamsters após 50 dias de experimento.....	51
Gráfico 4: (A) Índice de adiposidade visceral (%) após 50 dias de experimento; (B) Índice de massa magra (g) após 50 dias de experimento.....	52
Gráfico 5: Eliminação de ovos de <i>A. ceylanicum</i> por grama de fezes (OPG).....	52
Gráfico 6: Número de vermes adultos da <i>A. ceylanicum</i> recuperados por intestino delgado de cada hamster.....	53
Gráfico 7: Hemograma de hamsters realizado após 50 dias de experimento. (A) Níveis de hemoglobina em grama por decilitro; (B) Contagem global de eritrócitos por milímetros cúbicos; (C) Volume globular em porcentagem.....	55

Gráfico 8: Contagem global de leucócitos. Valores em milímetro cúbico de sangue de hamsters após 50 dias de experimento.....	56
Gráfico 9: Contagem diferencial de leucócitos. (A) Eosinófilos; (B) Linfócitos; (C) Monócitos; (D) Neutrófilos. Valores em milímetro cúbico de sangue de hamsters após 50 dias de experimento.....	56
Gráfico 10: Níveis de IgG total em plasma de hamsters frente aos antígenos: (A) Extrato bruto de <i>A. ceylanicum</i> ; (B) Produtos ES.....	57
Gráfico 11: Parâmetros bioquímicos no plasma dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Glicose em miligrama por decilitro; (B) Proteínas totais em grama por decilitro; (C) Albumina em grama por decilitro.....	58
Gráfico 12: Parâmetros bioquímicos no plasma dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Triglicérides em miligrama por decilitro; (B) Colesterol total em grama por decilitro; (C) Colesterol HDL em miligrama por decilitro.....	59
Gráfico 13: Teor lipídico e protéico no tecido hepático dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Lipídeos no fígado em miligramas; (B) Triglicérides no fígado em miligrama por grama; (C) Colesterol no fígado em miligrama por grama; (D) Proteínas totais no fígado em grama por grama.....	60
Gráfico 14: Teor lipídico no músculo gastrocnêmio dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Lipídeos em miligramas; (B) Triglicérides em miligrama por grama; (C) Colesterol em miligrama por grama.....	61
Gráfico 15: Teor de lipídeos e proteínas no conteúdo cecal dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Lipídeos em miligramas; (B) Triglicérides em miligrama por grama; (C) Colesterol em miligrama por grama; (D) Proteínas totais em grama por grama.....	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 01:** Composição das rações preparadas para os grupos controle e desnutrido..36
- Quadro 02:** Composição do Mix Vitamínico AIN-93 utilizado na preparação das dietas.....37
- Quadro 03:** Composição do Mix Mineral AIN-93 utilizado na preparação das dietas..37
- Tabela 1:** Quantidade de vermes adultos fêmeas e machos recuperados dos grupos controle e desnutrido e o número total dos parasitos após 22 dias de infecção.....53
- Tabela 2:** Média de vermes adultos fêmeas e machos recuperados por animal e a frequência relativa de recuperação em relação à quantidade ao número de larvas infectantes (50 L3), dos grupos CI e DI.....53
- Tabela 3:** Resultados de OPG (ovos por grama de fezes), dos grupos controle e desnutrido, número de fêmeas recuperadas em cada grupo com suas respectivas Taxas de oviposição em relação ao número de fêmeas encontradas 22 dpi.....54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. O parasito.....	20
1.1.1. Epidemiologia.....	21
1.1.2. Ciclo biológico.....	23
1.2. O estado nutricional do hospedeiro e as parasitoses intestinais.....	24
1.3. A resposta imunológica na desnutrição.....	27
1.4. Hamster como modelo experimental.....	28
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Modelo experimental.....	35
4.2. Dietas específicas.....	36
4.2.1. Preparação das dietas.....	37
4.3. Delineamento experimental.....	38
4.4. Infecção de hamsters com <i>Ancylostoma ceylanicum</i>	39
4.5. Coleta de sangue.....	40
4.6. Exame de fezes utilizando a técnica de OPG.....	40
4.7. Eutanásia, necropsia e recuperação dos vermes adultos.....	41
4.8. Cálculo da taxa de fecundidade das fêmeas.....	42
4.9. Avaliação de parâmetros clínicos, consumo alimentar e peso dos animais.....	42
4.9.1. Controle de consumo.....	42
4.9.2. Pesagem semanal.....	42
4.9.3. Índice de adiposidade visceral e índice de massa magra.....	42
4.10. Hemograma.....	42
4.11. Avaliação da resposta imune humoral.....	43
4.11.1. Preparação de antígenos.....	43
4.11.2. Antígeno de excreção e secreção de verme adulto de <i>A. ceylanicum</i>	43

4.11.3. Antígeno bruto de extrato protéico total de verme adulto de <i>A. ceylanicum</i>	44
4.11.4. ELISA - “Enzyme Lynked Immunosorbent Assay”	44
4.12. Avaliação de parâmetros bioquímicos no plasma.....	45
4.12.1. Glicemia de jejum.....	45
4.12.2. Proteínas totais e albumina.....	45
4.12.3. Perfil lipídico sérico (triglicérides, colesterol total e HDL).....	45
4.13. Avaliação do conteúdo lipídico e protéico no tecido hepático e muscular.....	45
4.13.1. Perfil lipídico (triglicérides e colesterol total).....	46
4.13.2. Proteínas totais no tecido hepático.....	46
4.14. Avaliação de lipídeos e proteínas no conteúdo cecal.....	46
4.14.1. Perfil lipídico (triglicérides e colesterol total).....	46
4.14.2. Proteínas totais.....	46
4.15. Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Sobrevivência e comportamento dos animais.....	49
5.2. Avaliação do consumo de ração e água.....	49
5.3. Aspecto clínico: peso.....	50
5.4. Índice de adiposidade visceral e índice de massa magra.....	51
5.5. Parâmetros parasitológicos.....	52
5.5.1. Exame de fezes: técnica de OPG.....	52
5.5.2. Recuperação de vermes adultos.....	53
5.5.3. Taxa de fecundidade das fêmeas.....	54
5.6. Hemograma.....	54
5.6.1. Séria vermelha.....	54
5.6.2. Série branca: contagem global de leucócitos.....	55
5.6.3. Série branca: contagem diferencial de leucócitos.....	56
5.7. Resposta imune humoral.....	57
5.8. Parâmetros bioquímicos no plasma.....	57
5.8.1. Glicose, proteínas totais e albumina.....	57
5.8.2. Perfil lipídico sérico.....	58
5.9. Avaliação do conteúdo lipídico e protéico no tecido hepático.....	59

5.10. Avaliação do conteúdo lipídico no músculo gastrocnêmio.....	60
5.11. Avaliação de lipídeos e proteínas no conteúdo cecal.....	61
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES.....	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
9. ANEXO.....	88

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Infecções por geohelmintos são reconhecidamente um problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento (Mascie-Taylor & Karim 2003). De acordo com De Silva e colaboradores (2003), existem 1,2 bilhões de pessoas no mundo infectadas por *Ascaris lumbricoides* e cerca de 740 milhões, por ancilostomídeos (*Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*). Montresor e colaboradores (2002) estimam que, anualmente, 65.000 óbitos estejam associados à infecção por ancilostomídeos; 60.000, à *A. lumbricoides*; e, 10.000, à *Trichuris trichiura*.

Geralmente, somente as infecções de intensidade moderada ou alta causadas por geohelmintos no trato gastrointestinal produzem manifestações clínicas, sendo que as infecções de maior intensidade são mais comuns em crianças (Chan et al. 1994).

A ancilostomose afeta principalmente as regiões mais pobres do planeta, onde as pessoas vivem com menos de dois dólares por dia. É uma doença tropical negligenciada, pois causa mais incapacidade do que morte, causando perdas que chegam a 60.000 anos de vida ajustados por incapacidade, que foram estimadas pelo DALY (Disability-adjusted life years) (Hotez et al. 2008; Feasey et al. 2009). É extremamente difícil a eliminação ou erradicação da ancilostomose em áreas de pobreza e deficientes em saneamento (Hotez et al. 2005).

Em países em desenvolvimento, a desnutrição energético-protéica é responsável por 54% do total de 10,8 milhões de mortes por ano de crianças de até 05 anos de idade, e contribui para 53% das mortes associadas com doenças infecciosas entre as crianças pertencentes a esta faixa etária (Malafaia et al. 2009) (Figura 1).

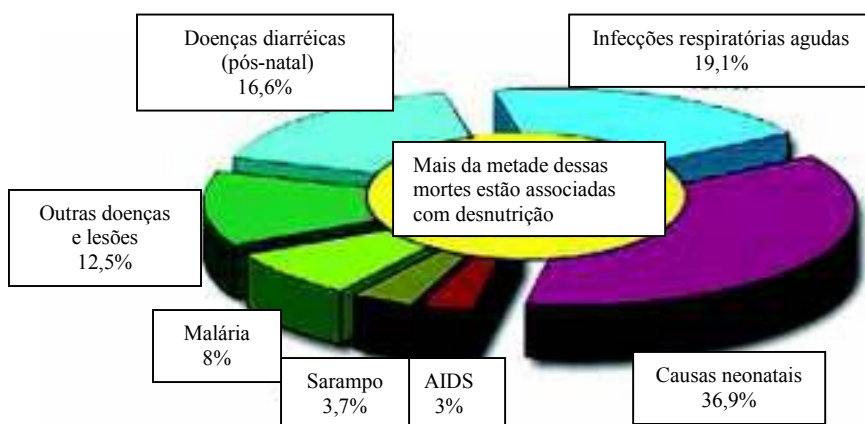


Figura 1: Causas de morte em crianças até 5 anos de idade de 2000-2003 (adaptado de Bryce et al. 2005).

1.1. O parasito

De acordo com Blaxter *et al.* (1998, 2000), o *Ancylostoma* é um parasito do reino Metazoa, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Strongylidea, família Ancylostomidae. Esta família apresenta nematódeos com cápsula bucal desenvolvida, onde, no gênero *Ancylostoma* (subfamília Ancilostominae), suas principais estruturas lembram dentes quitinosos, enquanto no gênero *Necator* (subfamília Bunostominae), lembram lâminas de bordos cortantes. Esta cápsula bucal permite ao helminto fixar-se na mucosa do intestino delgado e alimentar-se de partes da mucosa, assim como da hemorragia resultante. A bolsa copuladora, que ocorre nos machos, é outra característica desta família e ajuda na diferenciação das espécies (Rey 2001).

O principal dano em humanos, devido à infecção por ancilostomídeos, é a perda de sangue causada pelos vermes adultos na mucosa intestinal. A perda de sangue ocorre quando os vermes adultos prendem a sua cápsula bucal na mucosa e submucosa intestinal, para realizarem a hematofagia, e os capilares e arteríolas são lesados por ação mecânica e também por ação das enzimas hidrolíticas e agentes anticoagulantes secretados pelo parasito (Hotez et al. 2004).

Entre os geohelminthos de importância zoonótica, os ancilostomídeos ainda são um grande problema de saúde pública com milhões de pessoas infectadas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Cappello et al. 2003). Os ancilostomídeos são parasitos intestinais hematófagos, sendo uma das maiores causas de anemia por deficiência de ferro e desnutrição em crianças (Variyam & Banwell 1982; Stoltzfus et al. 1997a,b; Dreyfuss et al. 2000; Stephenson et al. 2000; Crompton & Nesheim 2002). Enquanto a anemia é presumivelmente devido ao efeito cumulativo da perda de sangue crônica do intestino, o mecanismo molecular da patogênese da desnutrição ainda é desconhecido (Chu et al. 2004).

O sangramento intestinal causado por ancilostomídeos pode causar perda significativa de ferro e energia, dependendo do grau de parasitose, pois cada verme adulto causa a perda de 0,03 a 0,26 g de sangue por dia, dependendo da espécie, e menos da metade do ferro perdido desta maneira é reabsorvido (Briscoe 1979).

A síntese de células vermelhas do sangue torna-se prejudicada quando a deficiência de ferro é grave, resultando em anemia. Um quadro de deficiência de ferro poder ser originado por diversos fatores como ingestão inadequada de nutrientes, pela demanda fisiológica exigida durante a gravidez, crescimento rápido e pelas perdas de

sangue devido a infecções parasitárias. Vermes adultos provocam sangramento intestinal, causando perda de sangue nas fezes, proporcional a carga parasitária no intestino (Dreyfuss et al. 2000).

Durante a gravidez, a necessidade de ferro excede as reservas para a maioria das mulheres (Bothwell & Charlton 1984). Um estudo com mulheres grávidas no Nepal sugere que a ancilostomose seja responsável por 54% dos casos de anemia moderada a grave durante a gravidez (Dreyfuss et al. 2000).

N. americanus e *A. duodenale* são as espécies de ancilostomídeos mais comuns que ocorrem em humanos. Existem também espécies como o *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense* e *Ancylostoma ceylanicum* que são zoonóticas, ou seja, são parasitos de cães e gatos, mas podem infectar humanos (Hotez et al. 2004). Larvas de terceiro estágio da espécie zoonótica *A. braziliense* e *A. caninum*, ao penetrarem na pele, são causadoras de larva migrans cutânea, que é uma condição dermatológica auto-limitante caracterizada por lesões serpiginosas, de 01 a 05 cm de comprimento, que causam prurido muito intenso no local (Shantz 1991).

1.1.1. Epidemiologia

Condições climáticas são muito importantes para o desenvolvimento do parasito, temperatura e umidade adequadas contribuem para o desenvolvimento da larva no solo. Outros determinantes importantes para o estabelecimento desta parasitose são a pobreza e o abastecimento de água e saneamento inadequados (Bethony et al. 2006).

Estudos sugerem que a prevalência de geohelmintoses em uma comunidade está determinada pelas condições ambientais locais, tais como temperatura, umidade, precipitação e altitude (Xu et al. 1995) e também as condições do microambiente e hábitos da população, que aumentam o risco individual de infecção (Phiri et al. 2000; Traub et al. 2004).

Os locais de maior prevalência de ancilostomídeos no mundo são África Subsaariana e África oriental (Hotez et al. 2005), conforme ilustrado na Figura 02. A alta transmissão ocorre também em outras áreas tropicais de pobreza, como sul da China (Hotez 2002), Índia subcontinental (Yadla et al. 2003) e nas Américas (Hotez et al. 2005). Em todas as regiões existe uma estreita relação entre a prevalência de ancilostomose e o baixo nível sócio-econômico da população (de Silva 2003).

O *Ancylostoma ceylanicum* é capaz de produzir infecção natural e experimental

em humanos. Infecções naturais e maciças por *A. ceylanicum*, associadas à quadros de anemia, foram relatadas com holandeses militares que retornaram de Nova Guiné Ocidental (Anten & Zuidema 1964), e infecções em humanos foram relatadas nas Filipinas (Velásquez & Cabrera 1968), Taiwan (Yoshida et al. 1968), Tailândia (Areekul et al. 1970) e Índia (Chowdhury & Schad 1972). Infecções por *A. ceylanicum* em cães e gatos tem demonstrado ser endêmicas, especialmente na região do sudeste da Ásia (Yoshida et al. 1968; Choo et al. 2000; Bethony et al. 2006) e na Austrália (Beveridge 2002).

Devido à morbidade dessas infecções e a taxa de transmissão estarem diretamente relacionadas ao número de vermes que o hospedeiro alberga, a intensidade da infecção é o principal índice epidemiológico utilizado para descrever a transmissão dos geohelmintos, e a intensidade da infecção é medida pelo número de ovos por grama de fezes, que geralmente é feito pelo método de Kato-Katz modificado (Bethony et al. 2006).

A Organização Mundial de Saúde define que nas infecções de intensidade moderada são observados 2000 a 3999 ovos por grama de fezes e que as infecções de intensidade alta são aquelas em que são verificados 4000 ou mais ovos por grama de fezes (Montresor et al. 2002).

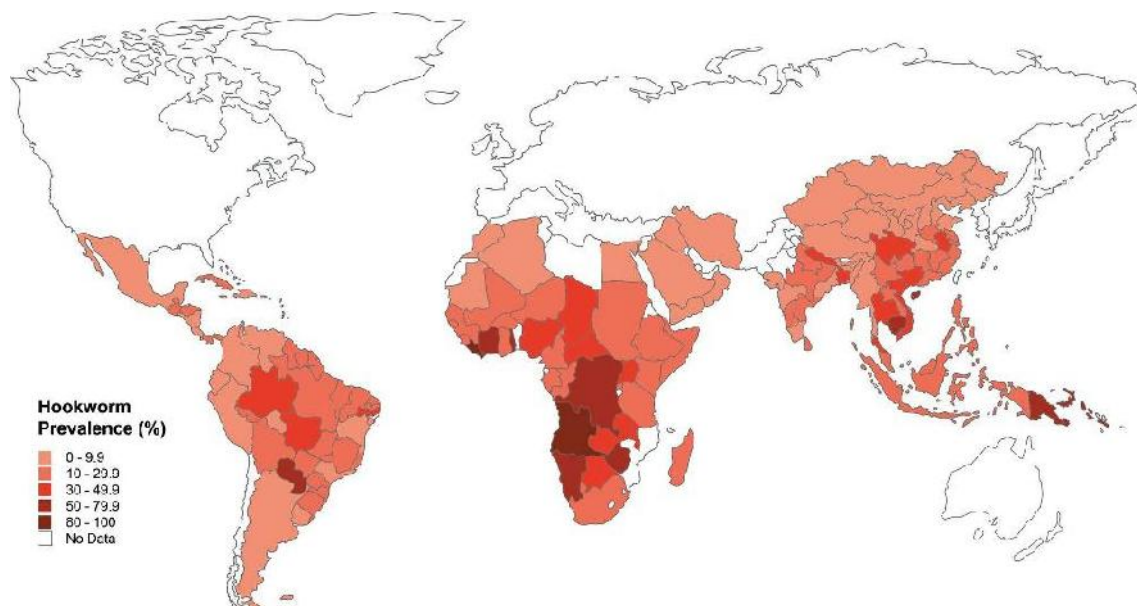


Figura 02: Distribuição mundial da ancilostomose (Hotez et al. 2005).

1.1.2. Ciclo biológico

As larvas filarióides de terceiro estágio (L3) de *A. duodenale* e *N. americanus* tem a capacidade de penetrar ativamente pela pele exposta em solos arenosos contaminados e alcançam os capilares sanguíneos ou linfáticos. No local da penetração é formada uma pequena pápula pruriginosa, e as áreas mais atingidas são as mãos e os pés. A infecção pode ocorrer também por via oral (*A. duodenale* e *A. ceylanicum*) (Soulsby 1965; Brooker et al. 2004).

