



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS - CCM
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

JENYFFER SABRYNA COSTA DO NASCIMENTO

**EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DA AMAMENTAÇÃO POR
CAMUNDONGOS ESQUISTOSSOMÓTICOS EM DESCENDENTES NOD
PORTADORES DE DIABETES AUTOIMUNE**

RECIFE

2022

JENYFFER SABRYNA COSTA DO NASCIMENTO

**EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DA AMAMENTAÇÃO POR
CAMUNDONGOS ESQUISTOSSOMÓTICOS EM DESCENDENTES NOD
PORTADORES DE DIABETES AUTOIMUNE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical.

ORIENTADORA: Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

CO-ORIENTADORA: Dr^a. Patrícia D’Emery Alves Santos

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

N244e Nascimento, Jenyffer Sabryna Costa do.
Efeitos imunorregulatórios da amamentação por camundongos esquistossomóticos em descendentes NOD portadores de diabetes autoimune / Jenyffer Sabryna Costa do Nascimento. – 2022.
55 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora : Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Coorientadora : Patrícia D'Emery Alves Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2022.

Inclui referências e anexo.

1. Esquistossomose. 2. Aleitamento Materno. 3. Imunomodulação. 4. Diabetes Autoimune. 5. Camundongos Endogâmicos NOD. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientadora). II. Santos, Patrícia D'Emery Alves (Coorientadora). III. Título.

616.462 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2022-290)

JENYFFER SABRYNA COSTA DO NASCIMENTO

**EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DA AMAMENTAÇÃO POR
CAMUNDONGOS ESQUISTOSSOMÓTICOS EM DESCENDENTES NOD
PORTADORES DE DIABETES AUTOIMUNE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 29/08/2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Roeckson Carlos Peixoto Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois o caminho foi difícil, foram muitos imprevistos e desafios, mas ele sempre iluminou meu caminho e se fez presente em todos os momentos da minha vida.

Meu muito obrigada aos meus amados pais Tânia e Junior, por serem o meu melhor exemplo e por terem me ensinado todos os valores que achavam importantes e me tornarem na pessoa que sou hoje. Aqui deixo minha pequena homenagem e um agradecimento aos dois, pela vida que me ofereceram, por todo o amor e apoio incondicionais que sempre me disponibilizaram. Amo vocês!

A minha querida e amada irmã, Bruna, que pela idade ainda não entende, mas é minha fonte de motivação e perseverança.

Ao meu amor, Elysson, que sempre esteve ao meu lado, presenciando e vivendo todas as minhas angústias e conquistas, meu parceiro de vida.

À Prof^a Valdênia Souza, responsável por esse trabalho, pela oportunidade, paciência e orientação. Obrigada pela sua disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo.

A Dr^a Patrícia d'Emery, pela co-orientação durante a execução deste trabalho e pelos ensinamentos repassados.

À Dra^a Vírginia Lorena, pela ajuda em todas as análises de citometria e pelos esclarecimentos em muitos questionamentos surgidos ao longo do trabalho.

A Raul, meu companheiro de laboratório que forneceu grande ajuda em todos os procedimentos experimentais, acompanhou o desenvolvimento da pesquisa e prestou ajuda incondicional. O sucesso do trabalho só foi alcançado por suas grandes contribuições.

A Cássia que contribuiu incansavelmente no final da dissertação. Sem dúvida, a conclusão do trabalho só foi possível devido seu auxílio.

A todos do setor de Imunologia do LIKA: às professoras Mônica e Vláudia, e a todos os outros componentes: André, Joyce, Marisa, Matheus, Thaís, Junior, Mariana.

A todos do biotério e do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, pela disponibilidade, e pelo cuidado com os meus camundongos.

RESUMO

Os estudos da amamentação em camundongos esquistossomóticos demonstraram alteração, estimulando ou suprimindo, na resposta imune dos descendentes para antígenos não-relacionados, na vida adulta. Aqui, avaliou-se o efeito da amamentação na diabetes autoimune, através do acompanhamento glicêmico, produção de citocinas Th1, Th2 e Th17 e frequência de linfócitos T regulatórios em camundongos fêmea adultos, descendentes de mães diabéticas não-obesas (NOD), amamentadas em mães Balb/c infectadas ou não por *Schistosoma mansoni*. Após o nascimento, foi realizada a amamentação adotiva, em que descendentes de mães NOD foram amamentadas em mães infectadas (NOD-AI) e outro grupo por mães não infectadas (NOD-ANI). Outro grupo de animais nascidos de mães NOD permaneceu amamentando nas próprias mães (NOD). Para grupo CONTROLE, utilizou-se animais nascidos e amamentados em mães não infectadas. Quando adultos, as descendentes tiveram a glicose mensurada da 10^a até a 17^a semana de vida. Nesta última, os animais tiveram os esplenócitos cultivados apenas com meio de cultura ou acrescentado do mitógeno ConA (5 µg/ml). Após 48h, foram dosados nos sobrenadantes a IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α e IFN-γ e as células usadas para imunofenotipagem, com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos para CD8+CD122+, CD4+IL10+, CD4+IL17+ e CD4+FoxP3. Foi observado um aumento glicêmico progressivo no grupo NOD desde a 10^a semana (glicose >130mg/dL), enquanto a glicemia os grupos experimentais NOD-AI e NOD-ANI e grupo CONTROLE mantiveram valores abaixo de <130mg/dL até a 15^a semana. Na última semana, em relação ao CONTROLE, todos os demais grupos apresentaram-se diabéticos (>200mg/dL), contudo a glicemia do NOD foi o dobro (~518mg/dL) quando comparada com os grupos NOD-AI e NOD-ANI (~259mg/dL). O grupo NOD apresentou alta frequência de CD4+IL17+, enquanto no grupo NOD-AI houve maior frequência de células CD8+CD122+ e CD4+IL-10+. No grupo NOD houve baixa produção de IL-2 e IL-4 e níveis bastante elevados de IL-17. Do contrário, nos animais que receberam leite de mães adotivas (NOD-ANI e NOD-AI) houve maior produção de IL-2 e notável diminuição de IL-17. No grupo NOD-ANI houve menor produção de IFN-γ, acompanhadas de menos IL-6, enquanto no grupo NOD-AI a drástica diminuição IFN-γ foi acompanhada de maiores níveis de IL-10. Não houve diferença na produção de TNF-alfa e frequência de células CD4+FoxP3 nos grupos estudados. Então, a amamentação adotiva em mães esquistossomóticas ou não proporciona uma diminuição nos níveis glicêmicos, mesmo não prevenindo a diabetes, acompanhada de diminuição de citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ e IL-17), porém a produção de IL-10 e possível efeito regulatório CD8+CD122+ foi determinado pela infecção materna.