A penetração nos seres humanos, através da pele, faz com que ocorra o desenvolvimento das larvas, e após dez dias elas migram pela circulação alcançando os pulmões. As larvas podem causar uma pneumonite não grave, que se assemelha à Síndrome de Löffler devido à eosinofilia pulmonar. A pneumonite pode durar até um mês, pois é este o tempo em que as larvas levam para deixar os pulmões.

Posteriormente, as larvas migram pelo trato respiratório e a presença de larvas nesta região pode induzir o reflexo da tosse e/ou pigarro. As larvas são deglutidas e alcançam o intestino delgado, onde atingem a maturidade sexual (Soulsby 1965; Freitas 1977). Após 5-8 semanas da data da infecção, as larvas já maduras sexualmente, começam a fase de cópula. As fêmeas produzem milhares de ovos diariamente (Brooker et al. 2004). Nas infecções orais não ocorre o ciclo pulmonar, as larvas infectantes ao passarem pelo estômago perdem a cutícula pela ação do suco gástrico, depois migram para o intestino delgado, onde invadem a mucosa e se desenvolvem a larvas de quarto estágio (L4), posteriormente retornam à luz intestinal, chegam à fase adulta, fixam-se nas mucosas através de suas cápsulas bucais, dando início à cópula e postura de ovos (Anderson 1992).

Os ovos dos ancilostomídeos saem para o meio exterior juntamente com as fezes. Quando depositados no solo com calor, e umidade adequadas, os ovos se embrionam e em 24-48 horas e dão origem a larvas de primeiro estágio (L1), que se alimentam de restos orgânicos e bactérias. As L1 sofrem duas mudas até se tornarem larvas infectantes de terceiro estágio (L3), as quais não se alimentam e são organismos móveis que possuem tigmotropismo, ou seja a capacidade de se aderirem à partículas sólidas, favorecendo assim as chances de contato com a pele do hospedeiro definitivo. As L3 podem viver durante vários dias no solo até que suas reservas metabólicas lipídicas se esgotem (Brooker et al. 2004, Bethony et al, 2006) (Figura 3).

Modelo de ciclo biológico para ancilostomídeos

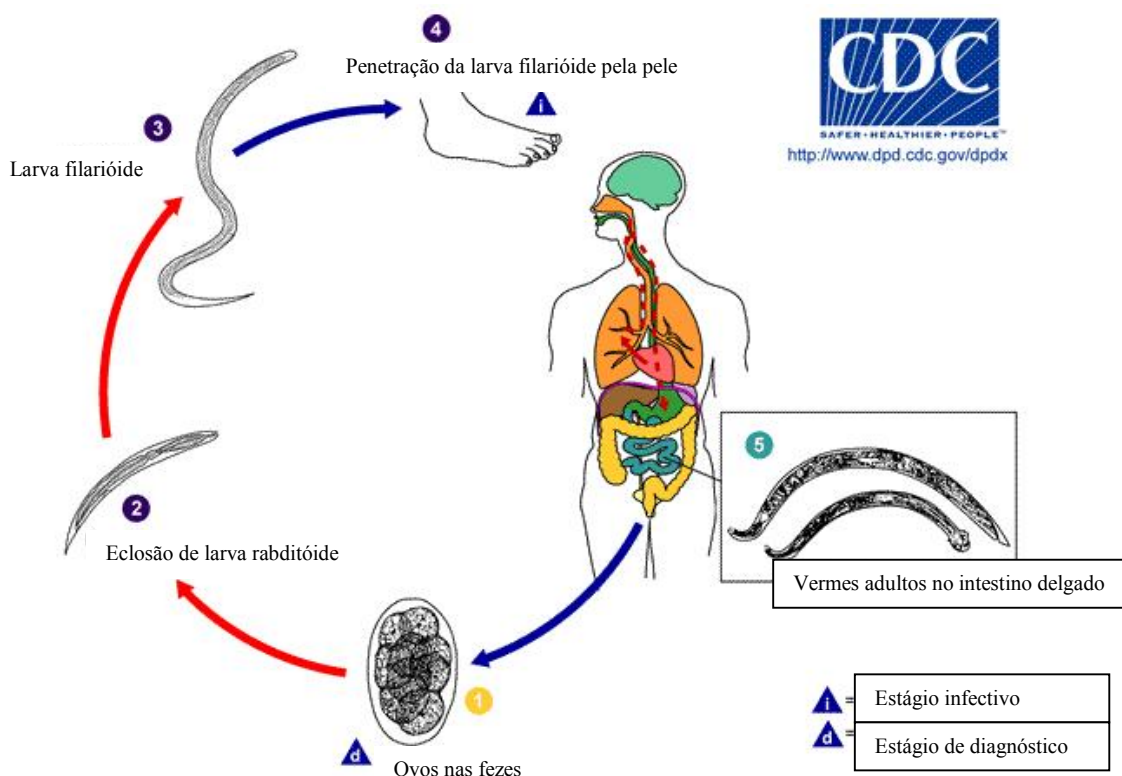


Figura 03: Ciclo evolutivo de ancilostomídeos.
(modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Hookworm.html>)

1.2. O estado nutricional do hospedeiro e as parasitoses intestinais

Aproximadamente 826 milhões de pessoas no mundo estão subnutridas, sendo que 792 milhões de pessoas em países em desenvolvimento e 34 milhões em países desenvolvidos (FAO 2006).

Parasitas intestinais têm maior prevalência e intensidade nas regiões mais pobres dos países em desenvolvimento, coincidindo com áreas onde ocorre subnutrição na população, particularmente em crianças, que são as mais afetadas (Lunn & Northrop-Clewes 1993). Essa interação entre parasitismo e nutrição apresenta dois aspectos inter-relacionados que são a influência do parasitismo no metabolismo e absorção de nutrientes do hospedeiro e o efeito da nutrição do hospedeiro na população dos parasitos e na habilidade do hospedeiro resistir aos distúrbios fisiopatológicos da infecção (Coop & Holmes 1996).



Figura 4: Mecanismos de interações nutricionais parasito-hospedeiro (adaptado de Lunn & Northrop-Clewes 1993).

Estudos prospectivos de coorte no Brasil mostram altas taxas de reinfecção por geohelmintos após tratamento entre crianças desnutridas, se comparadas às crianças bem nutridas (Saldiva et al. 2002). Além disso, quadros de subnutrição aumentam a suscetibilidade a infecções por geohelmintos e, estas, comprometem o estado nutricional da população envolvida (Hall 1985; Hlaing 1993; Lunn & Northrop-Clewes 1993; Solomons 1993; Stephenson 1994; Coop & Holmes 1996; Scrimshaw & SanGiovanni 1997; Koshi & Scott 2001; Crompton & Nesheim 2002).

O termo ancilostomose refere-se à doença provocada pelo parasitismo de vermes da família Ancylostomatidae, caracterizada principalmente pela anemia por deficiência de ferro resultante de infecções moderadas ou pesadas. Sugere-se que os quadros de desnutrição/má absorção intestinal e atraso no crescimento, decorrentes da infecção por *Ancylostoma* e *Necator americanus* ocorram secundariamente à deficiência crônica de ferro, especialmente em crianças (Hotez et al. 2004). Alguns estudos mostram que a infecção por ancilostomídeos estaria associada a uma síndrome de má absorção específica (Darke 1959; Saraya & Tandon 1975; Chu et al. 2004). Darke (1959) mostrou que absorção anormal de nutrientes associadas a infecções por ancilostomídeos está correlacionada com a carga parasitária, onde infestações de alta intensidade provocam a redução da absorção de nitrogênio no intestino, e que o tratamento restabelece as condições ideais de absorção. Outro estudo mostrou que a deficiência protéica é um importante fator na etiopatogênese da má absorção de gorduras, e o estado de deficiência nestes pacientes influencia largamente as funções de absorção do intestino (Saraya & Tandon 1975).

A perda crônica de proteínas em infecções maciças por ancilostomídeos pode resultar em hipoproteinemia e anasarca, que é caracterizada pelo excesso generalizado de líquido no interstício e no interior das próprias células (Hotez et al. 2004). Na desnutrição protéico-calórica o organismo responde clinicamente às restrições manifestando fraqueza, caquexia, retardo do crescimento, perda de massa muscular, esteatose, dermatose, diminuição da resposta imune e debilidade geral, e as alterações anatômicas podem ser generalizadas, como hipoplasia e atrofia dos tecidos e, conseqüentemente, diminuição do tamanho corpóreo e dos órgãos (Truswell 1985).

Em infecções humanas, a perda de ferro, na forma de hemoglobina, tende a ser um problema mais crítico do que a perda protéica e, como dito anteriormente, a anemia por deficiência grave de ferro é o sintoma clássico de infestações maciças por ancilostomídeos. Em áreas onde o valor nutricional da dieta de crianças não é o ideal (ou recomendado), essas perdas tornam-se graves, podendo levar ao desenvolvimento de desnutrição conhecida como kwashiorkor (Lunn & Northrop-Clewes 1993). A desnutrição marasmática é a forma grave mais comum de desnutrição energético-protéica que acomete crianças, devido principalmente a falta ou escassez de alimentos em regiões de extrema pobreza. É conhecida como desnutrição seca, pois ocorre muita perda de peso. O kwashiorkor é ocasionado pela desnutrição protéica, e é menos comum do que o marasmo. Normalmente ocorre, em crianças pobres que tiveram a sua amamentação interrompida devido ao nascimento do próximo filho, e depois, receberam uma alimentação muito fraca em proteínas, como por exemplo, mingau de amido de milho, mandioca ou banana. É um tipo de desnutrição úmida, onde a criança apresenta peso adequado, principalmente devido ao edema na região abdominal, causado pela redução de proteínas plasmáticas e ao acúmulo de lipídeos no fígado (Sidransky 1976; Truswell 1985). A patogênese do kwashiorkor parece ser devido a quantidades muito baixas de proteínas e excesso de carboidratos na dieta, o que conduz a uma manutenção de secreção de insulina no organismo. A insulina poupa proteína muscular, mas causa perda de proteínas no fígado. Assim, as produções de albumina plasmática e de lipoproteínas de baixa densidade são reduzidas, causando edema e acúmulo de lipídeos no fígado (Truswell 1985).

A má nutrição da população que vive em área de risco de contrair ancilostomose apresenta causas variadas, dificultando a categorização entre causa e efeito desses dois quadros patológicos. Entretanto, estudos sugerem que a má nutrição decorrente da infecção por ancilostomídeos é multifatorial e pode ser resultado do efeito cumulativo

de fatores locais (ex. presença do verme, inflamação e destruição da mucosa intestinal que levam à diminuição da área de absorção) e sistêmicos (ex. liberação de produtos de excreção e secreção – produtos ES – do adulto na luz intestinal e no local da alimentação do parasito) mediados pelo verme adulto no intestino delgado (Darke 1959; Chu 2004). Na verdade, vários componentes dos produtos ES de ancilostomídeos vêm sendo caracterizados e associados com diversas funções, e algumas proteínas secretadas pelos ancilostomídeos podem modular a resposta imune (Bethony et al. 2006). Dentre as moléculas já caracterizadas, incluem-se o fator inibidor de neutrófilos, lecitinas tipo-c, inibidores de proteases, peptídeos anticoagulantes, proteases, antioxidantes, acetilcolinesterases, proteínas de ancilostomídeos com domínios de seis-cisteínas, calcirreticulinas e várias moléculas, as quais não têm ainda suas funções determinadas. Dentre essas moléculas podemos citar as proteínas denominadas conjuntamente ASPs (*Ancylostoma secreted-proteins*) (Hawdon et al. 1996; Loukas & Prociv 2001), as quais já foram parcialmente caracterizadas como sendo transcritas abundantemente, e algumas sendo muito antigênicas, porém com as funções ainda indeterminadas (Bin et al. 1999; Zhan et al. 2003). Assim, é concebível a existência de uma molécula que possa estar associada com a inibição da absorção de nutrientes pela mucosa intestinal (Chu et al. 2004). Uma molécula específica é o inibidor de serino proteases tipo Kunitz o qual contém um ou mais domínios característicos e que já foi caracterizado em *A. ceylanicum* (Milestone et al. 2000), *A. caninum* (Hawdon et al. 2003) e *A. duodenale* (disponível no NCBI), além de *A. braziliense* (Costa et al. 2008). Chu e colaboradores (2004) demonstraram a atividade inibitória da proteína já descrita para *A. ceylanicum* contra três serino-proteases digestivas – tripsina, quimiotripsina e elastase pancreática – além de inibição contra elastase de neutrófilos, sugerindo assim que inibidores tipo Kunitz estão envolvidos na proteção do parasito contra a digestão pelas enzimas do hospedeiro, além de poderem estar envolvidos na evasão do sistema imune.

1.3. A resposta imunológica na desnutrição

A deficiência protéica interfere consistentemente na resistência a infecções porque a maioria dos mecanismos da resposta imune é dependente da replicação celular e da produção de compostos protéicos ativos e estes, não podem ser sintetizados sem um equilíbrio adequado de aminoácidos (Scrimshaw & SanGiovanni 1997). Dietas com

baixo teor proteico podem influenciar negativamente a resposta imunológica do organismo (Martínez-Valadares et al. 2005).

A desnutrição causa uma depressão da resposta imunológica do organismo, com comprometimento da formação de anticorpos (Reddy & Srikantia 1964; Reddy et al. 1977) e diminuição de imunoglobulinas no plasma (Aref et al. 1970). Por outro lado, a falha na produção de anticorpos pode ser revertida em poucos dias após o restabelecimento de dieta adequada, contendo quantidades suficientes de aminoácidos (Fernandez 1960, Brown & Katz 1966).

A relação estado nutricional e níveis de resposta a infecções por parasitos é exemplificada pelo trabalho de Malafaia e colaboradores (2009) estudando leishmaniose, o qual demonstrou que a desnutrição energético-protéica, em camundongos BALB/c, acarretou um aumento do parasitismo no baço e diminuiu a resposta imunológica em animais que receberam vacina contra *Leishmania chagasi*. Neste estudo, também foi observada uma redução na produção de IFN- γ pelas células esplênicas em resposta aos antígenos de *L. chagasi* em camundongos alimentados com dieta hipoprotéica. Devido aos poucos estudos sobre mecanismos moleculares que relacionam má nutrição e ancilostomídeos faz-se necessário estabelecer modelos experimentais permissivos que permitam estudar o efeito da infecção em parâmetros nutricionais.

1.4. Hamster como modelo experimental

O hamster *Mesocricetus auratus* (Waterhouse 1839) é um ótimo modelo experimental da ancilostomose porque reproduz a perda de peso, diminuição do ritmo de crescimento, anemia e cronicidade da infecção, que ocorre em humanos (Menon et al. 1985; Garside & Behnke, 1989; Bungiro et al. 2001, 2003; Ghosh et al. 2006). Uma vantagem adicional é o seu custo relativamente baixo quando comparado com outros modelos animais para ancilostomose, tais como cães (Mendez et al. 2005).

A infecção de hamsters por *A. ceylanicum*, tem sido usada como modelo da infecção experimental por ancilostomídeos em diversos estudos de patologia, imunologia e vacinação (Menon et al. 1985; Bungiro et al. 2001; Ghosh et al. 2006; Alkazmi et al. 2006, 2008; Dondji et al. 2008). Ao contrário de camundongos, que não permitem o desenvolvimento de parasitos adultos de *Ancylostoma*, hamsters imunocompetentes são permissíveis ao desenvolvimento de ancilostomídeos parasitos

do homem, inclusive *A. ceylanicum*. Assim, larvas infectantes (L3) administradas por via oral no hamster se desenvolvem no intestino delgado em vermes adultos (Bungiro et al., 2003). Vários trabalhos avaliando diferentes aspectos da infecção e testes de vacinação já foram realizados utilizando hamsters como modelo experimental (Garside et al. 1990; Loukas & Prociv 2001; Fujiwara et al. 2006; Dias et al. 2012).

Hamsters são bons modelos para desnutrição, pois aceitam mais facilmente algumas mudanças em sua alimentação do que outros roedores, e apresentam a característica de perder peso facilmente em situações de restrições alimentares, pois normalmente não ajustam sua ingestão de alimentos para suprir essa restrição, ao contrário da maioria dos outros animais (Silverman & Zucker 1976; Borer et al. 1979; DiBattista & Campbell 1998).

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

Vários aspectos de infecções por helmintos são ainda pouco estudados. Tendo em vista que várias helmintoses estão associadas com o baixo poder econômico das regiões endêmicas, o estado nutricional irá influenciar no grau de comprometimento do paciente infectado. É sabido que a principal patogenia da ancilostomose é o desenvolvimento de um quadro de anemia no paciente. Entretanto, o grau de anemia é extremamente dependente do estado nutricional do hospedeiro. Os dados epidemiológicos mostram que nas áreas onde encontramos desnutrição na população, normalmente estão associadas a quadros de parasitismo e como, muitas vezes ocorrem juntos, não permitem avaliar a interferência de um parâmetro (desnutrição) sobre o outro (parasitismo), já que nestas regiões seria difícil encontrar um grupo controle. A resposta para estas questões seria de grande importância para intervenções dos órgãos de saúde, em nível de saúde pública da população.

Contudo, nenhum estudo correlacionando níveis de desnutrição e patogenia causada por esse parasito foi ainda descrito na literatura. Estudos relacionando a ancilostomose e a desnutrição em humanos são dificultados pelo fato da desnutrição poder apresentar causas variadas. Por outro lado até o momento não existem trabalhos utilizando modelos experimentais nos quais o quadro de desnutrição possa ser induzido, para o estudo da associação entre desnutrição e ancilostomose.

Portanto, esse trabalho visa estabelecer o modelo de desnutrição em hamster, que já é um bom modelo para a infecção por *A. ceylanicum*, para avaliar os efeitos da desnutrição protéica do hospedeiro no curso da infecção por *A. ceylanicum* e, concomitantemente, avaliar como a infecção afeta o estado nutricional do hospedeiro. Dentro desse modelo, a hipótese de que a patogenia causada pelo helminto seria exacerbada em função do estado de subnutrição do hospedeiro, será testada.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da desnutrição protéica de hamsters (*Mesocricetus auratus*) na infecção por *Ancylostoma ceylanicum*.

3.2. Objetivos específicos

- Induzir o estado de desnutrição em hamsters utilizando uma dieta hipoprotéica e isocalórica;
- Avaliar parâmetros clínicos e o estado nutricional dos animais submetidos à dieta hipoprotéica ou controle, e infectados com *A. ceylanicum* em comparação com animais não infectados;
- Avaliar parâmetros parasitológicos dos animais infectados desnutridos em comparação com os animais normonutridos;
- Avaliar parâmetros hematológicos de hamsters submetidos à dieta hipoprotéica ou controle, e infectados com *A. ceylanicum* em comparação com hamsters não infectados;
- Avaliar resposta imune humoral frente aos antígenos bruto e de excreção e secreção (ES) de verme adulto, para os grupos infectados desnutridos e normonutridos;
- Avaliar parâmetros bioquímicos de hamsters infectados em comparação aos não infectados, e submetidos à dieta hipoprotéica ou controle;
- Avaliar a absorção de lipídeos através da análise e quantificação deste nutriente excretado nas fezes.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

Este projeto foi realizado no Laboratório de Parasitologia Molecular em colaboração com o Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG) e o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, EV/UFMG).

4.1. Modelo experimental

Para este trabalho foram utilizados hamsters (*M. auratus*), fêmeas, com idade entre quatro e seis semanas, nascidos no Biotério de Reprodução do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Estes animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular em gaiolas plásticas coletivas com, no máximo, 5 animais em cada, e todos os procedimentos relativos à manipulação, alimentação, infecção e eutanásia seguiram as recomendações do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), conforme projeto aprovado sob o número 194/11. Antes do início do experimento, os animais foram tratados com 5 mg/kg de ivermectina (Ivomec Gold 1%) por via oral, para garantir a ausência de outros helmintos nesses animais. As infecções foram realizadas após quatro semanas do uso do anti-helmíntico.

Nenhum grupo recebeu ração comercial, todos os grupos receberam rações manipuladas e foram alimentados *ad libitum* com suas respectivas dietas durante 04 semanas antes da infecção. Estes grupos, infectados ou não, permaneceram com suas dietas durante todo o período experimental.

A cada dois ou três dias, dependendo da necessidade, ocorria a reposição de água e ração nas gaiolas. As quantidades eram colocadas de acordo com o consumo dos animais, tomando cuidado para não faltar alimentos, o que poderia influenciar o estudo nutricional dos hamsters, e evitando colocar excesso de ração, que poderiam se degradar devido à presença de água em sua composição. Foram realizadas pesagens iniciais e finais de água e ração colocadas nas gaiolas, para a verificação das quantidades consumidas por cada grupo.

Os hamsters apresentam o hábito comer outros hamsters que venham a morrer dentro da mesma gaiola, e para que isso não ocorresse no período experimental, a vigilância nas gaiolas foi intensificada e, diariamente, os animais eram conferidos para verificar sua situação física. Pois se apresentassem qualquer sinal de magreza, fraqueza

ou diarréia intensa, este animal era colocado em uma gaiola separada dos demais para evitar que, após a sua morte, os outros membros da gaiola pudessem comê-lo, comprometendo todo o experimento, já que este se baseia nas dietas específicas de cada grupo de animais.

4.2. Dietas específicas

Para avaliar a influência do estado nutricional do hospedeiro na infecção por *A. ceylanicum*, o estado de desnutrição protéica em hamsters, foi induzido, por meio de dieta específica hipoprotéica (modificado de DiBattista 1999), onde os grupos foram divididos em:

Grupos **CN** e **CI**: Grupos **Controles** (normonutridos) que receberam dietas preparadas com quantidade ideal de proteínas (25,0%) em sua composição.

Grupos **DN** e **DI**: Grupos **Desnutridos** que receberam dieta hipoprotéica preparada com 6,0% de proteínas em sua composição.

Os componentes das rações manipuladas e suas respectivas porcentagens estão descritos no Quadro 01. É importante ressaltar que a dieta hipoprotéica apresenta os mesmos valores calóricos da dieta controle, portanto são dietas isocalóricas.

Quadro 01: Composição das rações preparadas para os grupos controle e desnutrido.

Composição	Dieta Controle (g/Kg)	Dieta Hipoprotéica (g/Kg)
Caseína	245,000	60,000
Metionina	5,000	0,000
Óleo vegetal	200,000	200,000
Amido de milho	489,992	679,992
Mix vitaminas	15,000	15,000
Mix minerais	35,000	35,000
Celulose	10,000	10,000
BHT	0,008	0,008
Água deionizada	qsp*	qsp*
Densidade calórica (Kcal)	4760	4760

* quantidade suficiente para formar um pellet de ração.

As misturas de vitaminas e minerais foram adquiridas da empresa Rhooster® Indústria e Comércio Ltda. (Araçoiaba da Serra, SP-Brasil) e foram preparadas seguindo as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para roedores (Reeves et al. 1993), conforme detalhado nos Quadros 02 e 03.

Quadro 02: Composição do Mix Vitamínico AIN-93 utilizado na preparação das dietas.

Componente	Quantidade	Componente	Quantidade
Ácido Fólico	200 mg	Riboflavina	600 mg
Ácido Nicotínico	3000 mg	Tiamina HCl	600 mg
Biotina	20 mg	Vitamina A	400.000 UI
Pantotenato de Cálcio	1600 mg	Vitamina B12	2500 mcg
Piridoxina HCl	700 mg	-	-

Quadro 03: Composição do Mix Mineral AIN-93 utilizado na preparação das dietas.

Componente	Quantidade	Componente	Quantidade
Boro	14,26 mg	Magnésio	14,48 g
Cálcio	142,94 g	Manganês	300 mg
Cloro	44,90 g	Molibdênio	4,32 mg
Cobre	72,41 mg	Níquel	14,31 mg
Cromo	28,65 mg	Potássio	102,86 g
Enxofre	8,60 g	Selênio	4,28 mg
Ferro	1000 mg	Silício	143,26 mg
Flúor	28,72 mg	Sódio	29,38 mg
Fósforo	56,90 g	Vanádio	2,87 mg
Iodo	5,93 mg	Zinco	860 mg
Lítio	2,85 mg	-	-

4.2.1. Preparação das dietas

As dietas foram preparadas no Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (Labin), em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite. As rações foram feitas de acordo com a DIETA AIN-93M, que é destinada à manutenção de animais com idade superior a seis semanas.

A preparação das dietas foi realizada da seguinte forma: os componentes sólidos foram misturados em um recipiente, em ordem crescente de peso, exceto o mix vitamínico, que foi acrescentado por último, com a luz apagada, pois ele possui componentes sensíveis à luz. Todos os ingredientes foram homogeneizados, e em seguida, acrescentou-se o óleo de soja, uma nova homogeneização foi realizada, e a mistura toda foi passada por três vezes em uma peneira para uma homogeneização final da dieta. A essa mistura foi adicionada água destilada em pequenos volumes até que a massa adquiriu uma consistência pastosa, porém firme. Com essa massa foram formadas porções (pellets) de aproximadamente 20 g. Os pellets prontos foram armazenados, à temperatura de -20°C até o momento de uso.

4.3. Delineamento experimental

No início do experimento (dia 0), as dietas específicas descritas no item 4.2, foram introduzidas aos animais com o objetivo de diferenciar o estado nutricional dos hamsters dos Grupos Controles (Grupos CN e CI) dos animais dos Grupos Desnutridos (Grupos DN e DI). Nesta data foram realizados procedimentos de pesagem dos animais, coleta e análise de sangue, após jejum noturno. Cada grupo foi composto por 10 animais e foram realizadas pesagens semanais dos hamsters até o final do experimento.

Após 28 dias da indução da desnutrição dos grupos DN e DI, e da nutrição normal dos grupos CN e CI, foi realizado o procedimento de coleta e análise de sangue, após jejum noturno, de todos os animais e posterior infecção dos animais dos grupos CI e DI com *A. ceylanicum*.

Para infecção, 50 L3 de *A. ceylanicum* previamente recuperadas foram inoculadas via oral, por gavagem, no tubo digestivo superior dos hamsters.

Treze dias após o inóculo, iniciou-se a coleta de fezes dos animais infectados para realização do exame de fezes, que consiste na realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), utilizando câmara de McMaster (Gordon & Whitlock 1939).

Vinte e dois dias após a infecção foram realizadas coletas de sangue, após jejum de 12 horas, e posterior eutanásia dos animais com sobredose de anestésico (45 mg/kg de solução de cloridrato de xilazina e 240 mg/kg de ketamina, via intraperitoneal). Todo o delineamento experimental está resumido na Figura 05.

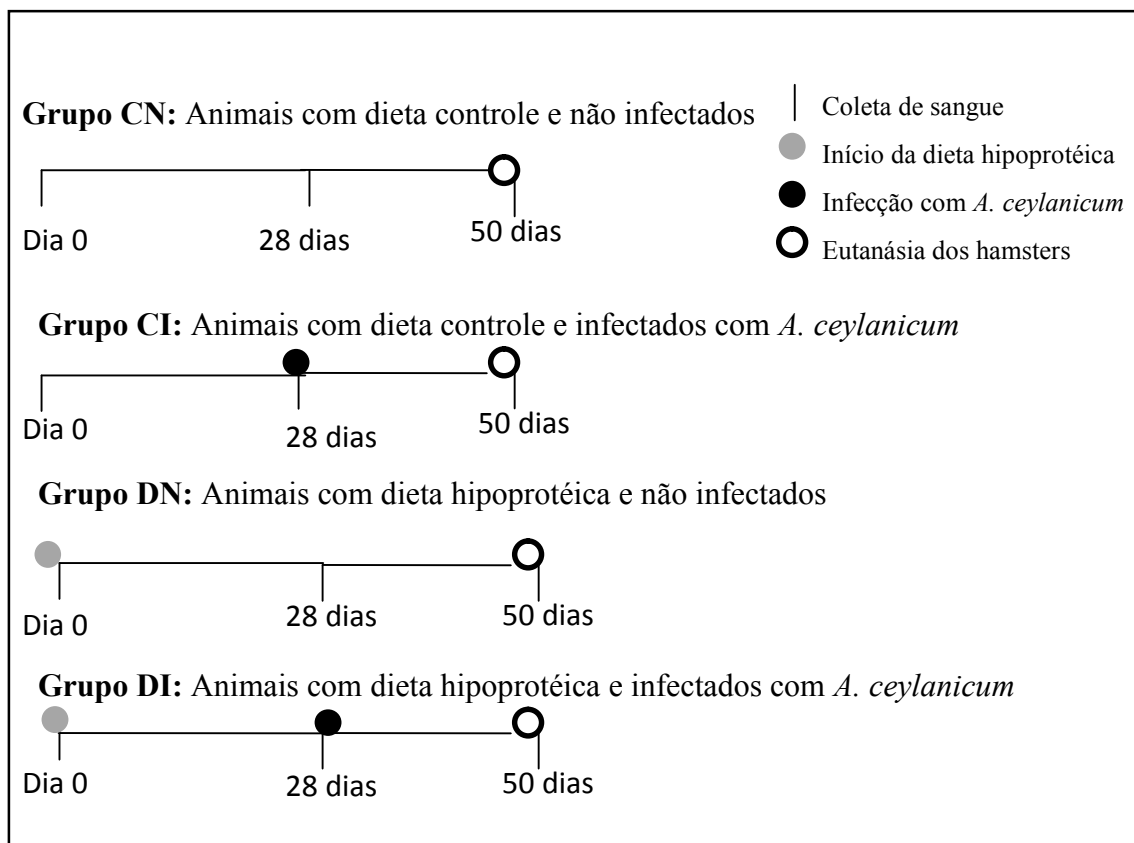


Figura 05: Delineamento experimental.

Após a eutanásia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta para recuperação do intestino delgado, que foi retirado e aberto em placa de Petri contendo PBS para recuperação dos parasitos.

Fragments do fígado e do músculo gastrocnêmio foram separados, embalados em papel alumínio e congelados (-20°C) para posterior análise.

4.4. Infecção de hamsters com *Ancylostoma ceylanicum*

A Cepa de *A. ceylanicum* foi isolada pela George Washington University, foi cedida pelo Dr. Peter Hotez ao Prof. Dr. Ricardo Fujiwara, que em 2005 repassou gentilmente para o nosso laboratório onde, desde então, é mantida no biotério do Laboratório de Parasitologia Molecular, seguindo as recomendações do CETEA/UFMG (projeto 66/2008). As larvas infectantes de terceiro estágio são recuperadas de coproculturas (Roberts & O'Sullivan 1950) de fezes de hamsters infectados e após cultivo por 7 dias a 27°C são recuperadas pelo Método de Baermann-Moraes modificado (Barçante et al. 2003). As larvas são coletadas em tubo tipo Falcon de 15mL, centrifugado a 2400 g, por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante

é descartado e o volume do tubo é completado para 10 mL com solução salina 0,85%. A observação da motilidade e a estimativa da quantidade de larvas são feitas em microscópio estereoscópio, e logo após, as larvas são armazenadas ao abrigo da luz até a sua utilização.

Os animais dos grupos CI e DI, após 28 dias do início da introdução das dietas específicas, foram infectados com 50 L3, por via oral, com auxílio de agulha de gavagem. Para estas infecções, foram utilizadas larvas frescas, recém obtidas dos exames de Baermann de animais em fase aguda de infecção.

4.5. Coleta de sangue

Nos dias 0, 28 e 50 do experimento, o sangue dos hamsters foi coletado por punção do plexo orbital (Pansky et al, 1961). A contenção manual dos animais foi realizada pela região cervical, de modo que automaticamente provocou a estase venosa na região cefálica e a exteriorização do glóbulo ocular. Após a exteriorização do glóbulo instilou-se uma gota de colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%), e após 3 minutos introduziu-se o tubo capilar, contendo EDTA 0,5 M, entre o glóbulo ocular exposto e o fundo da cavidade orbitária. Foi realizada uma pequena pressão acompanhada de rotação do tubo capilar. O volume total de sangue obtido por coleta foi de aproximadamente 500 µl/ hamster.

Antes dos procedimentos de coleta do sangue, os animais ficaram em jejum de 12 horas. No momento da coleta, foram colocados aproximadamente 100 µL de sangue em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL fluoretado, para a realização da análise de glicemia de jejum, pois o fluoreto impede a degradação da glicose (antiglicolítico), e o restante foi colocado em outro tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL. O sangue coletado no tubo sem fluoreto foi utilizado para avaliação dos demais parâmetros hematológicos e o plasma foi separado por centrifugação a 14000 x g por 5 min (Eppendorf Centrifuge 5415C) para análise dos parâmetros bioquímicos e imunológicos.

4.6. Exame de fezes utilizando a técnica de OPG

Treze dias após o inóculo, iniciou-se a coleta de fezes dos animais infectados para realização do exame de fezes, que consiste na realização da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), utilizando câmara de McMaster (Gordon & Whitlock, 1939).

Para isso, quatro gramas de fezes de cada gaiola foram colocados em copos plásticos descartáveis e acrescentou-se 30 mL de água para o amolecimento dos pellets

fecais. Após 30 min, a mistura foi homogeneizada com uma pipeta de Pasteur, acrescentou-se 30 mL de solução saturada de sal e homogeneizou-se novamente. Durante a agitação uma alíquota de amostra foi retirada e colocada em uma câmara de McMaster, preenchendo-a completamente para evitar a formação de bolhas que pudessem atrapalhar a leitura. Aguardou-se 5 min para iniciar a leitura em microscópio estereoscópio, em objetiva de 10X. O número total de ovos encontrados nas duas câmaras foi multiplicado pelo fator de correção.

4.7. Eutanásia, necropsia e recuperação dos vermes adultos

Os animais foram mantidos em jejum de 12h antes da eutanásia que ocorreu por sobredose da associação de anestésico e sedativo (solução de 45 mg/kg de cloridrato de xilazina e 240 mg/kg de ketamina, por via intraperitoneal).

Logo após a confirmação da morte, o animal foi colocado em decúbito dorsal e teve a cavidade abdominal aberta. Em seguida, o intestino delgado foi retirado, aberto longitudinalmente seguindo-se a raspagem da mucosa para desprendimento dos vermes adultos, em placa de Petri contendo solução de PBS (Phosphate buffered saline) pH 7,4. Os vermes foram recuperados diretamente da mucosa intestinal, contados e separados por sexo (sexagem).

Após esta etapa, todo o tecido adiposo visceral foi retirado da cavidade abdominal, lavado em solução de salina fisiológica, seco superficialmente em papel filtro e pesado em balança analítica para obtenção do peso absoluto a ser utilizado no cálculo do índice de adiposidade visceral e índice de massa magra.

Um fragmento de aproximadamente 1 mm² do músculo gastrocnêmio e do fígado foram retirados, lavados em solução salina fisiológica, secos superficialmente em papel filtro e armazenados em papel alumínio a -20°C para avaliar o acúmulo ectópico de gorduras em tecido intramuscular e hepático.

Todo o conteúdo do ceco foi retirado, colocado em tubos de polipropileno de 1,5mL e secos em estufa a 37°C, por 12 horas. Após este período, foram congelados a -20°C para análise posterior.

4.8. Cálculo da taxa de fecundidade das fêmeas

O cálculo da taxa de fecundidade das fêmeas foi obtido pelo resultado do teste de OPG obtido no dia da eutanásia, dividido pelo número de vermes fêmeas recuperadas em cada grupo.

4.9. Avaliação de parâmetros clínicos, consumo alimentar e peso dos animais

4.9.1. Controle de consumo

A cada reposição de água e ração foram realizadas pesagens iniciais e finais para a verificação das quantidades consumidas por cada grupo a cada dois ou três dias (dependendo da necessidade), e este valor foi dividido pelo número total de animais da gaiola e pelo número de dias, obtendo-se a média diária consumida por indivíduo.

4.9.2. Pesagem semanal

Semanalmente os animais foram pesados em balança semi-analítica, sendo considerada a diferença do peso inicial pelo peso final, que pode ser ganho, manutenção ou perda de peso do animal durante a semana.

4.9.3. Índice de adiposidade visceral e índice de massa magra

O tecido adiposo visceral recuperado de cada animal após a eutanásia foi pesado e seu peso foi corrigido pelo peso corporal (aferido antes do jejum noturno que antecedeu a eutanásia), para determinação do índice de adiposidade visceral dos animais em porcentagem.

O cálculo do índice de massa magra foi feito a partir da quantidade de tecido adiposo visceral, em gramas, subtraído do peso total do animal antes da eutanásia.

4.10. Hemograma

Foram analisados os parâmetros hematológicos: contagem de leucócitos, eritrócitos, volume globular médio e hemoglobina. As análises foram feitas no equipamento de Análise Hematológica de impedância (ABACUS Jr Veterinário), e a contagem diferencial em esfregaços corados pela técnica de May-Grunwald-Giemsa. Também foram realizadas análises pela técnica de Micro-hematócrito, desenvolvidas em tubos capilares, das amostras sanguíneas. Todas as análises foram feitas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Departamento de Clínica e Cirurgia

Veterinária da UFMG, em colaboração com o Prof^o. Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Paes.