Mesmo o leite adotivo de não infectadas levando a um redirecionamento de resposta para Th2, a amamentação em mães esquistossomóticas se mostrou melhor capaz de suprimir o perfil Th1/Th17, desviando para uma resposta Th2/IL-10 e consequentemente regular o agravamento e progressão da doença. A origem do leite parece ter relação com o perfil regulatório na diabetes autoimune, sendo capaz de induzir um potencial imunossupressor nos camundongos NOD adultos, previamente amamentados por mães adotivas.

Palavras-chave: esquistossomose; amamentação; imunomodulação; diabetes autoimune; camundongos diabéticos não obesos.

ABSTRACT

Studies of breastfeeding in mice infected with *Schistosoma mansoni* have demonstrated an alteration, either stimulating or suppressing, in the immune response of offspring to unrelated antigens in adulthood. Here, the effect of breastfeeding on autoimmune diabetes was evaluated through glycemic monitoring, production of Th1, Th2 and Th17 cytokines and frequency of regulatory T lymphocytes in adult female mice, descendants of non-obese diabetic mothers (NOD), and breastfed in Balb/c mothers infected or not with *S. mansoni*. After birth, adoptive breastfeed was held, in which offspring of NOD mothers were breastfed by infected mothers (NOD-AI) and another group by uninfected mothers (NOD-ANI). Another group of animals born to NOD mothers remained breastfeeding on their own mothers (NOD). For the CONTROL group, animals born and breastfed from uninfected mothers were used. The offspring had their glucose measured from the 10th to the 17th week of life. In the 17th week, the animals had their splenocytes cultured only with culture medium or with the addition of mitogen ConA (5 µg/ml). After 48h, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α and IFN-γ were dosed in the supernatants and the cells used for immunophenotyping, with monoclonal antibodies linked to fluorochromes for CD8+CD122⁺, CD4+IL10⁺, CD4+IL17⁺ and CD4+FoxP3. It was a progressive glycemic increase in the NOD group since the 10th (glucose >130mg/dL), while the glycemia in NOD-AI and NOD-ANI experimental group and CONTROL group maintained values below <130mg/dL until the 15th week. In the last week, in relation to the CONTROL, all the other groups were diabetic (>200mg/dL), however the NOD glycemia was double (~518mg/dL) when compared to the NOD-AI and NOD-ANI groups. (~259mg/dL). The NOD group had a high frequency of CD4+IL17⁺, while the NOD-AI group had a higher frequency of CD8+CD122⁺ and CD4+IL-10⁺ cells. In the NOD group there was low production of IL-2 and IL-4 and very high levels of IL-17. On the other hand, in animals that received milk from adoptive mothers (NOD-ANI and NOD-AI) there was a higher production of IL-2 and a notable decrease of IL-17. In the NOD-ANI group there was a lower production of IFN-γ, accompanied by less IL-6, while in the NOD-AI group, the drastic decrease in IFN-γ was accompanied by higher levels of IL-10. There was no difference in TNF-α production and frequency of CD4+FoxP3 cells in the studied groups. So, adoptive breastfeeding in schistosomal mothers or not provides a decrease in glycemic levels, even not preventing diabetes, accompanied by a decrease in pro-inflammatory cytokines (IFN-γ and IL-17), but the production of IL-10 is possible CD8+CD122⁺ regulatory effect was determined by maternal infection. Even the non-infected adoptive milk leading to a redirection of the response to Th2, breastfeeding in

schistosomal mothers was better able to suppress the Th1/Th17 profile, shifting to a Th2/IL-10 response and, consequently, regulate the worsening and progression of the disease. The origin of milk seems to be related to the regulatory profile in autoimmune diabetes, being able to induce an immunosuppressive potential in adult NOD mice, previously breastfed by adoptive mothers.

Keywords: schistosomiasis; breastfeeding; immunomodulation; autoimmune diabetes; diabetic mice non-obese.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação dos grupos experimentais.	29
Figura 2 - Acompanhamento semanal da glicemia.	35
Figura 3 - Frequência de células esplênicas CD4+IL10 (A), CD4+IL17 (B), CD4+FoxP3 (C) e CD8+CD122+ (D) em camundongos fêmeas NOD amamentados em mães Balb/c infectadas pelo <i>S. mansoni</i> (AI NOD), amamentados em mães não infectadas (ANI NOD) ou nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) e (CONTROLE).	37
Figura 4 - Níveis das citocinas IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), TNF (D), IFN- γ (E), IL-10 (F) IL-17 (G) em camundongos fêmeas NOD amamentados em mães Balb/c infectadas pelo <i>S. mansoni</i> (AI NOD), amamentados em mães não infectadas (ANI NOD) ou nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) e (CONTROLE).	40
Figura 5 - Análise histopatológica do pâncreas de camundongos fêmeas NOD nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) (A), amamentados em mães infectadas (NOD-AI) (B) e camundongos fêmeas Balb/c nascidos/amamentados em suas próprias mães (CONTROLE) (C).	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ASMA	Antígeno <i>S. mansoni</i> autoclavado
CD	Cluster of differentiation (grupo de diferenciação)
DCs	Células Dendríticas
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
GAD-65	Ácido glutâmico descarboxila
HDACs	Histonas deacetilases
IAA	Anticorpo anti-insulina
ICA	Anticorpo anti-ilhota
IA-2	Tirosina fosfatase 2
IA-2B	Tirosina fosfatase 2 B
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina (M)
IgE	Imunoglobulina (E)
IgG	Imunoglobulina (G)
IgG2	Imunoglobulina (G2)
IgG1	Imunoglobulina (G1)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NO	Óxido nítrico
NOD	Non-obese-diabetic (diabético não obeso)
OA	Ovalbumina
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PDL1	<i>Programmed cell death ligand 1</i> (Ligante de morte celular programada 1)
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
SEA	<i>Soluble Egg Antigen</i> (Antígenos solúveis do ovo de <i>S. mansoni</i>)
SWA	<i>Soluble Worm Antigen</i> (Antígenos solúveis do verme de <i>S. mansoni</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	<i>Transforming growth factor-Beta</i> (Fator de transformação do crescimento – Beta)

(Th)1	T helper 1
(Th)2	T helper 2
(Th)17	T helper 17
TNF	<i>Tumor necrosis factor alfa</i> (Fator de necrose tumoral)
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	A esquistossomose.....	16
2.2	Imunomodulação para antígeno heterólogo na esquistossomose.....	18
2.3	Relação materno-fetal na esquistossomose.....	19
2.4	Diabetes Mellitus tipo I.....	21
2.5	Imunomodulação para Diabetes Mellitus e as helmintíases.....	23
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	Considerações éticas.....	27
4.2	Desenho de estudo.....	27
4.3	Local de estudo.....	27
4.4	Animais.....	28
4.5	Infecção e parasitológico de fezes.....	28
4.6	Sincronização do estro e acasalamento e formação dos grupos de estudo.....	28
4.7	Glicemia e glicosúria.....	29
4.8	Análise histopatológica do pâncreas.....	30
4.9	Obtenção de células esplênicas e sobrenadante de cultura celular.....	30
4.10	Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem.....	31
4.11	Dosagens das citocinas.....	32
4.12	Fluxograma dos procedimentos.....	33
4.13	Análise estatística.....	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Efeito da amamentação em mães esquistossomóticas nos níveis de glicose no sangue e urina dos descendentes NOD.....	34
5.2	Amamentação adotiva levou a diminuição da frequência de células CD4+IL17, mas quando em mães infectadas houve aumento na frequência de células CD4+IL10 e CD8+CD122+.....	36

5.3	A amamentação adotiva diminuiu a produção de IL-17 e IFN- γ nos descendentes NOD, mas quando em mães infectadas foi acompanhada de maior produção de IL-10.....	38
5.4	A amamentação adotiva levou a diminuição da proporção de alterações degenerativas das ilhotas pancreáticas nos descendentes NOD.....	42
6	DISCUSSÃO.....	44
7	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	ANEXO A – Parecer da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA – CpqAM – FioCruz PE).....	55

1 INTRODUÇÃO

A influência dada pela infecção por *Schistosoma mansoni* ou a administração de seus produtos derivados, na resposta imune de outras infecções e doenças autoimune, inflamatórias crônicas e desordens alérgicas vem sendo relatada em muitos estudos utilizando camundongos (MEDEIROS et al., 2003; ARAUJO et al., 2004; OSADA et al., 2009; ZHENG et al., 2008; RUYSSERS et al., 2010; VAN DER VLUGT et al., 2012; LAYLAND et al., 2013; HEYLEN et al., 2014; JANSSEN et al., 2016; WANG et al., 2017; LACCORCIA et al., 2018). Em acréscimo, Santos e colaboradores (2010) (2014) constataram que o leite de mães infectadas pelo *S. mansoni* também consegue modular a resposta imune, estimulando ou suprimindo, a depender do modelo de imunização/doença utilizado. Sendo assim, é possível que descendentes diabéticos não-obesos (NOD) amamentados em mães esquistossomóticas possam, a partir de uma possível modulação negativa da resposta imune, atenuar danos inflamatórios no pâncreas e consequentemente controlar a diabetes autoimune.

Os estudos da amamentação de camundongos esquistossomóticos demonstraram que diante a exposição à um antígeno heterólogo (ex: ovoalbumina), os descendentes adultos apresentaram melhores níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a e notável aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- γ , IL-6), além da melhora da capacidade dos linfócitos B apresentarem antígenos por aumento da expressão de CD40 e CD80 (SANTOS et al., 2010; 2014; SILVA et al., 2021). Contudo, em outros estudos foi demonstrado o aumento na produção de citocinas regulatórias e de Th2 (TGF- β , IL-5) e aumento na frequência de células Tregs (SILVA et al., 2021; FERNANDES et al., 2018). Sendo assim, não é sabido se o aumento de citocinas pró-inflamatórias e produção de anticorpos pode tornar o descendente mais responsivo no caso da diabetes autoimune, mas ao mesmo tempo o desvio para resposta específica Th2 e/ou Treg não patogênica poderia amenizar e alterar o curso da diabetes, prevenindo-a.

Zaccone et al. (2003) (2009) (2010) mostraram que após a administração de antígeno solúvel do ovo (SEA) e/ou antígeno solúvel do verme (SWAP), em camundongos NOD, propensos a desenvolver a doença, os mesmos obtiveram aumento nas células T CD4⁺Foxp3⁺ no pâncreas e no baço e expansão de resposta Th2 e células T com potencial imunossupressor, que resultou no controle da resposta Th1 e consequente prevenção do início da diabetes, apesar de ainda ter ocorrido infiltrado peri-insular no pâncreas. Além disso, ao analisar se o SEA induziu um ambiente regulatório no pâncreas, detectaram, a partir da PCR em tempo real, significantes aumentos da expressão gênica de TGF- β , IL-10, IL-4, IL-35 e galectina 3. O

infiltrado no camundongo NOD inicia entre 3-4 semanas de idade (DELOVITCH et al., 1997) e nos estudos mencionados a administração de produtos derivados do *S. mansoni* foi realizada na 4ª semana, sendo assim, é preciso investigar se o prévio contato com o leite materno de mães infectadas nos filhotes apresenta melhor resultado e consegue conter a infiltração de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas ou possa piorar devido a indução de melhor produção de anticorpos, pois o tornaria mais responsivo aos próprios antígenos, ampliando os danos inflamatórios no pâncreas.

Deste modo, o presente projeto se propôs a avaliar a influência da amamentação de camundongos mães esquistossomóticas em NOD filhotes, na modulação negativa da diabetes autoimune, através do acompanhamento dos níveis de glicemia e glicosúria para determinação da diabetes, parâmetros imunológicos (dosagem de citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IFN- γ , IL-17) e análise histopatológica (grau de infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e linfócitos no pâncreas).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária negligenciada em todo o mundo, causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma*. É estimado atualmente que a doença afete mais de 240 milhões de pessoas, sendo endêmica em países tropicais e sub-tropicais, com 90% dos infectados acometidos no continente africano (WHO, 2020; DEOL et al, 2019). Segundo a WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020), existem 5 espécies que causam a doença, porém apenas o *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose mansônica, é encontrado no Brasil. Neste, a prevalência é de 1,79%, com regiões Sudeste e Nordeste possuindo os maiores índices de positividade (KATZ, 2018).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é composto por dois tipos de hospedeiros: o intermediário, caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria*, e o definitivo, o homem; além das formas evolutivas do parasito: miracídio, ovo, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto. A transmissão ocorre por intermédio da forma evolutiva cercária do parasita, liberada na água pelos moluscos previamente infectados, que penetra no homem quando o mesmo entra em contato com a água contaminada, através da pele ou mucosa (MARTINS et al., 2019). O indivíduo infectado também é fonte de infecção, devido às suas fezes excretadas possuírem ovos viáveis, contendo miracídio, que ao penetrarem os caramujos perdem seus cílios e transformam-se em esporocistos, que dão origem às cercárias por reprodução assexuada (SOUZA et al., 2011; BRASIL, 2018).