4.11. Avaliação da resposta imune humoral

Foram realizados testes de ELISA utilizando o plasma dos hamsters dos grupos experimentais para detecção de anticorpos anti-proteínas excretadas/secretadas (antígeno ES) e extrato protéico total (antígeno bruto) obtido dos vermes adultos.

4.11.1. Preparação de antígenos

Os helmintos utilizados para a produção de antígenos de *A. ceylanicum* foram obtidos das infecções de rotina realizadas para a manutenção da cepa. Os procedimentos usados para a recuperação dos vermes adultos da mucosa intestinal dos hospedeiros foi semelhante ao descrito anteriormente.

4.11.2. Antígeno de excreção e secreção de verme adulto de *A. ceylanicum*

Para a obtenção dos produtos excretados/secretados (ES) de *A. ceylanicum*, os parasitos foram lavados com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), logo após sua retirada da mucosa intestinal dos hospedeiros. Em seguida, os parasitos foram lavados por mais três vezes com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4) estéril e três vezes com meio de cultura RPMI 1640 (desenvolvido pelo *Instituto Roswell Park Memorial* – Sigma, EUA), suplementado com antibiótico/antimicótico 1X (Sigma, EUA) e 1,6% de l-glutamina (Synth, BRASIL), em capela de fluxo laminar, para retirar possíveis dendritos contaminando os vermes e evitar a contaminação da cultura, por bactérias presentes nos parasitos.

Após a lavagem, os vermes foram transferidos para tubos de 50 mL contendo meio de cultura RPMI 1640 (desenvolvido pelo *Instituto Roswell Park Memorial* – Sigma, EUA), suplementado com antibiótico/antimicótico 1X (Sigma, EUA) e 1,6% de l-glutamina (Synth, BRASIL), numa taxa de 10-15 vermes por mililitro, e incubados em estufa a 37°C e 5% de gás carbônico durante 3-6 dias, dependendo das condições dos parasitos em cultura. A cada 12 h, aproximadamente, o meio da cultura era renovado, sendo que o sobrenadante contendo meio de cultura e os produtos ES produzidos foram retirados e armazenados a -20°C. Ao final da incubação, os sobrenadantes coletados foram agrupados em tubos de 50 mL e os parasitos armazenados a -20°C para a

produção do extrato protéico total. Todos os procedimentos feitos durante a cultura ocorreram em capela de fluxo laminar para evitar contaminação.

O meio de cultura coletado contendo os produtos ES produzidos pelos parasitos foi centrifugado por 10 min, 1500 x g, 4°C, para retirada de ovos, restos celulares ou outras partículas que pudessem estar em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo *Vivaspin 20 5kDa MWCO* (GE Healthcare) para concentração dos produtos ES, seguindo instruções do fabricante, até redução para 1-5% do volume inicial. Os produtos ES concentrados foram alíquotados em tubos de 1,5 mL e armazenados a -80°C até sua utilização.

4.11.3. Antígeno bruto de extrato protéico total de verme adulto de *A. ceylanicum*

O extrato protéico total de vermes adultos machos e fêmeas foi obtido através da maceração manual dos parasitos, com auxílio de pistilo de vidro, suspensos em 5-15 µL de PBS (pH 7,4) por verme, em tubos de microcentrífuga (1,5 mL). Em seguida, o extrato bruto foi sonificado utilizando aparelho de ultrassom (*Branson Sonc Power – Sonofer Cell Disruptor 450*), sendo realizados cinco ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos em banho de gelo, com amplitude de 40%, com posterior centrifugação a 3000 x g, 4°C, por 15 min. O sedimento foi descartado e o extrato bruto solúvel foi alíquotado em tubos de 1,5 mL e armazenado a -80°C até o seu uso.

4.11.4. ELISA - “Enzyme Lynked Immunosorbent Assay”

O plasma proveniente dos animais dos grupos CN, CI, DN e DI foram avaliados quanto à sua resposta de IgG total (anti-hamster) frente a antígenos de excreção/secreção (ES) e antígeno bruto de vermes adultos pela técnica de ELISA. Para isso, uma placa de microtitulação (Falcon) foi sensibilizada com 10 µg/mL de antígeno bruto de *A. ceylanicum* ou 50 µg/mL de ES em tampão carbonato/bicarbonato por 18 h, a 4°C. Após a lavagem com PBS 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05% (PBST 0,05%) foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com solução de PBST 0,05% e caseína 3%, a temperatura ambiente, por 90 min. Após nova lavagem o plasma dos hamsters foi utilizado diluído 1:100, e incubado por 18 h, a 4°C. Repetida a lavagem com PBST 0,05% foi adicionado o conjugado biotilado anti-IgG de hamster (BD) na diluição de 1:5000, incubado por 2h a 4°C. Após lavagem com PBST 0,05% foi adicionado a solução de estreptavidina diluída 1:3000 (Sigma) em PBST 0,05%. Incubado a temperatura ambiente por 20 min. Lavado pela última vez com PBST 0,05%. A revelação da reação foi feita utilizando o cromógeno

TMB (BD OptEIA®), após 10 min a reação foi parada utilizando ácido sulfúrico 2M. A absorbância lida em espectrofotômetro (Versamax Microplate Reader Tunable - Molecular Devices) a 492 nm. O cut-off (ponto de corte) foi determinado pela média das amostras negativas mais três vezes o desvio padrão.

4.12. Avaliação de parâmetros bioquímicos no plasma

4.12.1. Glicemia de jejum

Para a análise de glicemia de jejum, foram utilizadas as amostras de sangue que foram coletadas em tubos fluoretados. Esta análise foi feita utilizando o kit comercial de acordo com as recomendações do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.12.2. Proteínas totais e albumina

As concentrações de proteínas totais e de albumina no plasma foram medidas utilizando kits comerciais, de acordo com as instruções do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.12.3. Perfil lipídico sérico (triglicérides, colesterol total e HDL)

As concentrações de colesterol total, colesterol HDL e triglicérides séricos foram medidas utilizando kits comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.13. Avaliação do conteúdo lipídico e protéico no tecido hepático e muscular

Os lipídeos hepáticos e intramusculares foram extraídos com o uso de solventes orgânicos, de acordo com o método de Folch e colaboradores (1957), descrito a seguir.

Deve-se pesar 100 mg da amostra em tubo de ensaio. Outros tubos de ensaio (de vidro), equivalentes ao número de amostras, devem ser pesados e anotar o peso de cada um. Identificar cada tubo com a amostra correspondente. A amostra deve ser homogeneizada durante 3 min com 1900 µL de solução de clorofórmio: metanol (2:1). Depois, deve-se adicionar rapidamente 400 µL de metanol. Centrifugar em 3000 x g por 10 min. O sobrenadante deve ser virado no tubo limpo previamente pesado, desprezando o resto de tecido que fica do fundo. Ao sobrenadante acrescenta-se 800 µL de clorofórmio. Logo após, adiciona-se rapidamente 640 µL de solução de cloreto de sódio, NaCl 0,73% (o sobrenadante fica branco nesta etapa). Deve-se centrifugar novamente e centrifugar em 3000 x g por 10 min. A fase superior é desprezada. Depois, lava-se três vezes a parede interior de cada tubo com 600 µL, de cada vez, com solução

de Folch, que é composta por 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água destilada e 2% de NaCl 0,2%. Deve-se secar a solução obtida em estufa à 37°C e, por último, deve-se pesar o tubo novamente para saber a quantidade de lipídeos extraída pela diferença de peso.

Para dosar o colesterol dos lipídeos extraídos foi ressuspendido o conteúdo do tubo em 500 µL de isopropanol seguido por homogeneização no vórtex. A dosagem de colesterol foi realizada utilizando o kit comercial da marca Doles.

Para a dosagem de triglicérides a partir dos lipídeos extraídos, os lipídeos foram ressuspendidos em 500 µL de isopropanol para análise de fígado, conteúdo fecal cecal, ou em 200 µL de isopropanol, para análise do músculo gastrocnêmico. O tubo contendo o isopropanol foi homogeneizado no vórtex e a dosagem realizada utilizando o kit comercial da marca Doles, de acordo com as orientações do fabricante.

4.13.1. Perfil lipídico (triglicérides e colesterol total)

As concentrações de triglicérides e colesterol total no tecido hepático e no músculo gastrocnêmio foram medidas utilizando kits comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.13.2. Proteínas totais no tecido hepático

As concentrações de proteínas totais no tecido hepático e no músculo gastrocnêmio foram medidas utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.14. Avaliação de lipídeos e proteínas no conteúdo cecal

Os lipídeos do conteúdo cecal foram extraídos com o uso de solventes orgânicos, de acordo com o método de Folch e colaboradores (1957), descrito anteriormente.

4.14.1. Perfil lipídico (triglicérides e colesterol total)

As concentrações triglicérides e colesterol total no conteúdo cecal foram medidas utilizando kits comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.14.2. Proteínas totais

As concentrações de proteínas totais no conteúdo cecal foram medidas utilizando kits comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante (Doles Liquiform, da Labtest Diagnóstica, Brasil).

4.15. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados gerados foi utilizado o *software* Graph Pad Prism 5. Para verificar a distribuição dos dados, foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov.

As análises entre dois grupos foram feitas com os métodos estatísticos teste T pareado ou não-pareado (dados paramétricos) e Wilcoxon Matched Pairs ou Mann e Whitney (dados não-paramétricos). Para análise de três ou mais grupos, os dados foram submetidos aos testes ANOVA ou Reapeated Measures ANOVA seguido do de Tukey (dados paramétricos) e Kruskal-Wallis ou Friedman seguido do teste de Dunns (dados não-paramétricos). Foi utilizado o teste de Grubbs para dectectar outliers.

Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Sobrevivência e comportamento dos animais

O N inicial do experimento foi de 10 hamsters por grupo, ao final do experimento os números de animais por grupo foram de: controle negativo (CN) 5 animais, o controle infectado com *A. ceylanicum* (CI) 6 animais, o grupo desnutrido negativo (DN) 10 animais e o desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI) 7 animais. Os animais que foram submetidos à dieta hipoprotéica ficaram visivelmente mais magros e abatidos em relação aos animais dos grupos controle. A maioria dos animais infectados apresentou diarreia a partir da 2ª semana de infecção, e os hamsters desnutridos apresentaram diarreias mais intensas.

Durante todo o período experimental os hamsters submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram um comportamento anormal em relação aos animais que receberam dieta controle. Esses animais roeram repetidamente as grades da gaiola, Este fato ocorreu em todas as gaiolas com dieta hipoprotéica, em maior ou menor intensidade.

5.2. Avaliação do consumo de ração e água

A partir destes dados, pode-se observar que os animais desnutridos, a partir da 3ª semana do experimento ingeriram menos ração em comparação aos animais normonutridos, porém esta diferença não pode ser comprovada estatisticamente, pois os dados representados nos gráficos são referentes às médias de consumo dos animais de cada grupo e, por este motivo, não foi possível fazer os cálculos estatísticos. Pode-se observar também que os animais desnutridos e infectados consumiram um pouco mais de ração do que os não infectados.

Na ingestão de água pode-se observar uma situação inversa, a partir da 3ª semana do experimento os animais desnutridos tiveram uma tendência em beber mais água em relação aos animais normonutridos, o que também não pode ser comprovado estatisticamente, e o grupo CI ingeriu menos água em relação ao grupo CN, a partir da data da infecção, e o mesmo ocorreu com o grupo DI, que passou a ingerir menos água em comparação ao grupo DN a partir da 6ª semana do experimento (Gráficos 1 e 2).

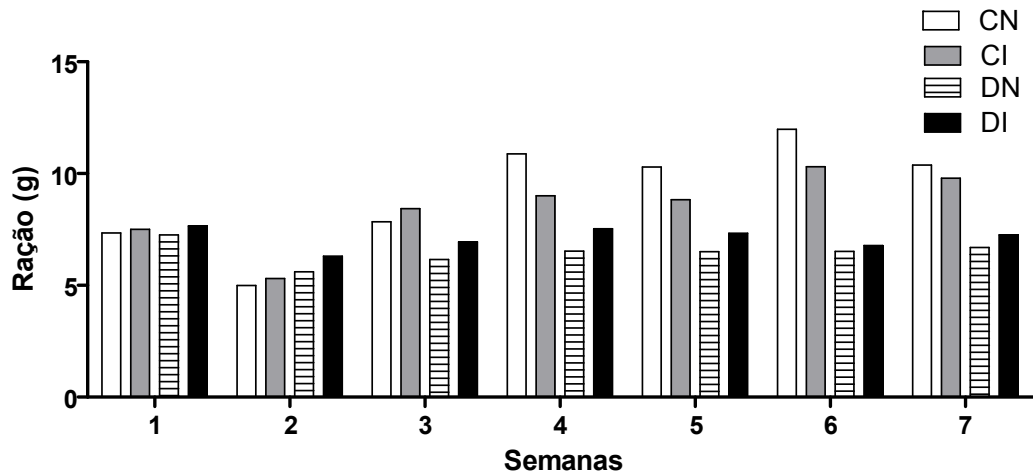


Gráfico 1: Consumo de ração em gramas/animal/dia durante o experimento.

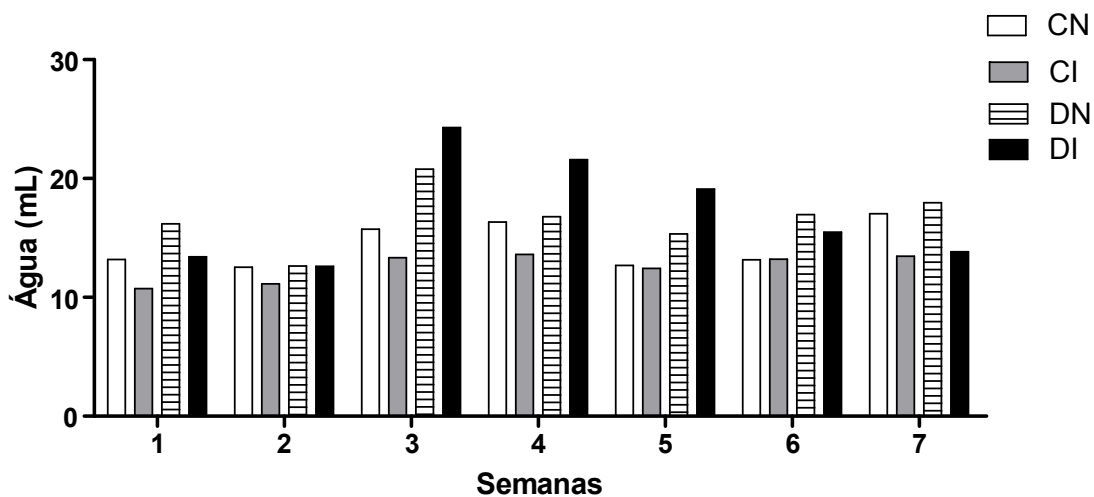


Gráfico 2: Consumo de água em mililitros/animal/dia durante o experimento.

5.3. Aspecto clínico: peso

Pode-se observar que durante o experimento houve uma diferenciação dos pesos principalmente entre os grupos que tiveram uma alimentação controle (normonutridos) e os grupos alimentados com dieta hipoprotéica (desnutridos), onde ocorreu maior ganho de peso dos animais dos grupos normonutridos (CN e CI) em relação aos grupos desnutridos (DN e DI), (Gráfico 3 A, C e D). O peso médio de todos os animais no início do experimento foi de 82,67 +/-7,60 g. Após 28 dias da indução das dietas específicas, o peso médio dos grupos normonutridos, foi de 102,60 +/-13,26 g e o peso médio dos grupos desnutridos de 80,71 +/- 8,64 g, ($p < 0,001$).

No final do experimento os pesos médios para cada grupo foram: controle negativo (CN) 124,20 +/- 22,14 g; controle infectado (CI) 117,20 +/- 2,95 g; desnutrido negativo (DN) 81,30 +/- 9,80 g e desnutrido infectado (DI) 78,86 +/- 9,62 g. Na pesagem final dos animais pode-se observar um aumento significativo de peso, em gramas, do grupo CN em relação ao grupo DN ($p < 0,01$) e também do grupo CI em relação ao grupo DI ($p < 0,05$), (Gráfico 3 B). Demonstrando que a perda de peso observada foi devida ao estado nutricional do hospedeiro independente da infecção.

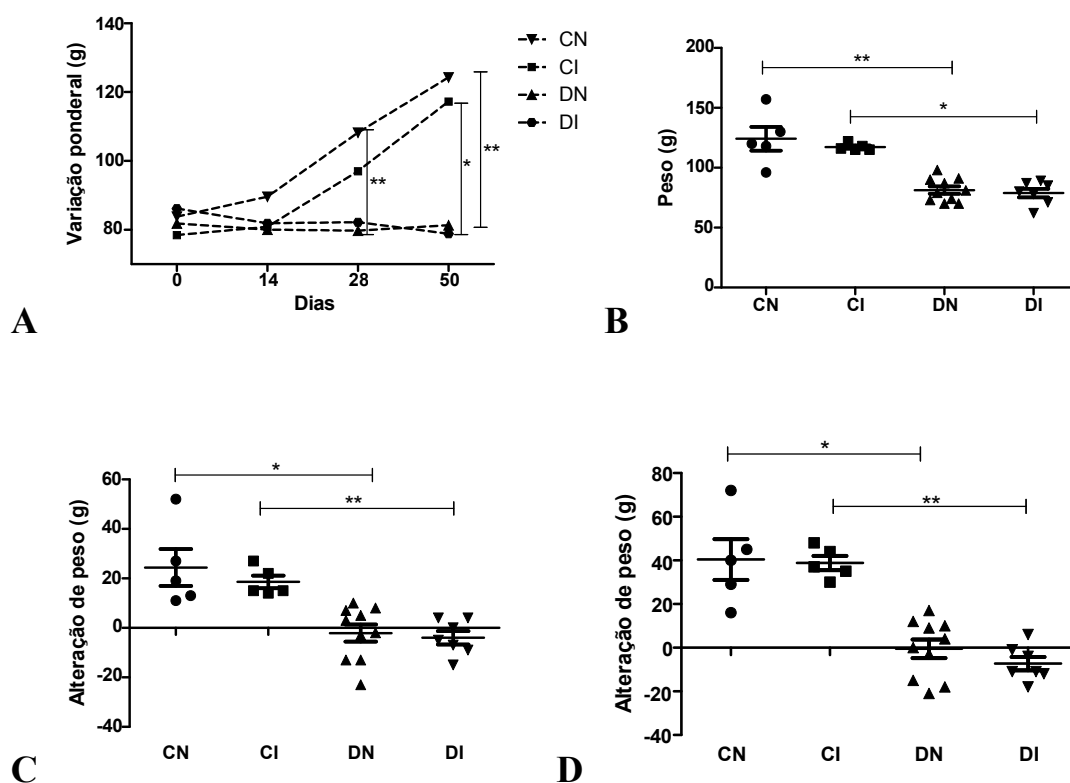


Gráfico 3: (A) Variação ponderal em gramas das médias de peso dos grupos de hamsters submetidos às dietas controle ou hipoprotéica durante o período experimental; (B) Peso final em gramas dos grupos de hamsters submetidos às dietas controle ou hipoprotéica; (C) Alteração de peso em gramas dos grupos de hamsters após 28 dias de experimento; (D) Alteração de peso em gramas dos grupos de hamsters após 50 dias de experimento. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5.4. Índice de adiposidade visceral e índice de massa magra

Foram avaliados os índices de adiposidade visceral e índice de massa magra para todos os grupos (Gráfico 4 A e B).