Após atravessarem a barreira epitelial do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda, tornam-se esquistossômulos e caem na corrente sanguínea, por onde são lançadas em vários pontos no organismo, como coração e pulmões (BRASIL, 2018). A fase pulmonar termina com o esquistossômulo saindo pelo compartimento venoso do pulmão através do transporte passivo do coração para a aorta, caindo no sistema porta-hepático (CARVALHO et al., 2008). Ao atingirem o sistema portal hepático, os esquistossômulos amadurecem para vermes adultos (machos e fêmeas), e é na veia mesentérica que copulam, resultando na produção de até 300 ovos diários pela fêmea, que migra para as vênulas mesentéricas dos intestinos para a deposição (CLEENEWERK et al., 2020). Apesar de grande parte dos ovos serem excretada junto às fezes, muitos ficam retidos principalmente no intestino e fígado, desencadeando uma reação granulomatosa, a principal causa da patogenia da esquistossomose (COLLEY et al., 2014). Em

contrapartida, o granuloma é um mecanismo de defesa essencial para proteger os hepatócitos dos agentes citotóxicos liberados pelo SEA (SOUZA, 2011; CHUAH et al., 2014).

O granuloma é formado a partir da resposta imunológica de células T contra imunógenos liberados pelos ovos, conhecidos como Antígenos Solúveis do Ovo (SEA), sendo apresentado por infiltrado celular composto de células mononucleares, polimorfonucleares, eosinófilos, células epitelióides e fibroblastos. Em alguns indivíduos infectados, devido a contínua resposta imune, principalmente de IL-4 e IL-13, o granuloma evolui para fibrose hepática grave, que interrompe o fluxo sanguíneo, causando hipertensão portal, que pode ser fatal devido ao risco de sangramento esofágico. No entanto, apesar da formação do granuloma, a maioria dos pacientes vivendo em áreas endêmicas são assintomáticas (apenas 4-12% mostram manifestações graves da doença) (CALDAS et al., 2008).

A fase aguda da esquistossomose é mediada por resposta celular do tipo Th1, voltada para a migração do esquistossômulo e vermes adultos, com produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-12 por células mononucleares. Após 60 dias de infecção, e início da deposição de ovos pelos vermes fêmeas, a doença progride para fase crônica. Produtos secretados/excretados dos ovos estimulam células dendríticas e macrófagos, ocorrendo a ativação de células Th0 que diferenciarem-se em células Th2 na presença de IL-4 e/ou IL-13 e a resposta torna-se do tipo Th2, com elevados níveis de IgE, IL-4, IL-5 e IL-13, bem como ocorre geração de células T regulatórias (Tregs) que liberam IL-10 e TGF- β . Esse equilíbrio nas respostas Th1/Th2 modula negativamente a produção e funções das citocinas próinflamatórias liberadas na fase aguda (predominantemente Th1) e diminui o tamanho dos granulomas formados (predominantemente Th2) (SOUZA, 2011; CHUAH et al., 2014).

Além disso, estudos recentes indicam que células Th17 são cruciais na esquistossomose, participando ativamente da imunopatogênese tardia (ZHOU et al. 2019). IL-17 é capaz de estimular produção de colágeno (MENG et al., 2012) e é a principal mediadora do desenvolvimento da patologia grave, sendo induzida por outras citocinas (IL-6, IL-23, IL-1, IL-21, TGF- β). A patologia grave pode se desenvolver naturalmente ou ser induzida, havendo incontrolável resposta Th1 e falha da resposta Th2, além de altos níveis de IL-17 juntamente com IFN- γ (RUTITZKY e STADECKER, 2011).

No experimento realizado por Wang et al. (2015), IL-17 contribuiu para a inflamação granulomatosa hepática e subsequente fibrose, indicando o envolvimento de Th17 na remodelação patológica do tecido. Rutitzky e Stadecker (2011) mostraram que camundongos

deficientes de IL-12 e IL-23 e que não conseguem produzir IFN- γ e IL-17, quando infectados por *S. mansoni*, falham no desenvolvimento da forma exacerbada da doença.

2.2 Imunomodulação para antígeno heterólogo na esquistossomose

Estudos relatam que o perfil de imunossupressão desencadeado pelo *S. mansoni* se estende além dos antígenos homólogos, para também à antígenos heterólogos. Em humanos e camundongos, a infecção pelo parasita e seus produtos derivados podem prejudicar a eficácia da resposta imune a outras infecções e vacinas, bem como reduzir susceptibilidade e levar à melhora em doenças autoimune e desordens alérgicas (MEDEIROS et al., 2003; ARAUJO et al., 2004; ERB et al., 2009; OSADA et al., 2009; ZHENG et al., 2008; RUYSSERS et al., 2010; VAN DER VLUGT et al., 2012; LAYLAND et al., 2013; HEYLEN et al., 2014; JANSSEN et al., 2016; MARINHO et al., 2016; WANG et al., 2017; LACCORCIA et al., 2018).

Sendo assim, o direcionamento da resposta imune Th2/Treg induzida pelos antígenos dos ovos durante a fase crônica da esquistossomose pode levar ao bloqueio da resposta inflamatória Th1-dependente para antígenos heterólogos.

De fato, em modelos experimentais murinos, a prévia infecção com o *S. mansoni* estabeleceu uma forte resposta Th2, atrasando o desenvolvimento e resolução de lesões ocasionadas por *Leishmania major*, que provoca infecção controlada por resposta Th1 (LA FLAMME et al., 2002). Foi relatado, por Waknine-Grinberg et al. (2010), que a co-infecção entre *S. mansoni* e *Plasmodium berghei* reduz a incidência de malária cerebral (CM). Além disso, foi observado que injeção de SEA aumentou a sobrevivência do animal. Wolfs et al. (2013) mostraram que o tratamento com SEA protegeu contra o desenvolvimento da aterosclerose através da redução de marcadores inflamatórios, como TNF- α e CD68.

A influência da resposta imune à esquistossomose frente a infecções virais também foi relatada. Em estudos in vitro, Lima et al. (2013) mostraram que proteínas do *Schistosoma* são capazes de modular negativamente a produção da IFN- γ e aumentar a produção de IL-10 em humanos infectados com HTLV-1. Essa resposta consequentemente modula a produção de CXCL9, relacionada com o aumento da resposta pró-inflamatória no tecido da medula espinhal, reduzindo o risco de dano associado a alterações neurológicas (LIMA et al., 2017).

Com relação às doenças autoimunes, ao examinar os efeitos da infecção por *S. mansoni* na artrite em camundongos, foi observada uma significativa redução da doença, através da modulação negativa de Th1 (IFN- γ) e das citocinas TNF- α e IL-17, e consequente regulação positiva de Th2 (IL-4) e IL-10, sugerindo assim um potencial agente terapêutico dos produtos derivados do parasita contra artrite reumatoide (OSADA et al., 2008; 2009; 2018). Dados clínicos de Eissa et al. (2016) demonstraram que a injeção de antígeno de *S. mansoni* autoclavado (ASMA) em ratos atenuaram a progressão da poliartrite, com redução da IL-17 sérica e aumento de IFN- γ e IL-10. Além disso, houve aumento significativo do número de células Foxp3+, atribuída a atividade anti-artrítica. Em um modelo experimental de colite em camundongos, o tratamento com proteínas do parasita *S. mansoni* conseguiu atenuar, *in vitro* e *in vivo*, inflamação intestinal e melhorar distúrbios de motilidade (RUYSSERS et al., 2010; HEYLEN et al., 2014).

A infecção com *S. mansoni* reduziu a síntese de mediadores inflamatórios (IFN- γ , TNF- α e NO) e aumentou os níveis de IL-4 e IL-5, conseguindo retardar o início da encefalomielite autoimune em camundongos e também prevenir a inflamação do sistema nervoso central (LA FLAMME et al., 2003). Apesar dos níveis de IL-10 não terem sido significantes neste estudo, Sewell et al. (2003) observaram maior produção desta, juntamente com o aumento de TGF- β e diminuição de IFN- γ , a partir da imunização com ovos de *S. mansoni* no mesmo modelo de estudo mencionado.

A exposição aos produtos derivados do *Schistosoma* conseguiu prevenir o início da diabetes, sendo a ribonuclease do parasita ω -1, presente no SEA, o principal fator de indução Th2, expandindo populações Treg *in vitro* e *in vivo* (TANG et al., 2019). Cooke et al. (1999) foram os primeiros a demonstrar o efeito protetor do *S. mansoni* contra o Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), onde a infecção pelo parasita reduziu a incidência espontânea da doença em camundongos NOD através da troca de resposta Th1 para Th2.

Sendo assim, os achados acima sugerem que na esquistossomose pode haver modulação negativa de doenças Th1-mediadas, entre elas as doenças autoimunes. Este fato está de acordo com a hipótese de higiene que aponta alta prevalência de doenças autoimunes em países desenvolvidos devido à ausência de doenças infecciosas, ou seja, sugere que infecções por helmintos podem proteger de doenças autoimunes (CLEENEWERK et al., 2020).

2.3 Relação materno-fetal na esquistossomose

Estudos epidemiológicos apontam uma alta frequência de mulheres grávidas ou em idade fértil em áreas endêmicas para esquistossomose. Friedman et al. (2007) relataram que 40 milhões de mulheres em idade reprodutiva são acometidas pela esquistossomose, e 10 milhões de grávidas são infectadas por ano na África. Tonga et al. (2019) realizaram um estudo em Njombe-Penja (Camarões) que relatou uma prevalência de infecção, principalmente por *S. mansoni* e *S. haematobium*, de 31,91%, sendo 1/3 deste valor composto por mulheres grávidas.

A sensibilização imunológica perinatal, por antígenos ou anticorpos, pode ocorrer por via transplacentar ou transmamária da mãe para o feto/recém-nascido. Essa transferência tem grande importância porque causa efeitos no perfil imunológico do descendente, determinando sua susceptibilidade à infecção tardia, podendo levar a uma tolerância imunológica ou estimular o funcionamento de resposta a primeira exposição de células imunes ao agente infeccioso (da PAZ et al., 2017).

Em um modelo experimental, de Atallah et al. (2006), foi possível observar claramente que descendentes de mães infectadas por *S. mansoni* eram mais tolerantes aos antígenos do parasita do que os descendentes de mães não infectadas, apresentando uma resposta granulomatosa menor ou até ausente. A exposição congênita ao *S. mansoni* favoreceu a uma patologia exacerbada na infecção pós-natal. Porém, a amamentação em mãe esquistossomótica controlou a doença hepática crônica, sendo efetiva na imunomodulação do granuloma nos descendentes (SANTOS et al., 2016).

Essa relação de imunomodulação passada à prole foi também observada para antígenos heterólogos. Santos et al. (2010) avaliaram a influência, em murinos, da gestação e da amamentação em mães esquistossomóticas na resposta imune dos descendentes na vida adulta, a um antígeno não-relacionado. Em um modelo de imunização subcutânea com ovalbumina em adjuvante, camundongos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* apresentaram uma supressão na resposta imune humoral anti-OA e alta produção de IL-10. Já os amamentados por mães infectadas mostraram com maior capacidade de resposta a um antígeno não relacionado na vida adulta, apresentando notável aumento da produção de IL-2 e melhores níveis de anticorpos. Em outro estudo dos mesmos autores, foi demonstrado que, após o estímulo de OA, o contato prévio com o leite materno de mães infectadas aumentou a capacidade dos linfócitos B apresentarem antígenos, além de aumentar a expressão de CD40 e CD80 (SANTOS et al., 2014).

Em contraste, foi também demonstrado que o leite de mães esquistossomóticas pode modular a resposta imune dos descendentes contra antígenos homólogos e heterólogos através de citocinas IL-10 e aumento de células Treg (FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al., 2016). Isso ocorre porque o leite de mãe infectada expressa um perfil diferente de proteínas, que podem estar envolvidas na regulação do sistema imune dos descendentes a longo prazo, conferindo caráter protetor. Além disso, essas proteínas agem primariamente no metabolismo celular, tendo potencial terapêutico em doenças inflamatórias e autoimunes (HOLANDA et al., 2020). Holanda et al. (2019) relataram que o leite de mães infectadas por *S. mansoni* induziu a expressão de HDACs de várias classes, que estão envolvidas na redução de resposta inflamatória nos descendentes. De fato, o leite materno é um importante composto bioativo que pode atuar como precursor da imunidade do recém-nascido e dar assistência na maturação do seu sistema imune (BALLARD e MORROW, 2013). A infecção por *S. mansoni* muda a expressão de proteínas no plasma e possivelmente afeta a composição do leite materno, devido a parte das proteínas do leite serem derivadas do plasma (WALL et al., 2015).