O índice de adiposidade visceral mostrou aumento significativo para o grupo DI em relação ao grupo CI ($p < 0,01$). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas.

No cálculo do índice de massa magra observou-se que o grupo CN apresentou valores maiores, em gramas, em relação ao grupo DN ($p < 0,01$); e o grupo CI apresentou valores significativamente maiores de índice de massa magra em relação ao grupo DI ($p < 0,05$), indicando que a dieta hipoprotéica acarretou perda de massa magra.

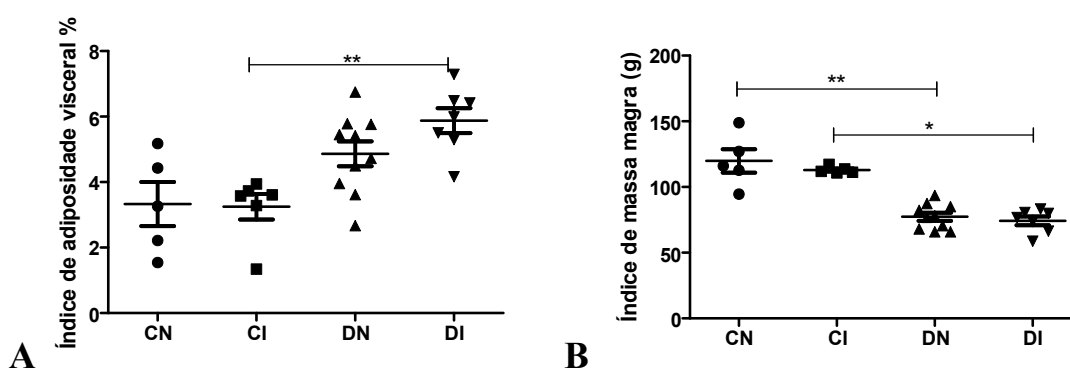


Gráfico 4: (A) Índice de adiposidade visceral (%) após 50 dias de experimento; (B) Índice de massa magra (g) após 50 dias de experimento. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). $n = 5 / 6 / 10 / 7$ hamsters por grupo, respectivamente. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5.5. Parâmetros parasitológicos

5.5.1. Exame de fezes: técnica de OPG

A quantidade de ovos por grama de fezes em 21dpi foi significativamente maior no grupo DI em relação ao grupo CI (Gráfico 5).

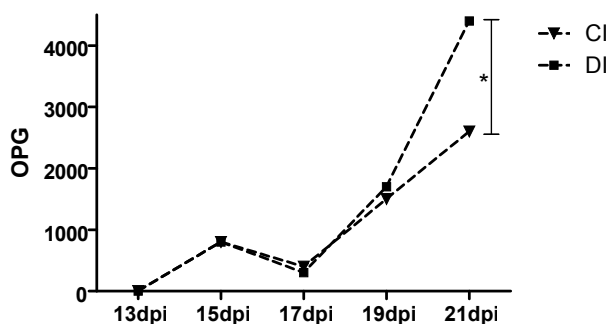


Gráfico 5: Eliminação de ovos de *A. ceylanicum* por grama de fezes (OPG). Grupos controle infectado (CI) e desnutrido infectado (DI) a partir do 13º dpi (dia pós-infecção) até o dia 21º dpi. * = $p < 0,05$.

5.5.2. Recuperação de vermes adultos

Observou-se um aumento significativo no número de vermes adultos recuperados de cada animal no grupo desnutrido infectado (DI) em relação ao grupo controle infectado (CI) (Gráfico 6 e Tabela 1).

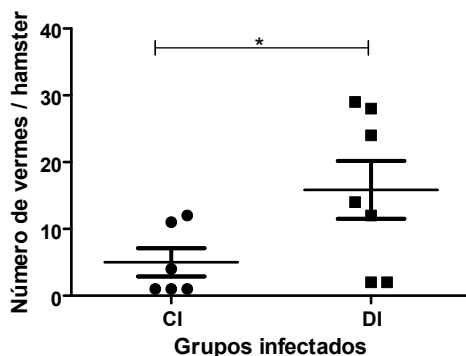


Gráfico 6: Número de vermes adultos da *A. ceylanicum* recuperados por intestino delgado de cada hamster. Grupos controle infectado (CI) e desnutrido infectado (DI). Eutanásia realizada aos 22 dpi. * = $p < 0,05$. $n = 6 / 7$ hamsters por grupo, respectivamente.

Tabela 1: Quantidade de vermes adultos fêmeas e machos recuperados dos grupos controle e desnutrido e número total dos parasitos após 22 dias de infecção.

<i>Grupos</i>	<i>Número de hamster/grupo</i>	<i>Número de fêmeas</i>	<i>Número de machos</i>	<i>Número total</i>
CI	06	18	12	30
DI	07	52	48	100

Tabela 2: Média de vermes adultos fêmeas e machos recuperados por animal e a frequência relativa de recuperação em relação à quantidade ao número de larvas infectantes (50 L3), dos grupos CI e DI.

<i>Grupos</i>	<i>Número de hamsters</i>	<i>Média de fêmeas</i>	<i>Média de machos</i>	<i>Nº total de parasitos</i>	<i>Frequência Relativa* (%)</i>
CI	06	03	02	05	10
DI	07	07	06	13	26

* em relação ao número de larvas infectantes (50 L3).

5.5.3. Taxa de fecundidade das fêmeas

A taxa de oviposição das fêmeas do grupo CI foi de 144 OPG/fêmea e do grupo DI foi de 85 OPG/fêmea. Portanto, o grupo CI apresentou valores de taxa de fecundidade das fêmeas 70% maior em relação ao grupo DI (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados de OPG (ovos por grama de fezes), dos grupos controle e desnutrido, número de fêmeas recuperadas em cada grupo com suas respectivas Taxas de oviposição em relação ao número de fêmeas encontradas 22 dpi.

<i>Grupos</i>	<i>OPG</i>	<i>Número de fêmeas</i>	<i>Taxa de oviposição</i>
Controle (CI)	2600	18	144
Desnutrido (DI)	4400	52	84

5.6. Hemograma

5.6.1. Série vermelha

As análises hematológicas, após 50 dias de experimento, mostraram diminuição de hemoglobina do grupo DI em relação ao grupo DN ($p < 0,05$), demonstrando que a desnutrição agravou a patogenia causada pela infecção (Gráfico 7 A). Do mesmo modo, após 50 dias, pode-se observar diminuição de eritrócitos no grupo DI ($p < 0,001$) em relação ao grupo DN, mostrando que a infecção provocou a diminuição da quantidade de eritrócitos encontrada no sangue, e a desnutrição agravou a perda de eritrócitos durante a infecção (Gráfico 7 B). Após 50 dias de experimento, o grupo DI apresentou diminuição dos valores de volume globular (%) em relação ao grupo DN ($p < 0,05$), demonstrando que a infecção agravou a diminuição do volume globular durante a desnutrição (Gráfico 7 C).

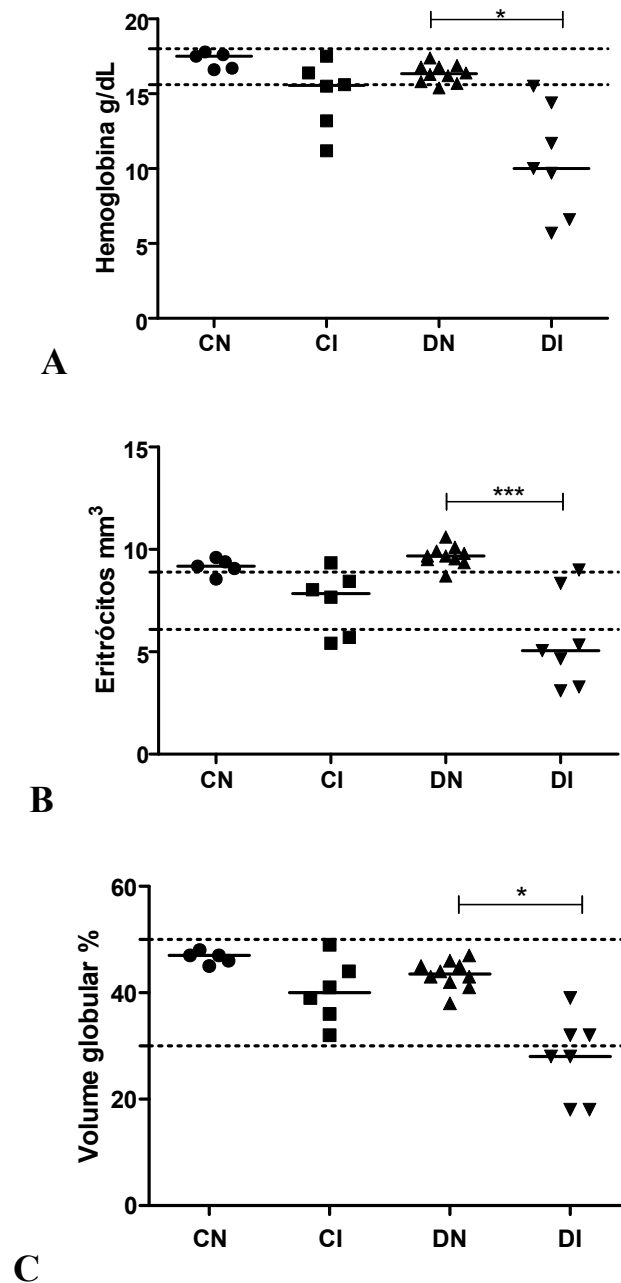


Gráfico 7: Hemograma de hamsters realizado após 50 dias de experimento. (A) Níveis de hemoglobina em grama por decilitro; (B) Contagem global de eritrócitos por milímetros cúbicos; (C) Volume globular em porcentagem. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). Linha pontilhada: valores fisiológicos para hamster de acordo com Mitruka e Rawnsley (1981). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. * = p<0,05; *** = p<0,001.

5.6.2. Série branca: contagem global de leucócitos

A contagem global de leucócitos não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais (Gráfico 8).

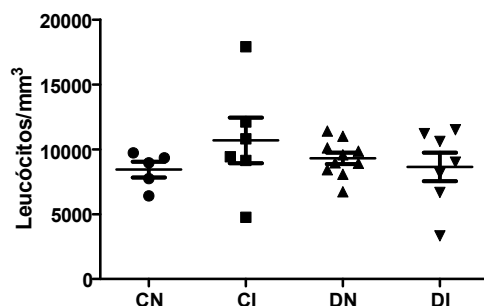


Gráfico 8: Contagem global de leucócitos. Valores em milímetro cúbico de sangue de hamsters após 50 dias de experimento. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo.

5.6.3. Série branca: contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos mostrou um quadro de eosinofilia para todos os grupos avaliados, especialmente para o grupo CI ($p < 0,05$), (Gráfico 9 A).

O número de linfócitos, monócitos e neutrófilos circulantes não apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais (Gráficos 9 B, C e D).

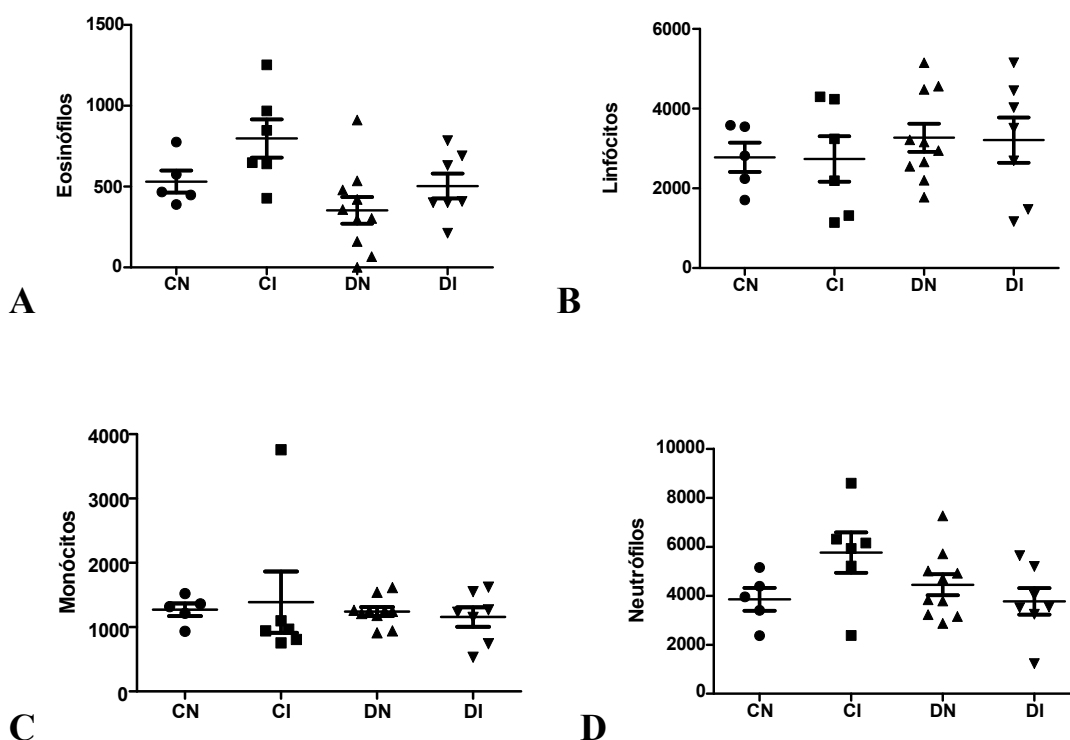


Gráfico 9: Contagem diferencial de leucócitos. (A) Eosinófilos; (B) Linfócitos; (C) Monócitos; (D) Neutrófilos. Valores em milímetro cúbico de sangue de hamsters após 50 dias de experimento. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente.

5.7. Resposta imune humoral

Os plasmas dos hamsters, infectados e não-infectados dos grupos normonutridos e desnutridos, obtidos aos 50 dpi foram testados para avaliar os níveis de IgG total frente aos extrato bruto e aos antígenos de excreção e secreção (produtos ES) de *A. ceylanicum*. Os valores de absorbância obtidos podem ser visualizados nos gráficos 10 A e B.

O grupo CI apresentou aumento da resposta imunológica em relação ao grupo DI, frente a ambos os antígenos ($p < 0,01$).

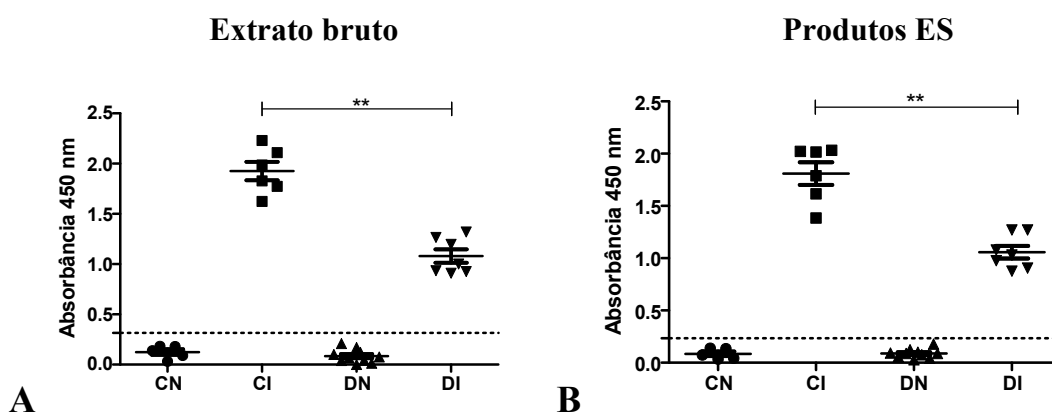


Gráfico 10: Níveis de IgG total em plasma de hamsters frente aos antígenos: (A) Extrato bruto de *A. ceylanicum*; (B) Produtos ES. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). Linha pontilhada: cut-off. Plasma obtido aos 22 dpi. $n = 5 / 6 / 10 / 7$ hamsters por grupo, respectivamente. ** = $p < 0,01$.

5.8. Parâmetros bioquímicos no plasma

5.8.1. Glicose, proteínas totais e albumina

Os valores de glicose encontrados em todo o período do experimento não apresentaram diferença significativa entre os grupos, mostrando que tanto o estado de desnutrição quanto a infecção não apresentaram variações significativas neste parâmetro, porém vale a pena destacar que foi observada uma diminuição dos níveis de glicose entre os grupos CN e DN (Gráfico 11 A).

No final do experimento, observou-se uma diminuição significativa na quantidade de proteínas totais no sangue dos animais do grupo DN em relação aos animais dos grupos CN ($p < 0,05$), mostrando que a desnutrição protéica foi um fator determinante para a diminuição de proteínas no plasma (Gráfico 11 B).

Os valores de albumina encontrados em todo o período do experimento não apresentaram diferença significativa entre os grupos, mostrando que tanto o estado de

desnutrição quanto a infecção não causaram variações significativas neste parâmetro durante o tempo do experimento (Gráfico 11 C), porém observou-se uma leve tendência na diminuição dos valores de albumina dos grupos desnutridos (DN e DI) em relação aos grupos normonutridos (CN e CI).

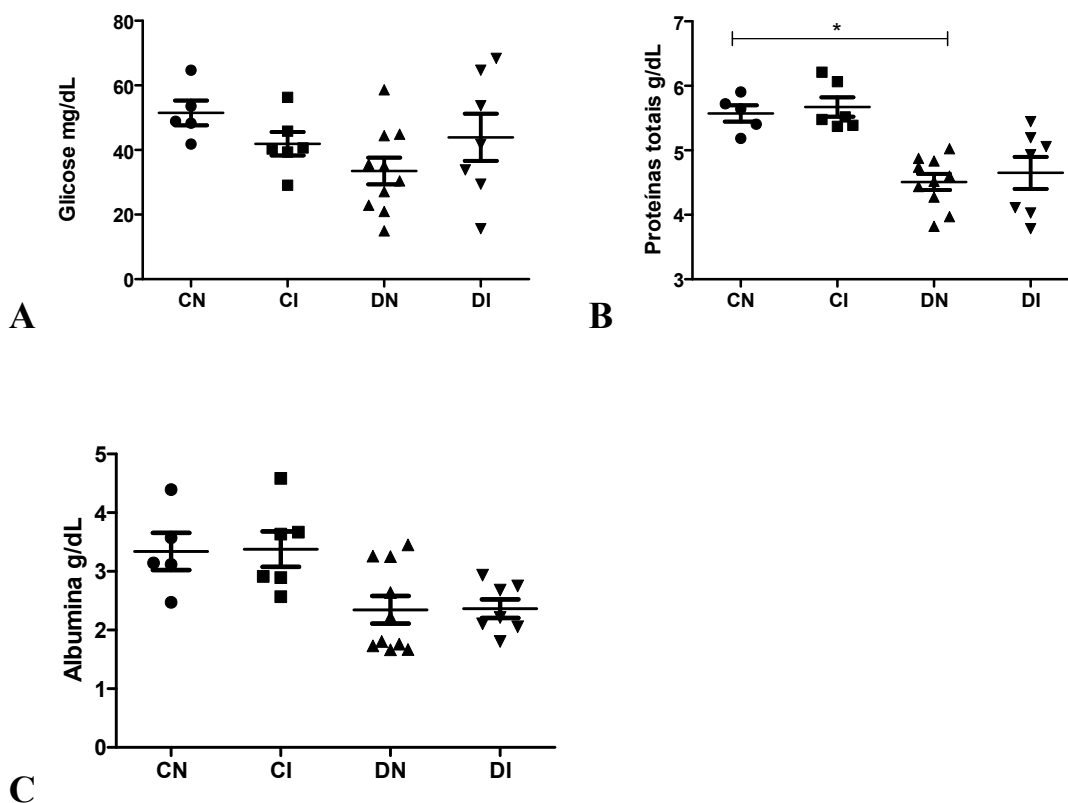


Gráfico 11: Parâmetros bioquímicos no plasma dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Glicose em miligrama por decilitro; (B) Proteínas totais em grama por decilitro; (C) Albumina em grama por decilitro. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. * = p<0,05.

5.8.2. Perfil lipídico sérico

A análise de triglicérides realizada 50 dias após o início do experimento apresentou diferença estatística entre o grupo DI, onde ocorreu aumento da concentração plasmática de triglicérides em relação ao grupo DN (p<0,01), (Gráfico 12 A).

As análises de colesterol total e colesterol HDL do plasma, também realizadas no final do experimento, não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Gráficos 12 B e C).

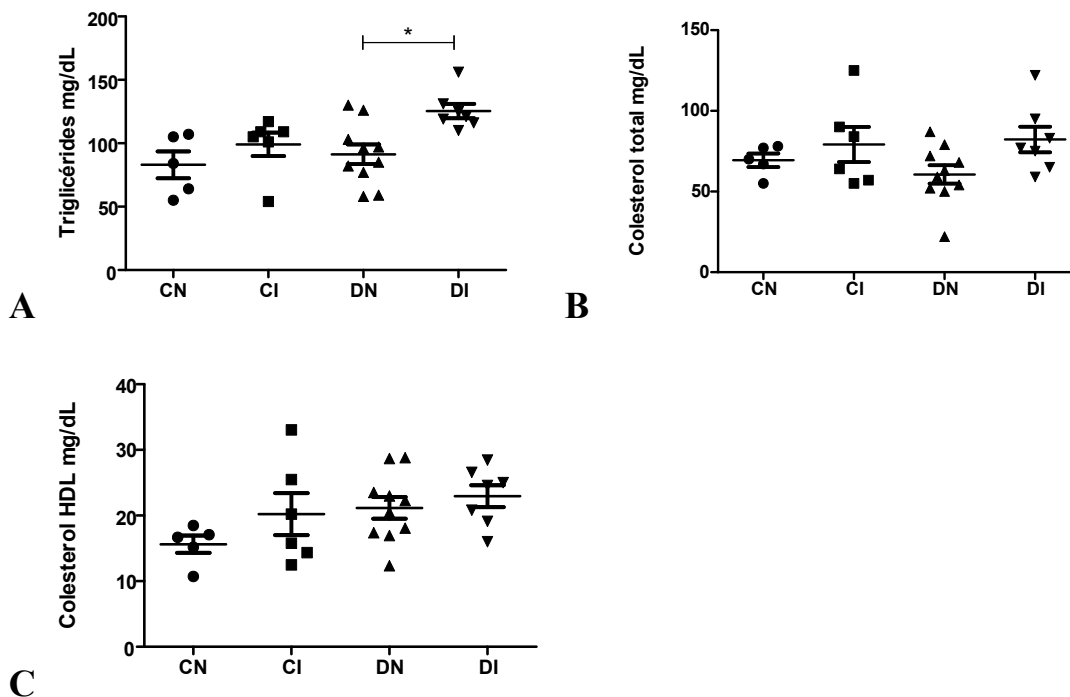


Gráfico 12: Parâmetros bioquímicos no plasma dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Triglicérides em miligrama por decilitro; (B) Colesterol total em grama por decilitro; (C) Colesterol HDL em miligrama por decilitro. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. * = $p < 0,05$.

5.9. Avaliação do conteúdo lipídico e protéico no tecido hepático

O grupo DN apresentou aumento significativo da quantidade de triglicérides no fígado em relação ao grupo CN ($p < 0,01$). Os animais desnutridos e infectados não apresentaram diferença estatística se comparado aos demais grupos (Gráfico 13 B).

O grupo DI apresentou aumento significativo de colesterol no fígado em relação ao grupo DN ($p < 0,001$), mostrando a influência da infecção na deposição de colesterol no fígado dos animais desnutridos e infectados (Gráfico 13 C).

As quantidades de lipídeos (Gráfico 13 A) e proteínas totais (Gráfico 13 D) no tecido hepático não mostraram diferença estatística entre os grupos experimentais.

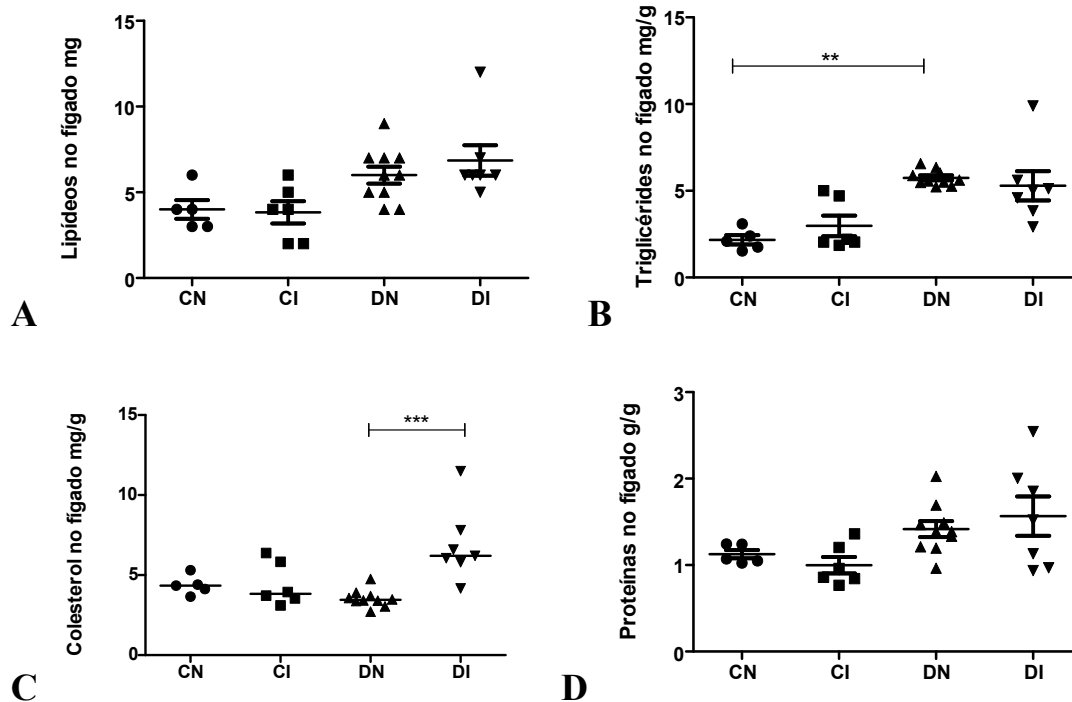


Gráfico 13: Teor lipídico e protéico no tecido hepático dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Lipídeos no fígado em miligramas; (B) Triglicérides no fígado em miligrama por grama; (C) Colesterol no fígado em miligrama por grama; (D) Proteínas totais no fígado em grama por grama. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. ** = p<0,01; * = p<0,001.**

5.10. Avaliação do conteúdo lipídico no músculo gastrocnêmio

A desnutrição favoreceu o acúmulo ectópico de lipídeos no músculo gastrocnêmio. Pode-se observar um aumento na quantidade de lipídeos extraída deste tecido no grupo DN em relação ao grupo CN (p<0,05), (Gráfico 14 A). Da mesma forma, as quantidades de triglicérides (p<0,01) e de colesterol (p<0,05) extraídas do músculo gastrocnêmio foram significativamente maiores no grupo DN em relação ao grupo CN, mostrando que a desnutrição favoreceu o acúmulo ectópico de triglicérides e de colesterol no músculo gastrocnêmio (Gráfico 14 B e C).

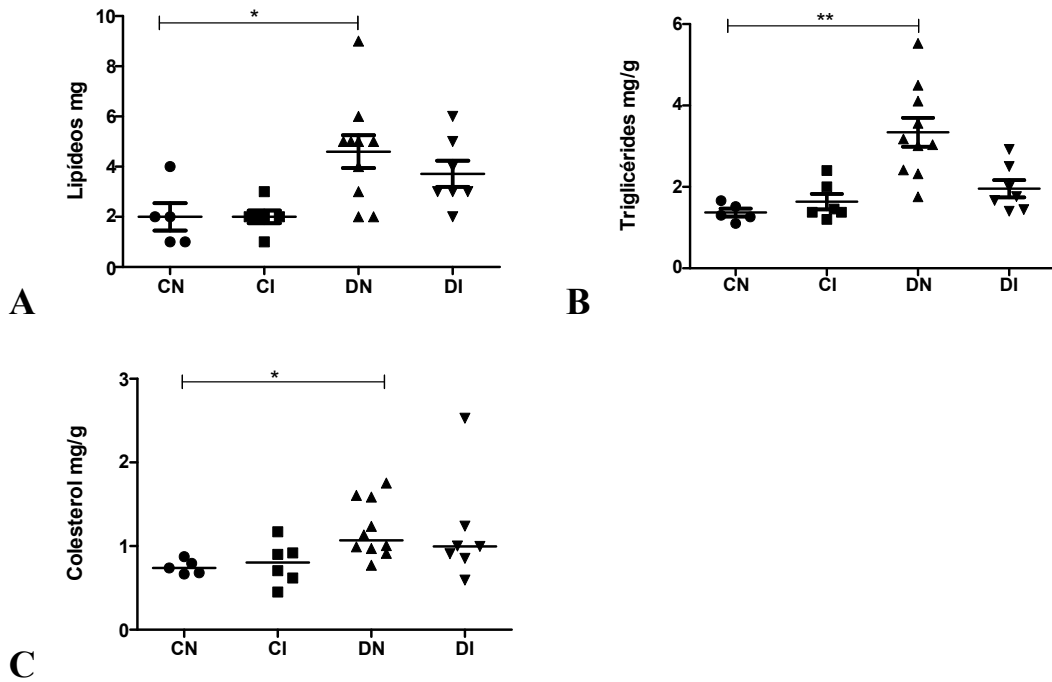
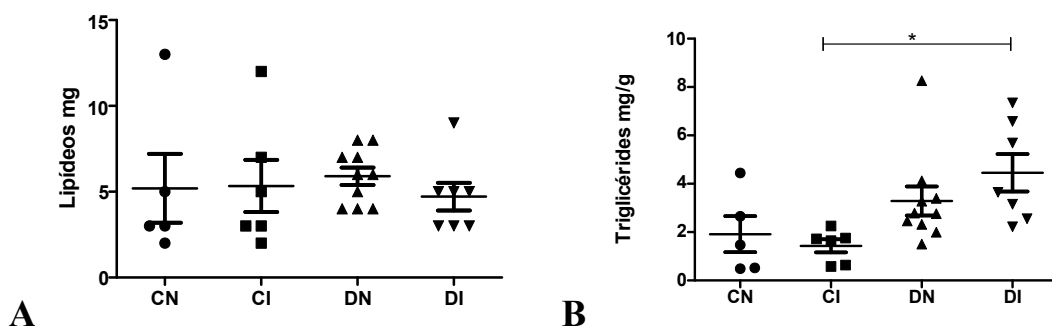


Gráfico 14: Teor lipídico no músculo gastrocnêmio dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Lipídeos em miligramas; (B) Triglicérides em miligrama por grama; (C) Colesterol em miligrama por grama. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5.11. Avaliação de lipídeos e proteínas no conteúdo cecal

As quantidades de lipídeos totais (Gráfico 15 A) e de proteínas totais (Gráfico 15 D) no conteúdo cecal não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Porém observou-se um aumento nas quantidades de triglicerídeos (Gráfico 15 B) e colesterol (Gráfico 15 C) excretados nas fezes pelo grupo DI em relação ao grupo CI ($p < 0,05$), em ambos os casos.



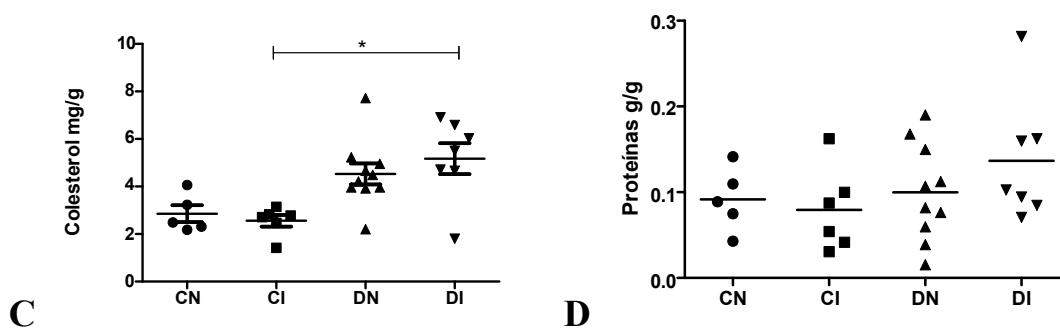


Gráfico 15: Teor de lipídeos e proteínas no conteúdo cecal dos hamsters após 50 dias de experimento. (A) Lipídeos em miligramas; (B) Triglicérides em miligrama por grama; (C) Colesterol em miligrama por grama; (D) Proteínas totais em grama por grama. Grupo controle negativo (CN), controle infectado com *A. ceylanicum* (CI), desnutrido negativo (DN) e desnutrido infectado com *A. ceylanicum* (DI). n= 5 / 6 / 10 / 7 hamsters por grupo, respectivamente. * = p<0,05.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Os ancilostomídeos são a principal causa de anemia nos países em desenvolvimento (Bungiro et al. 2001). As estimativas assumem que a maioria dos casos de ancilostomose não resulta em anemia grave ou perda de proteína no hospedeiro, porém casos de infecções persistentes ou re-infecções resultam em desnutrição e comprometimento do desenvolvimento cognitivo, principalmente em crianças (Bethony et al. 2006).

A condição nutricional de determinada população está fortemente relacionada com: fatores socioeconômicos, padrão alimentar da população, frequência de ingestão de alimentos de origem animal e produtos lácteos e com a quantidade de dinheiro gasto com alimentação por pessoa por dia. Como a desnutrição energético-proteica é considerada a doença nutricional mais prevalente em países em desenvolvimento, a avaliação do consumo de proteínas é essencial para a prevenção, diagnóstico e tratamento da desnutrição (Gosh et al. 2012). Um exemplo disso foi mostrado por Clarke e colaboradores (2006) que verificaram redução significativa na concentração de albumina no soro de crianças subnutridas em comparação a crianças bem nutridas.

Já foi relatado que nutrientes como ferro, vitamina B12, ácido fólico e proteínas são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do cérebro e a deficiência desses nutrientes leva ao comprometimento substancial das funções cognitivas, tais como a competência intelectual, capacidade de aprender em crianças e funções neuromusculares (Liu et al. 2003).

A desnutrição é a causa primária de imunodeficiência em todo o mundo, sendo bebês, crianças, adolescentes e idosos os mais afetados. Há uma forte relação entre desnutrição, infecção (pneumonia, malária, diarreia, sarampo e AIDS) e mortalidade infantil, pois a má nutrição deixa as crianças enfraquecidas, abaixo do peso e vulneráveis a infecções, principalmente por alterarem a integridade epitelial e causarem inflamação. Sabe-se que crianças não parasitadas apresentam melhor estado nutricional, crescimento mais rápido, aprendem mais, e são menos suscetíveis a infecções do que as crianças com parasitoses (Katona & Katona-apte 2008).

A desnutrição pode deixar uma pessoa mais suscetível à algum tipo de infecção e no caminho inverso as infecções também contribuem para agravar os quadros de desnutrição, o que provoca um círculo vicioso. Uma dieta inadequada leva à perda de peso, diminuição da imunidade, lesão nas mucosas, maior suscetibilidade a invasão por

patógenos e comprometimento do crescimento e desenvolvimento cognitivo em crianças (Katona & Katona-apte 2008).

Um estudo de infecção de *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos mostrou que animais alimentados com dietas deficientes em proteínas e calorias, apresentaram diminuição da concentração de albumina plasmática e em alguns casos, edema causado por hipoproteinemia, em relação aos animais alimentados com dietas balanceadas (Lunn & Northrop-Clewes 1993).

Nesse contexto, o presente estudo procurou avaliar como a dieta hipoprotéica influencia no curso da infecção por *A. ceylanicum*, e para isso, parâmetros nutricionais foram avaliados, como por exemplo, o consumo de água e ração dos grupos, o ganho ou perda de peso dos animais, de acordo com suas dietas específicas e, principalmente, os parâmetros parasitológicos, hematológicos e bioquímicos nas condições de baixa concentração de proteína na dieta (6,0%) em comparação com quantidades ideais deste mesmo nutriente (25,0%). Todos estes parâmetros foram comparados também na presença ou ausência de infecção pelo *A. ceylanicum*.