Sendo assim, o leite de mães infectadas pode levar à modulação negativa de patologias relacionadas ao perfil Th1, como doenças auto-imune, entre elas a Diabetes Mellitus tipo 1.

2.4 Diabetes mellitus tipo I

A Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico com hiperglicemia consistente, que ocorre devido à deficiência na produção de insulina ou em sua ação. Pode ter como causa fatores genéticos, biológicos e ambientais. Em 2017, o Brasil ocupou o 4º lugar no ranking de países com maior número casos, e 3º lugar no ranking específico para diabetes autoimune (IDF, 2017). De acordo com a Vigitel 2019 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), a diabetes no Brasil possui uma prevalência de 7,4%, sendo sua maioria composta por mulheres e pessoas adultas com 65 anos ou mais. Na região Nordeste, o estado da Bahia possui o maior número de casos. É a região com a maior taxa de mortalidade (37,5) pela doença (MACEDO et al., 2019; DATASUS/MS, 2019).

O DM tipo 1 é autoimune, decorrente da falha no desenvolvimento e/ou manutenção da tolerância aos auto-antígenos expressos nas células beta das ilhotas de Langerhans, no pâncreas (FERNANDES et al., 2005). A presença de infiltrado inflamatório linfomononuclear, com predominância de células T, e ausência de células secretoras de insulina caracterizam o seu

quadro histológico (COPPIETERS et al., 2012). Macrófagos e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ atuam sinergicamente na destruição das células beta pancreáticas (KULMALA et al. 2000). Células dendríticas capturam auto-antígenos derivados da destruição das células beta e os apresenta aos linfócitos T, ativando-os. Linfócitos TCD4⁺ ativam células B específicas para antígenos das ilhotas, diferenciando-as em plasmócitos produtores de anticorpos (SOUSA et al., 2016). A presença de auto-anticorpos para antígenos das células das ilhotas são preditores da DM1 (ORBAN et al., 2009).

A partir da ativação de TCD4⁺, os macrófagos também são ativados e iniciam a secreção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-1 e óxido nítrico (NO) (ARNUSH et al., 1998; TISCH; WANG, 2009). A apresentação de antígenos pelas células dendríticas também ativa TCD8⁺, contribuindo para o processo citotóxico (WALLBERG; COOKE, 2013). Os linfócitos, principalmente os TCD8⁺, são as células mais importantes envolvidas na destruição autoimune. Linfócitos TCD8⁺ reconhecem e efetuam citólise, através da liberação de perforinas e granzimas, e induzem apoptose (KULMALA et al., 2000; FERNANDES et al., 2005). Com a diminuição do número de células beta e concomitante função, a produção de insulina é diminuída impedindo que o corpo utilize a glicose de forma adequada (CANIVELL; GOMIS 2014).

A patogênese da DM1 é associada aos perfis de produção de citocinas Th1 (produtoras de IFN- γ) e Th17 (produtora de IL-17), ligados à progressão e agravamento da doença (SOUSA et al., 2016). Também estão relacionados com o desenvolvimento da doença marcadores como anticorpo anti-ilhota (ICA), anti-insulina (IAA), ácido glutâmico descarboxila (GAD-65) e tirosinas fosfatases IA-2 e IA-2B (ORBAN et al., 2009), que podem estar presentes no soro do paciente recém-diagnosticado e de indivíduos predisponentes a desenvolver a DM1 (NUNES et al., 2017).

O melhor modelo para estudo da imunopatogênese da DM1 é a linhagem de camundongos non-obese diabetic (NOD/MrkTAC), descoberta em 1974, no Japão, através do acasalamento repetitivo entre cepas de irmãos e irmãs propensos a catarata, que fez surgir uma sublinhagem que desenvolveu espontaneamente a diabetes (MAKINO et al., 1980). Geneticamente isso é explicado: camundongos NOD/MrkTAC possuem um haplótipo exclusivo do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), o H2g7, que contribui para a susceptibilidade às doenças (catarata). Além disso, este mesmo haplótipo expressa uma molécula que contém uma substância não-aspartica ácida substituída na posição 57 da cadeia beta, alterando o repertório de peptídeos de ligação. Essa substituição também é vista nos locais de susceptibilidade humana

ao Diabetes tipo 1, o que pode ser a razão do NOD/MrkTAC mimetizar a doença humana (ANDERSON & BLUESTONE, 2005).

O infiltrado celular no pâncreas, principalmente de células TCD4⁺ e TCD8⁺, inicia na 3ª semana de idade, caracterizando o quadro pré-diabetes, a insulite, que inicia entre 3-4 semanas de idade e se agrava de acordo com a progressão e invasão nas ilhotas de Langerhans (DELOVITCH et al., 1997). A presença de anticorpos anti-insulina por si só não prediz a doença, mas a mudança de classe desses anticorpos de IgM para IgG está associada à predisposição ao desenvolvimento da DM1, ocorrendo gradualmente por volta da 8ª semana de vida do animal (HUTCHINGS et al., 1997). O pico de incidência da diabetes ocorre entre 16-20 semanas de idade e é manifestada após destruição de pelo menos 95% das células beta produtoras de insulina, sendo marcada por glicosúria moderada e glicemia ≥ 300 mg/dl, monitorada em intervalos semanais (LEITER et al., 2001; KIRSTEN et al., 2010). Sua incidência é 4 vezes maior em fêmeas do que em machos, e, em sua maioria, num ambiente livre de patógenos, sua sobrevida chega a 3-4 semanas após a primeira detecção de glicosúria (DELOVITCH et al., 1997).

Estudos com NOD/MrkTAC conseguiram demonstrar que durante o desenvolvimento da DM1, o padrão de resposta celular é Th1, com IL-2, TNF e IFN- γ como principais constituintes (BALDA e PACHECO-SILVA, 1999). É sabido que o desenvolvimento da diabetes requer a ação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, porém diferentes populações destas células atuam de forma diferente no progresso da doença. Estudos com células TCD8⁺CD122⁺ estabeleceram sua função efetora/memória, além de identificá-las como produtoras de altos níveis de IFN- γ , contribuindo para o desenvolvimento da doença (TAKAYAMA et al., 2000). Porém, outros estudos identificaram estas células de ocorrência natural, assim com células T reguladoras, mantendo a homeostase e suprimindo a resposta de células T (ENDHARTI et al., 2005).

Em estudo de Ardnt e colaboradores (2015) foi avaliada a função da subpopulação CD8⁺CD122⁺ em animais NOD, sendo observado que a presença destas células acelerou o aparecimento da diabetes (promoveu a progressão). Esse resultado foi dado pela falta de expressão da proteína PD-1⁺, que possui função reguladora, além da não detecção de IL-10, responsável por mediar o efeito regulatório de CD8⁺CD122⁺ (ENDHARTI et al., 2005).

2.5 Imunomodulação para Diabetes Mellitus e as helmintíases

Os mecanismos pelos quais infecções podem influenciar em doenças autoimune ainda não são esclarecidos, mas ao que parece, no caso da DM1, uma resposta Th2 é essencial para a prevenção da doença no hospedeiro, devido ao desvio de resposta específica às ilhotas para uma resposta Th2 e Treg não patogênica (ZACCONE et al., 2003).

Infecções por helmintos estimulam preferencialmente resposta tipo Th2/IL-10, agindo como reguladores do sistema imune do hospedeiro para sua sobrevivência no mesmo (SHIMOKAWA et al., 2020). Estudos com animais reforçam a hipótese que infecção por helmintos ou a imunização com seus produtos derivados conseguem prevenir a diabetes autoimune.

Utilizando os animais NOD, em um estudo de Saunders et al. (2007), foi observado que a infecção por *Heligmosomoides polygyrus* em camundongos NOD os fez desenvolver a diabetes autoimune em um grau menor, com produção de IL-4 e efeitos supressivos não-dependentes de IL-10 e células Treg. Além disso, neste mesmo estudo, a infecção por *Trichinella spiralis* conseguiu inibir o desenvolvimento da diabetes, com aumento de células T CD4+ e diminuição nos níveis de células T CD8+ e NK no pâncreas. Hubner et al. (2009) (2012) demonstraram proteção contra a diabetes autoimune dependente de TGF- β , através da infecção pelo nematódeo *Litomosoides sigmodontis*. Além disso, a administração do extrato bruto deste verme foi capaz de atrasar o início da doença, sendo associado ao aumento de células Treg.

Em uma pesquisa realizada por Ajendra et al. (2016), foi testada uma terapia de combinação de pró-insulina intranasal com injeção peritoneal de antígeno de *Litomosoides sigmodontis* em camundongos NOD, sendo verificado que houve melhora na eficácia do efeito protetor e que foi possível prevenir a progressão de uma insulite já em curso. Uma terapia similar foi realizada por Bresson et al. (2006), com a combinação de administração intranasal de pró-insulina e terapia anti-CD3 para esgotamento de células T, que resultou no aumento da remissão da diabetes de início recente, a partir da indução de células Treg que suprimiu células T específicas para autoantígenos. Porém, a depleção de células T pode prejudicar o sistema imunológico e aumentar o risco de infecções oportunistas, sendo assim mais viável a abordagem realizada por Ajendra e colaboradores (2016).

Com relação à infecção e administração de derivados do *S. mansoni*, em camundongos NOD/MrkTAC, houve redução da habilidade de células dendríticas (DCs) de secretarem mediadores inflamatórios (IFN- γ e IL-12), aumento dos níveis de CD4+Foxp3+ e Treg, e expansão da resposta Th2 com indução de ambiente regulatório por células T reguladoras

através do aumento da produção de TGF- β , IL-10, IL-4, IL-35 e galectina 3, conferindo prevenção do início da diabetes, apesar de ainda ter ocorrido infiltrado peri-insular (COOKE et al., 1999; ZACCONE et al., 2003; 2009; 2010).

Vale à pena ressaltar que a proteção à diabetes só foi possível se a infecção ou administração de derivados helmínticos ocorrer antes do desenvolvimento de insulite (BERBUDI et al., 2015). Sendo assim, a terapia tardia somente com antígenos dos helmintos não é suficiente para prevenir a perda das células das ilhotas pancreáticas. Então, é possível que o prévio contato com o leite materno de mães infectadas nos filhotes NOD apresente melhor resultado e consiga conter a infiltração de células inflamatórias, prevenindo a insulite e consequentemente a diabetes.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar se existe diferença nos parâmetros bioquímicos (glicosúria e glicemia), histológicos (grau de infiltrado de polimorfonucleares e linfócitos no pâncreas) e imunológicos (frequência de linfócitos TCD8+, TCD4+ e Treg e níveis de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-alfa, IL-17, IFN- γ), nos camundongos NOD/MrkTAC adultos, previamente amamentados em mães infectadas por *S. mansoni* em comparação aos NOD/MrkTAC adultos amamentados em mães não infectadas.

3.2 Objetivos específicos

Comparar em animais NOD/MrkTAC adultos, previamente amamentados em mães esquistossomóticas e em mães não infectadas quanto à:

- 3.2.1 Cinética dos níveis de glicose no sangue;
- 3.2.2 Grau do infiltrado inflamatório (polimorfonucleares, linfócitos, dano tecidual) no pâncreas;
- 3.2.3 Frequência de linfócitos T CD8+CD122+ em resposta ao mitógeno (Concanavalina A) ou não, nas células esplênicas;
- 3.2.4 Frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IL-10 e IL-17 em resposta ao mitógeno (Concanavalina A) ou não, nas células esplênicas;
- 3.2.5 Frequência de Treg (CD4+CD25+lowFoxP3+) em resposta ao mitógeno (Concanavalina A) ou não, nas células esplênicas;
- 3.2.6 Níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17 *in vitro* nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos em resposta a estímulo (Concanavalina A) ou não.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) e encontram-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) os quais são adotados como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-FIOCRUZ (**ANEXO A**).

4.2 Desenho de estudo

Realizamos um estudo experimental, onde um grupo de camundongos fêmeas foram infectadas com cercárias de *S. mansoni* e amamentaram camundongos NOD/MrkTAC. Outro grupo de fêmeas não infectadas amamentaram camundongos NOD/MrkTAC para termos de comparação dos resultados.

Os animais do estudo foram escolhidos de forma não aleatória, uma vez que a randomização não foi necessária já que as características dos mesmos são semelhantes, por apresentarem o mesmo tempo de vida, fazerem parte da mesma linhagem e serem criados nas mesmas condições alimentares. Devido ao processo utilizado, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção. Entretanto, não será possível afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis em seres humanos.