Neste estudo, os animais desnutridos ingeriram menor quantidade de ração do que os normotridos, o que mostra que mesmo estando com déficit nutricional, estes animais não aumentaram a ingestão de alimentos. Em modelos experimentais, observa-se que o parasitismo pode levar a diminuição do apetite (Crompton 1984). A anorexia observada, devido à presença de parasitos, já foi demonstrada em camundongos infectados por *Heligmosomoides bakeri* (Coltherd et al. 2009). Também existem estudos relacionando parasitos intestinais a uma redução na ingestão de alimentos, má absorção, perda de nutrientes endógenos, e anemia (Katona & Katona-apte 2008).

Pode-se observar também que os animais desnutridos infectados consumiram um pouco mais de ração do que os desnutridos não-infectados, e isto pode ter ocorrido devido à maior demanda de nutrientes para o desenvolvimento de uma resposta imunológica adequada, ou devido a uma maior espoliação sofrida pelo hospedeiro em decorrência da presença do parasito.

Em um estudo utilizando camundongos de *background* genético categorizados entre “alto” e “baixo” peso corporal, foi observada redução no ganho de peso corporal nos camundongos de “alto peso” devido ao baixo teor em proteínas na dieta (Coltherd et al. 2011). O ganho de peso foi ainda mais reduzido quando os animais foram infectados com um inóculo maior que 150 L3 de *Heligmosomoides bakeri*. Em contraste, o ganho de peso dos camundongos de “baixo peso” não foi afetado pela infecção. Enquanto não

infectados, os de “baixo peso” que receberam dieta com baixo teor de proteínas, ganharam mais peso do que os seus pares que receberam dieta com alto teor de proteínas (Coltherd et al. 2011). Este ganho de peso nos de “baixo peso” foi associado a um maior consumo de ração na dieta pobre em proteínas, em comparação com a dieta rica em proteínas, que foi provavelmente o resultado de tentativas bem sucedidas para aumentar a ingestão de proteínas a partir de uma dieta pobre em proteínas (Kyriazakis et al. 1991). Estes resultados não são concordantes com os resultados encontrados no presente trabalho. Entretanto, os modelos em estudo são diferentes.

Neste estudo não observamos uma relação entre ingestão de alimento, água e peso dos animais e a infecção por *A. ceylanicum*, mas, apesar disso, é importante ressaltar que os animais submetidos a dieta hipoprotéica (infectados ou não) ingeriram, ao longo de todo período observado, menos ração e mais água. Porém, quando observamos a variação de peso de todos os grupos ao longo do período, é verificado que os animais submetidos à dieta hipoprotéica mantiveram o peso ao invés de sofrerem perda de peso, o que seria esperado devido à menor ingestão de comida. Ao contrário, o grupo normonutrido aumentou consideravelmente de peso (cerca de 40%) ao longo do tempo. A variação de peso dos animais do nosso experimento ocorreu devido ao estado nutricional, independente de estarem ou não infectados. Isto pode ter ocorrido devido ao curto período de tempo em que os animais ficaram expostos à infecção.

O aumento do índice de adiposidade visceral dos animais desnutridos, principalmente do grupo DI, pode ter ocorrido como consequência da maior concentração de carboidratos presentes na dieta hipoprotéica em relação à dieta controle, apesar de serem isocalóricas. Este excesso de carboidratos se não metabolizados na forma de exercícios, tende a se acumular na forma de lipídeos, uma vez que o consumo de energia em excesso deve ser perdido como calor ou armazenado como gordura (Emmans & Kyriazakis 2000). Pode-se observar um aumento nas quantidades de lipídeos, triglicérides e colesterol no músculo gastrocnêmio dos animais do grupo DN em relação ao grupo CN, mostrando que a desnutrição favoreceu o acúmulo ectópico de lipídeos no tecido muscular. Resultados semelhantes foram observados nos experimentos com camundongos onde uma porcentagem mais elevada de gordura corporal foi observada em animais que receberam dieta com baixo teor protéico, em comparação com camundongos que receberam dieta com alto teor protéico (Coltherd et al. 2011). Por outro lado foi observada diminuição do índice de massa magra para os animais desnutridos em relação aos normonutridos. Estes dados

corroboram com estudos que mostram que durante a desnutrição protéica, o tecido muscular é degradado para proporcionar aminoácidos que serão utilizados na gliconeogênese que ocorre no fígado (Biolo et al, 2002). As células musculares, compostas por proteínas estruturais e funcionais, são sensíveis à deficiência protéica, e pode-se observar diminuição de massa magra nestas condições (Ihemelandu 1985; Parada-Simão 2011).

Nos experimentos aqui apresentados, a suscetibilidade do hospedeiro ao parasitismo, foi medida pela análise da carga parasitária e dos ovos eliminados durante a infecção. Pode-se observar que a dieta hipoprotéica prejudicou o organismo na resposta à infecção pelo *A. ceylanicum*, favorecendo o estabelecimento de maior quantidade de vermes no intestino, se comparados ao grupo controle infectado.

A quantidade encontrada de ovos por grama de fezes em 21 dpi foi significativamente maior no grupo DI em relação ao grupo CI. Estes achados confirmam que os animais do grupo desnutrido infectado estão mais suscetíveis à parasitose, apresentam maior carga parasitária e, conseqüentemente apresentaram maior quantidade de ovos por grama de fezes.

Apesar do grupo DI apresentar maior número de parasitos recuperados, a taxa de fecundidade das fêmeas deste grupo foi 70% menor em relação ao grupo CI, isto pode ter ocorrido devido ao estado nutricional debilitado do hospedeiro no grupo desnutrido, pela escassez de nutrientes e pela competição intra-específica do parasito, que pode limitar os recursos para o desenvolvimento natural de parasitos adultos e conseqüentemente, para a produção de ovos pelas fêmeas.

Para parasitos gastrintestinais, a relação entre a densidade de parasitos e a liberação de ovos nas fezes é normalmente inversa, ou seja, quando a densidade da população de parasitos aumenta, a sobrevivência e a fecundidade do verme diminuem (Bishop & Stear, 2000; Bleay et al. 2007). Outros trabalhos também já demonstraram uma produção reduzida de ovos por parasitos gastrintestinais em animais alimentados com dietas de baixo teor protéico (Athanasiadou et al. 2001; Coltherd et al. 2009). Um estudo utilizando ovinos infectados com *H. contortus* e alimentados com uma dieta de baixo valor protéico, demonstrou que esses animais apresentaram sinais clínicos mais graves que ovinos mantidos com dieta adequada de proteínas. No entanto, as contagens de ovos fecais, taxa de oviposição e quantidade de vermes adultos recuperados foram semelhantes em ambos os grupos (Martínez-Valadares et al. 2005).

Estudos realizados no Instituto de Nutrição da América Central do Panamá

mostraram que a absorção de proteínas em crianças com diarreia é geralmente reduzida de 10-30%, chegando até a 40% (Scrimshaw et al. 1991). No nosso estudo, os animais desnutridos e infectados apresentaram quadros de diarreias mais intensos do que os animais normonutridos infectados, provavelmente devido à carga parasitária mais elevada.

Camundongos infectados com *N. brasiliensis* desenvolveram uma resposta local inflamatória na mucosa intestinal, com espessamento, achatamento e atrofia parcial das vilosidades, também apresentaram alargamento das criptas e infiltrado inflamatório celular na lâmina própria e nos enterócitos (Moqbel & MacDonald 1990). Trabalho semelhante também já foi relatado para hamsters infectados por *A. ceylanicum*, o qual demonstra atrofia das vilosidades, perda de mucosa e de células epiteliais no intestino de hamsters infectados (Dias et al. 2012). Estas alterações na mucosa intestinal podem dificultar a absorção de nutrientes, agravando o quadro de desnutrição do hospedeiro.

A contagem de hemácias, a concentração de hemoglobina e o volume celular são comumente utilizados para descrever anemias nutricionais. Em alguns casos, os valores do volume celular também têm sido considerados como um parâmetro útil juntamente com nível de hemoglobina e para a definição de anemia por deficiência de ferro (Lee & Nieman 2007). Apesar disso, estudos sugerem que a concentração de Hb em crianças não parece ter associação significativa com o seu estado nutricional, que é determinado principalmente por valores da relação altura/peso para a idade (Gosh et al. 2012). Neste trabalho, não observamos qualquer alteração nos parâmetros hematológicos de animais desnutridos em relação aos normonutridos. Apesar disso, observamos que houve uma piora em todos os parâmetros relacionados à anemia em animais do grupo DI em relação ao grupo normonutrido infectado (CI). Houve também diminuição de hemoglobina, eritrócitos e de volume globular do grupo DI em relação ao grupo DN demonstrando que a desnutrição agravou a patogenia causada pela infecção.

A contagem diferencial de leucócitos mostrou uma alta eosinofilia para todos os grupos. Este padrão é frequentemente observado em hamsters mantidos em laboratório e já foi descrito em outros trabalhos desenvolvidos por nosso grupo (Dias et al. 2012). Apesar disso, observamos que os animais infectados apresentaram contagem deste tipo celular superior aos seus controles (não-infectados). Estes achados corroboram com outros estudos com ancilostomídeos que demonstram que o aparecimento da eosinofilia coincide com o desenvolvimento de parasitos adultos no intestino (Maxwell et al. 1987). Na resposta imune celular, os eosinófilos são os tipos celulares predominantes

contra larvas infectantes de ancilostomídeos nos tecidos e, dependendo da carga parasitária, pode levar a eosinofilia periférica (Loukas & Prociv 2001).

O desenvolvimento de uma resposta Th2 na ancilostomose coincide com a patência da infecção e ocorre concomitantemente com a modulação da resposta Th1 (Mendez et al. 2005; Fujiwara et al. 2006). Neste experimento observou-se que os animais do grupo DI apresentaram uma resposta imunológica significativamente menor em relação aos animais do grupo CI, frente aos antígenos bruto e de excreção/secreção de *A. ceylanicum*, e isto pode ter acontecido devido à carência de proteínas, que são essenciais na produção das imunoglobulinas do sistema imunológico. O grupo DI apresentou diminuição dos valores de gordura total e triglicérides no músculo gastrocnêmio, sugerindo que o organismo precisou utilizar estas reservas energéticas para poder preparar uma resposta imunológica adequada.

Em estudos de vacinação para o parasito *Leishmania chagasi* utilizando camundongos Balb/c alimentados com dieta controle, e camundongos submetidos à dieta com baixo teor protéico e pobre em Ferro e Zinco, foi observada maior eficiência da vacina nos Balb/c alimentados com dieta controle. Nos animais submetidos à dieta de baixos teores de proteínas, ferro e zinco, a resposta imunológica frente à vacina foi bem menor, e o número de parasitos encontrados no fígado e no baço foi muito maior comparado ao grupo controle. Este estudo sugere que este tipo de desnutrição pode alterar a resposta imunológica dos animais, mesmo após a saciedade nutricional (Malafaia et al. 2009).

Outro estudo mostra que ovelhas resistentes e suscetíveis ao parasito *H. contortus* alimentadas com uma dieta sem qualquer deficiência protéica apresentaram maior atividade de IgA em comparação com as ovelhas alimentadas com uma dieta deficiente em proteína (Martínez-Valadares et al. 2005.) A IgA é a principal imunoglobulina relacionada à expulsão do parasito, é a mais abundante na secreção da mucosa intestinal (Bungiro et al. 2008) e está envolvida na neutralização dos produtos excretados e secretados pelo parasito (Woof & Kerr 2006).

Os valores de glicose de jejum não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais neste estudo, mostrando que o estado de desnutrição não alterou os níveis de glicemia quando comparado ao grupo controle, e a infecção também não teve influência nesse parâmetro. A glicemia normal encontrada pode estar relacionada ao tipo de desnutrição envolvida, pois todos os grupos receberam dietas isocalóricas, e como a glicose é o principal componente energético celular, o organismo

tenta se adequar às condições de restrição para conseguir manter a homeostase, fazendo com que os níveis de glicemia se mantenham estáveis (Delghingaro-Augusto et al. 2004).

Neste estudo foi observada uma diminuição na quantidade de proteínas totais séricas dos animais desnutridos em relação aos animais normonutridos, mostrando que a dieta hipoprotéica foi um fator determinante para a diminuição de proteínas no plasma. Porém, em relação aos níveis de albumina foi observada tendência à diminuição dos grupos desnutridos em relação aos grupos normonutridos. Dados da literatura mostram que os níveis séricos de albumina têm a tendência a diminuir gradualmente de acordo com a gravidade da anemia (Saraya & Tandom 1975), e foi observada hipoalbuminemia em infecções maciças por ancilostomídeos (Tandon et al. 1969). A diminuição observada no presente trabalho não foi tão acentuada, provavelmente, em função do curto período de exposição dos animais à infecção. Já foi demonstrado que os níveis de albumina sérica respondem lentamente à subnutrição, uma vez que essa proteína possui uma meia vida, relativamente longa, no corpo (14-20 dias) e grandes reservatórios (4-5g /kg de peso corporal), tornando-a um indicador pobre da depleção protéica precoce (Young et al. 1990). De fato, cerca de 60% do conteúdo protéico total do corpo é encontrado fora da corrente sanguínea. Quando a concentração sérica de albumina está diminuindo no início da desnutrição, a albumina extravascular se move em direção ao sangue, ajudando a manter a concentração sérica normal apesar do déficit energético e protéico, por isso, a concentração sérica de albumina não diminui nas desnutrições leves ou moderadas (Gosh et al. 2012).

A hipoalbuminemia foi claramente demonstrada na infecção de camundongos por *Nippostrongylus brasiliensis*, onde as concentrações de albumina plasmáticas foram extremamente baixas em animais alimentados com dietas hipoprotéicas ou hipocalóricas em relação a animais normonutridos (Lunn et al. 1988).

Foi visualizado aumento na concentração plasmática de triglicérides do grupo desnutrido infectado em relação ao grupo desnutrido não-infectado. Isso mostra que a infecção associada à desnutrição agravou a dislipidemia, provocando aumento de triglicérides no plasma, em relação aos outros grupos onde a infecção e a desnutrição não estavam associadas. As análises de colesterol total e colesterol HDL do plasma não apresentaram diferença nos valores entre os grupos experimentais. Embora não tenham sido observadas diferenças no sangue, os dados de colesterol obtidos no fígado se mostraram diferentes. Neste órgão, o grupo DI apresentou aumento na dosagem de

colesterol em relação ao grupo DN, mostrando a influência da infecção, durante a desnutrição, na deposição de gorduras no fígado destes animais. A concentração de triglicérides no fígado foi maior no grupo DN em relação ao grupo CN, o que mostra que a desnutrição favoreceu o acúmulo de triglicérides no tecido hepático. Observou-se uma tendência de aumento nos valores de lipídeos totais nos animais desnutridos em comparação aos animais controle. Estes dados mostraram que os animais desnutridos infectados apresentaram maior tendência em desenvolver esteatose hepática (Truswell 1985).

A deficiência protéica pode ser um fator importante na patogênese da má absorção de gorduras (Saraya & Tandom 1975). Alguns estudos mostraram absorção anormal de nutrientes e aumento da excreção de gordura nas fezes associados com infecções maciças por ancilostomídeos, principalmente quando associado ao déficit de proteínas na dieta (Darke 1959; Saraya & Tandom 1975). Neste estudo observamos que o teor de lipídeos e de proteínas totais do conteúdo cecal, que seria excretado pelos animais infectados ou não (independente da dieta) é semelhante. Entretanto, houve diferença nos valores de triglicérides e colesterol excretados nas fezes, que foi maior para o grupo DI em relação ao grupo CI. Mostrando que houve um sinergismo negativo dos dois quadros apresentados no grupo DI. Ou seja, a infecção associada ao quadro de desnutrição causou uma maior perda dessas moléculas para esse grupo de animais, confirmando a hipótese de que ambas as situações são responsáveis pela síndrome da má absorção. Estes dados ajudam a explicar porque os animais desnutridos infectados apresentaram menores quantidades de triglicérides e colesterol encontrados no músculo gastrocnêmio.

A confirmação da hipótese de associação dos quadros patológicos de desnutrição e infecção, com consequências negativas para ambos, não explica, contudo, quais seriam os mecanismos moleculares envolvidos. Experimentos avaliando o papel das moléculas secretadas/excretadas pelo parasito no intestino do hospedeiro, poderiam contribuir para um maior esclarecimento desses mecanismos.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

A dieta hipoprotéica e isocalórica foi capaz de induzir o estado de desnutrição em hamsters após 4 semanas do início do experimento.

Animais submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram menor peso em relação aos animais do grupo controle, e a infecção com *A. ceylanicum* não interferiu neste parâmetro, provavelmente devido ao curto período de infecção.

Os animais desnutridos infectados apresentaram maior carga parasitária em relação aos normonutridos infectados, com OPG mais elevado, porém as fêmeas apresentaram uma menor taxa de fecundidade, o que pode ter ocorrido devido à escassez de nutrientes e a competição intra-específica dos parasitos.

A infecção associada à desnutrição agravou a patogenia nestes indivíduos, o que pode ser detectado pelo quadro de anemia neste grupo.

A desnutrição prejudicou a resposta imunológica durante a infecção, pois animais desnutridos infectados apresentaram resposta imune humoral bem menor em relação aos normonutridos infectados.

Foi observado aumento de lipídeos, triglicérides e colesterol no fígado e no músculo gastrocnêmio, de hamsters desnutridos em comparação aos animais que receberam dieta controle, independentemente da infecção, e isto pode ter sido ocasionado pelo aumento de carboidratos na dieta hipoprotéica. Porém, a infecção causou um aumento nos níveis de triglicérides no plasma nos animais desnutridos, mostrando que a desnutrição associada à infecção piora o quadro patológico.

Houve aumento na excreção de triglicérides e colesterol nas fezes no grupo desnutrido infectado em relação ao grupo controle infectado, provavelmente devido à síndrome de má absorção intestinal, causada pelo quadro de desnutrição.

Em conjunto, todos esses dados confirmam a hipótese proposta nesse trabalho de que a associação da desnutrição com a parasitose foi determinante para o agravamento do estado de saúde do hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Alkazmi LMM, Dehlawi MS, Behnke JM 2006. The effect of the hookworm *Ancylostoma ceylanicum* on the mucosal architecture of the small intestine in hamsters. *J Helminthol* 80: 397-407.

Alkazmi LMM, Dehlawi MS, Behnke JM 2008. The mucosal cellular response to infection with *Ancylostoma ceylanicum*. *J Helminthol* 82: 33-44.

Anderson RC 1992. Nematode Parasites of Vertebrates. Their development and transmission. CAB International, Wallingford.

Anten JF, Zuidema PJ 1964. Hookworm infection in Dutch servicemen returning from West New Guinea. *Trop Geogr Med* 64: 216-224.

Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL 2001. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Br J Nutr* 86: 697-706.

Aref GH, el-Din MK, Hassan AJ 1970. Immunoglobulins in Kwashiorkor. *J Trop Med Hyg* 73: 186-191.

Areekul S, Radomyos P, Viravan C 1970. Preliminary report of *Ancylostoma ceylanicum* infection in Thai people. *J Med Assoc Thai* 53: 315-321.

Barçante JM *et al.* 2003. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol. Res.* n.89, 2:89-93.

Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 367:1521-1532

Beveridge I 2002. Australian hookworms (*Ancylostomatidae*): a review of the species present, their geographical distribution and biogeographic origins. *Parasitol* 44: 83-88.

Bin Z, Hawdon J, Qiang S, Hainan R, Huiqing Q, Wei H, Shu-Hua X, Tiehua L, Xing G, Zheng F, Hotez P 1999. Ancylostoma secreted protein 1 (ASP-1) homologues in human hookworms. *Mol Biochem Parasitol* 98: 143-149.

Biolo G, Fleming RY, Maggi SP, Nguyen TT, Herndon DN, Wolfe RR 2002. Inverse regulation of protein turnover and amino acid transport in skeletal muscle of hypercatabolic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3378–3384.

Bishop SC, Stear MJ 2000. The use of a gamma-type function to assess the relationship between the number of adult *Teladorsagia circumcincta* and total egg output. *Parasitology* 121: 435-440.

Blaxter ML, Ley PD, Garey RG, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, Thomas WK 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* n.6671, 392:71-75.

Blaxter, M 2000. Genes and genomes of *Necator americanus* and related hookworms. *Int. J. Parasitol* n.30, 127:347-355.

Bleay C, Wilkes CP, Paterson S, Viney ME 2007. Density-dependent immune responses against the gastrointestinal nematode *Strongyloides ratti*. *Int J Parasitol* 37: 1501-1509.

Borer KT, Rowland N, Mirow A, Borer RC, Kelch RP 1979. Physiological and behavioral responses to starvation in the golden hamster. *Am. J. Physiol* 236:105–112.

Bothwell TH, Charlton RW 1984. Iron Deficiency in Women. International Nutritional Anemia Consultative Group, 2nd ed, Washington, D.C.

Briscoe J 1979. The quantitative effect of infection on the use of food by young children in poor countries. *Am J Clin Nutr* 32: 648-676.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black R 2005. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 365:1147–52.

Brooker S, Bethony J, Hotez PJ 2004. Human hookworm infection in the 21st century. *Adv Parasitol* 58: 197-288.

Brown RE, Katz M 1966. Failure of antibody production to yellow fever vaccine in children with Kwashiokor. *Trop Geogr Med* 18: 125-128.

Bungiro RDJr., Greene J, Kruglov E, Cappello M 2001. Mitigation of hookworm disease by immunization with soluble extracts of *Ancylostoma ceylanicum*. *J Infect Dis* 183: 1380-1387.

Bungiro RDJr., Anderson BR, Capello M 2003. Oral transfer of adult *Ancylostoma ceylanicum* hookworms into permissive and nonpermissive host species. *Infect Immun* 71: 1880-1886.

Bungiro RDJr., Sun T, Harrison LM, Shoemaker CB, Cappello M 2008. Mucosal antibody response in experimental hookworm infection. *Parasite Immunol* 30:293-303.

Cappello M, Harrison LM, Bungiro RD, Chadderdon CR, Del Valle A, Milstone A, Chu D, Mieszczanek J, Nerlinger A, Kuzmic P 2003. The molecular pathogenesis of hookworm anemia: prospects for a disease based vaccine. *J Parasitol* 89: S158-S164.

Chan MS, Medley GF, Jamison D, Bundy DA 1994. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology* 109: 373-387.

Chowdhury AB, Schad GA 1972. *Ancylostoma ceylanicum*: a parasite of man in Calcutta and environs. *Am J Trop Med Hyg* 21: 300-301.

Choo J, Pang E, Prociv P 2000. Hookworms in dogs of Kuching, Sarawak (northern Borneo). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 21-22.

Chu D, Bungiro RD, Ibanez M, Harrison LM, Campodonico E, Jones BF, Mieszczanek J, Kuzmic P, Capello M 2004. Molecular characterization of *Ancylostoma ceylanicum* Kunitz-type serine protease inhibitor: evidence for a role in hookworm-associated growth delay. *Infect Immun* 72: 2214-2221.

Clarke M, Locker D, Berall G, Pencharz P, Kenny DJ, Judd P 2006. Malnourishment in a population of young children with severe early childhood caries. *Pediatr Dent* 28: 254-259.

Coltherd JC, Bünger L, Kyriazakis I, Houdijk JGM 2009. Genetic growth potential interacts with nutrition on the ability of mice to cope with *Heligmosomoides bakeri* infection. *Parasitology* 136: 1043–1055.

Coltherd JC, Babayan SA, Bünger L, Kyriazakis I, Allen JE, Houdijk JGM 2011. Interactive effects of protein nutrition, genetic growth potential and *Heligmosomoides bakeri* infection pressure on resilience and resistance in mice. *Parasitology* 138: 1305-1315.

Coop RL, Holmes PH 1996. Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol* 26: 951–962.

Costa AF, Gomes-Ruiz AC, Rabelo EM 2008. Identification of gender-regulated genes in *Ancylostoma braziliense* by real-time RT-PCR. *Vet Parasitol* 153:277-284.

Crompton DWT 1984. Influence of parasitic infection on food intake. *Fed Proc* 43: 239-245.

Crompton DWT, Nesheim MC 2002. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr* 22: 35-59.

Darke SJ 1959. Malnutrition in African adults. 5. Effects of hookworm infestation on absorption of foodstuffs. *Br J Nutr* 13: 278-282.

Delghingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, Amaral MEC, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM 2004. A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets. *J Nutr* 134: 321-327.

De Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L 2003. Soil transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* 19: 547-551.

Dias SR, da Costa AF, Gazzinelli-Guimarães PH, Roatt BM, da Silva Fonseca K, de Paiva NC, Giunchetti RC, Carneiro CM, Fujiwara RT, Rabelo ÉM 2012. Prednisolone and cyclosporine A: Effects on an experimental model of ancylostomiasis. *Exp Parasitol* 133: 80-88.

DiBattista D, Campbell DA 1998. Dietary protein restriction and selective preference for a protein-containing diet in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiol Behav* 64: 563-571.

DiBattista D 1999. Operant responding for dietary protein in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiol Behav* 67: 95-98.

Dondji B, Bungiro RD, Harrison LM, Vermeire JJ, Bifulco C, McMahon-Pratt D, Cappello M 2008. Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. *Infect Immun* 76: 2560-2567.

Dreyfuss ML, Stoltzfus RJ, Shrestha JB, Pradhan EK, LeClerq SC, Khatri SK, Shrestha SR, Katz J, Albonico M, West KP Jr. 2000. Hookworms, Malaria and Vitamin A Deficiency Contribute to Anemia and Iron Deficiency among Pregnant Women in the Plains of Nepal. *J Nutr* 130:2527-2536.

Emmans GC, Kyriazakis I 2000. Issues arising from genetic selection for growth and body composition characteristics in poultry and pigs. In WG Hill, SC Bishop, B McGuirk, JC McKay, G Simm, AJ Webb, The Challenge of Genetic Change in Animal Production, British Society of Animal Science, Edinburgh, p. 36-53.

FAO 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of food insecurity in the world 2006: eradicating world hunger — taking stock ten years after the World Food Summit. Available at:

<http://www.fao.org/docrep/009/a0750e/a0750e00.htm>.

Feasey N, Wansbrough-Jones M, Mabey DCW, Solomon AW 2009. Neglected tropical diseases. *British Medical Bulletin* 93: 179–200.

Fernandez NA 1960. Serum antibody response of malnourished children as compared with well nourished children. *Bol Asoc Med P R* 52: 222-227.

Folch J, Lees M, Stanley GHS 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 497-509.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of food insecurity in the world 2006: eradicating world hunger—taking stock ten years after the World Food Summit. Available at: <http://www.fao.org/docrep/009/a0750e/a0750e00.htm>. Accessed 31 March. 2008.

Freitas MG 1977. *Helmintologia Veterinária*. Belo Horizonte: Rabelo & Brasil.

Fujiwara RT, Geiger SM, Bethony J, Mendez S 2006. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol* n. 7, 28:285-293.

Garside P, Behnke JM 1989. *Ancylostoma ceylanicum* in the hamster: observations on the host-parasite relationship during primary infection. *Parasitology* 98: 283-289.

Garside P, Behnke JM, Rose RA 1990. Acquired immunity to *Ancylostoma ceylanicum* in hamsters. *Parasite Immunol* 12: 247-258.

Ghosh K, Wu W, Antoine AD, Botazzi ME, Valenzuela JG, Hotez PJ, Mendez S 2006. The impact of concurrent and treated *Ancylostoma ceylanicum* hookworm infections on the immunogenicity of a recombinant hookworm vaccine in hamsters. *J Infect Dis* 193: 155-162.

Ghosh A, Chowdhury SD, Ghosh T 2012. Undernutrition in Nepalese children: a biochemical and haematological study. *Acta Paediatr* 101: 671-676.

Hall A 1985. Nutritional aspects of parasitic infection. *Prog Food Nutr Sci* 9: 227–256.

Hawdon JM, Jones BF, Hoffman DR, Hotez PJ 1996. Cloning and Characterization of *Ancylostoma*-secreted Protein. *J Biol Chem* 271: 6672-6678.

Hawdon JM, Datu B, Crowell M 2003. Molecular cloning of a novel multidomain Kunitz-type proteinase inhibitor from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *J Parasitol* 89:402-407.

Hlaing T 1993. Ascariasis and childhood malnutrition. *Parasitology* 107(Suppl): S125–S136.

Hotez PJ 2002. China's hookworms. *China Q* 172: 1029–1041.

Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S 2004. Current concepts: hookworm infection. *N Engl J Med* 351: 799-807.

Hotez PJ, Bethony JM, Bottazzi ME, Brooker S, Buss P 2005. Hookworm: “The great infection of mankind”. *PLoS Med* 2(3): 187-191.

Hotez PJ 2008. Tropical diseases research: thirty years and counting. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e329.

Ihemelandu EC 1985. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. *Acta Anat (Basel)* 121:89-93.

Katona P, Judit KA 2008. The Interaction between Nutrition and Infection. *Clin Infect Dis* 46: 1582-1588.

Koski KG, Scott ME 2001. Gastrointestinal nematodes, nutrition and immunity: breaking the negative spiral. *Annu Rev Nutr* 21: 297–321.

Kyriazakis I, Emmans GC, Whittemore CT 1991. The ability of pigs to control their protein intake when fed in three different ways. *Physiol Behav* 50: 1197-1203.

Lee RD, Nieman DC 2007. Nutritional assessment, 4th ed, McGraw Hill, New York, 574 pp.

Liu J, Raine A, Venables PH, Dalais C, Mednick SA 2003. Malnutrition at age 3 years and lower cognitive ability at age 11 years: independence from psychosocial adversity. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157: 593–600.

Loukas A, Prociv P 2001. Immune Responses in Hookworms Infections. *Clin Microbiol Rev* 14: 689-703.

Lunn PG, Northrop CA, Wainwright M 1988. Hypoalbuminemia in Energy-Malnourished Rats Infected with *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda). *J Nutr* 118: 121-127.

Lunn PG, Northrop CA 1993. The impact of gastrointestinal parasites on protein-energy malnutrition in man. *Proc Nutr Soc* 52: 101-111.

Malafaia G, Serafim TD, Silva ME, Pedrosa ML, Rezende SA 2009. Protein-energy malnutrition decreases immune response to *Leishmania chagasi* in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 31: 41-49.

Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF, Anderson RM 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365: 797-805.

Martínez-Valladares M, Vara-Del Río MP, Cruz-Rojo MA, Rojo-Vázquez FA 2005. Effect of a low protein diet on the resistance of Churra sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 27: 219-225.

Mascie-Taylor N, Karim E 2003. The Burden of Chronic Disease. *Science* 302: 1921-1922.

Maxwell C, Hussain R, Nutman TB, Poindexter RW, Little MD, Schad GA, Ottesen EA 1987. The clinical and immunologic responses of normal human volunteers to low dose hookworm (*Necator americanus*) infection. *Am J Trop Med Hyg* 37:126-134.

Menon S, Bophale MK 1985. *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): pathogenicity and humoral immune response to a primary infection. *J. Helminthol* 59: 143-146.

Mendez S, Valenzuela JG, Wu W, Hotez PJ 2005. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infect Immun*, n.73, 6: 3402-3407.

Milstone AM, Harrison LM, Bungiro RD, Kuzmic P, Capello M 2000. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *J Bio Chem* 275:29391-29399.

Mitruka BM, Rawnsley HM, 1977. Clinical, Biochemical and Haematological Reference Values in Normal Experimental Animals. *Masson Pub Inc*, 21-84.

Montresor A, Crompton DWT, Gyorkos TW, Savioli L 2002. Helminth control in school-age children. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 64 p.

Moqbel R, MacDonald AJ 1990. Immunological and inflammatory responses in the small intestine associated with helminth infections. In *Parasites: Immunity and Pathology*, pp. 249-282 [J. M. Behnke, editor]. London: Taylor & Francis.

Parada-Simão TR, Oliveira F, Pacheco ME, Alves PHM, Liberti EA 2011. Effects of protein malnutrition on muscle fibers of the brachial biceps and medial pterygoid of Wistar rats. *J Morphol Sci* 28(3): 196-203.

Phiri K, Whitty CJ, Graham SM, Ssembatya-Lule G 2000. Urban/rural differences in prevalence and risk factors for intestinal helminth infection in southern Malawi. *Ann Trop Med Parasitol* 94: 381–387.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.

Reddy V, Srikantia SG 1964. Antibody response in Kwashiorkor. *Indian J Med Res* 52: 1154-1158.

Reddy V, Bhaskaram C, Raghuramulu N 1977. Immunological responses in malnourished children. *Indian J Pediatr* 14: 255-258.

Rey, L. Ancilostomideos e ancilostomiase: I – Os parasitos. In: REY, L. *Parasitologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 46, p. 591-599.

Saldiva SRM, Carvalho HB, Castilho VP, Struchiner CJ, Massad E 2002. Malnutrition and susceptibility to enteroparasites: reinfection rates after mass chemotherapy. *Paediatr Perinat Epidemiol* 16: 166-171.

Saraya AK, Tandon BN 1975. Hookworm anaemia and intestinal malabsorption associated with hookworm infestation. *Prog Drug Res* 19: 108-118.

Scrimshaw NS, Bistran BR, Brunser O, Elia M, Jackson AA, Jiang ZM, Kinney JM, Rosenberg IH, Wolf FF. Effects of disease on desirable protein/energy ratios. In Scrimshaw NS, Schurch B, eds. Protein-energy interactions. Proceedings of an IDECG workshop, Waterville Valley, NH, USA October 21 to 25, 1991, Lausanne, Switzerland: IDECG, 1992: 385-398.

Scrimshaw NS, SanGiovanni JP 1997. Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 66: 464S–477S.

Shantz PM 1991. Parasitic zoonosis in perspective. *Int J Parasitol* 21: 161-170.

Sidransky H 1976. Nutritional disturbances of protein metabolism in the liver. *Am J Pathol* 84: 649-668.

Silverman HJ, Zucker I 1976. Absence of post-fast food compensation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Physiol Behav* 17:271–285.

Solomons NW 1993. Pathways to the impairment of human nutritional status by gastrointestinal pathogens. *Parasitology* 107: S19-S35.

Soulsby EJJ 1965. Textbook of veterinary clinical parasitology. Volume I Helminths. Oxford, Blackwell, 1965.

Stephenson LS 1994. Helminth parasites, a major factor in malnutrition. *World Health Forum*. 15: 169–172.

Stephenson LS, Latham MC, Ottesen EA 2000. Malnutrition and parasitic helminth infections. *Parasitology* 121(Suppl): S23–S38.

Stoltzfus RJ, Chwaya HM, Tielsch JM, Schulze KJ, Albonico M, Savioli L 1997a. Epidemiology of iron deficiency anemia in Zanzibari schoolchildren: the importance of hookworms. *Am J Clin Nutr* 65: 153-159.

Stoltzfus RJ, Dreyfuss ML, Chwaya HM, Albonico M 1997b. Hookworm control as a strategy to prevent iron deficiency. *Nutr Rev* 55: 223-232.

Strain SA, Bishop SC, Henderson NG, Kerr A, McKellar QA, Mitchell S, Stear MJ 2002. The genetic control of IgA activity against *Teladorsagia circumcincta* and its association with parasite resistance in naturally infected sheep. *Parasitology* 124: 545-552.

Tandon BN, Kohli RK, Saraya AK, Ramachandran K, Prakash O 1969. Role of parasites in the pathogenesis of intestinal malabsorption in hookworm disease. *Gut* 10: 293-298.

Traub RJ, Robertson ID, Irwin P, Mencke N, Thompson RCA 2004. Application of a species-specific PCR-RFLP to identify *Ancylostoma* eggs directly from canine faeces. *Vet Parasitol* 123: 245-55.

Truswell AS 1985. ABC of nutrition. Malnutrition in the Third World-II. *Br Med J* 291:587-589.

Variyam EP, Banwell JG 1982. Hookworm disease: nutritional implications. *Rev Infect Dis* 4: 830-835.

Velasquez CC, Cabrera BC 1968. *Ancylostoma ceylanicum* (Looss, 1911) in a Filipino woman. *J Parasitol* 54: 430-431.

Woof JM, Kerr MA 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol* n. 208, 2: 270-282.

Xu LQ, Yu SH, Jiang ZX, Yang JL, Lai CQ, Zhang XJ, Zheng CQ 1995. Soil-transmitted helminthiasis: nationwide survey in China. *Bull World Health Organ*; 73: 507-513.

Yadla S, Sen HG, Hotez PJ (2003) An epidemiological study of ancylostomiasis in a rural area of Kanpur District Uttar Pradesh, India. *Indian J Public Health* 47: 53-60.

Yoshida Y, Okamoto K, Chiu JK 1968. *Ancylostoma ceylanicum* infection in dogs, cats, and man in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 17: 378-381.

Young VR, Marchini JS, Cortiela J. Assessment of protein nutritional status. *J Nutr* 120: 1469-1502.

Zhan B, Liu Y, Badamchian M, Williamson A, Feng J, Loukas A, Hawdon JM, Hotez PJ 2003. Molecular characterisation of the *Ancylostoma*-secreted protein family from the adult stage of *Ancylostoma caninum*. *Int J Parasitol* 33: 897-907.

ANEXO

9. Anexo