4.3 Local de estudo

As etapas do estudo relacionadas à infecção, acasalamento, manutenção das mães infectadas e manutenção dos filhotes, foram realizadas no Biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM /FIOCRUZ). Posteriormente, todos os procedimentos laboratoriais (cultura das células esplênicas, histopatológico, análises bioquímicas e dosagens de citocinas) foram realizados nas dependências do Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). As análises por citometria de fluxo foram realizadas no Núcleo de Integração Tecnológica (NIT) do CPqAM/FIOCRUZ.

4.4 Animais

Para formação dos grupos experimentais foram utilizados 12 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c com 4 semanas de idade para infecção com cercárias de *S. mansoni* e 10 animais não-infectadas. Dez camundongos machos da mesma espécie foram utilizados para o acasalamento. Os animais foram fornecidos pelo biotério do IAM/FIOCRUZ. Dez camundongos fêmeas e 5 machos geneticamente modificados NOD/MrkTAC, para obtenção dos filhotes NOD/MrkTAC, foram adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) com aproximadamente 4 semanas de idade. Sendo mantidos no Biotério Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ – Pernambuco, Brasil), sob condições padronizadas de temperatura ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (12 horas de claro/12 horas de escuro), recebendo água e alimentação *ad libitum*, com dieta padrão comercial (Nuvilab, Curitiba, PR).

4.5 Infecção e Parasitológico de fezes

A infecção da linhagem Balb/c foi realizada por via percutânea, com 20 cercárias de *S. mansoni* recentemente emitidas e obtidas de exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e infectados por miracídeos da cepa BH (Belo Horizonte). Após 45 dias de infecção, os camundongos fêmeas foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram confeccionadas 3 lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de Kato-Katz para determinação da infecção e quantificação do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

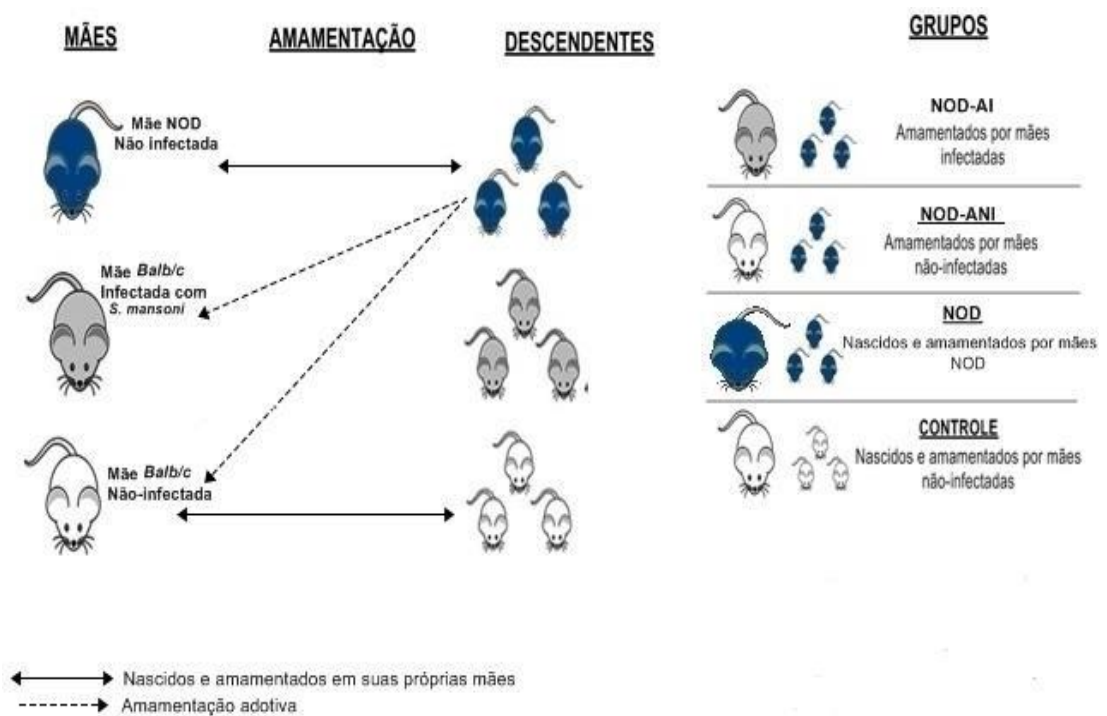
4.6 Sincronização do estro e acasalamento e formação dos grupos de estudo

Sessenta dias após a infecção, as fêmeas Balb/c infectadas, Balb/c não-infectadas ou NOD/MrkTAC foram submetidas à indução da sincronização do estro pelo método “Efeito Whitten”, onde as fêmeas foram expostas ao macho e odor da urina, promovendo a liberação de gonadotrofina e ativando de forma sincronizada o ciclo ovariano. As fêmeas foram acasaladas, sendo um macho para cada 2 fêmeas (1:2) de respectivo genótipo e a confirmação do acasalamento foi verificada através da presença do “plug” vaginal.

Imediatamente após o nascimento, foi realizada a amamentação (por 21 dias) adotiva, onde parte das descendentes fêmeas com genótipo NOD/MrkTAC foram amamentadas em mães da linhagem Balb/c-infectada pelo *S. mansoni* (grupo NOD-AI) e outra parte foi amamentada por mães Balb/c não infectadas (grupo NOD-ANI).

Como grupos controles, filhotes de mães Balb/c não infectadas permaneceram amamentados em suas próprias mães (grupo CONTROLE) e também houve um grupo de filhotes fêmeas nascido de mães com genótipo NOD/MrkTAC que amamentaram nas suas próprias mães (grupo NOD).

Figura 1. Formação dos grupos experimentais.



Fonte: Autora, 2022.

4.7 Glicemia e glicosúria

Os animais de todos os grupos foram sangrados, pela bochecha, a partir da 10ª semana e seguiram com sangria semanal até a 17ª semana de vida para dosagem da glicose no sangue, utilizando o glicosímetro Accu-Check Active (ROCHE). Amostras de urina também foram coletadas a partir da 10ª semana de vida até a 17ª semana, através de sua micção imediata diretamente na área de teste das fitas reagentes Uri Color Check (WAMA Diagnóstica). O critério estabelecido para estabelecimento da diabetes foi uma glicose no sangue >200mg/dl e glicosúria >300mg/dl (+++) (*Currents Protocols in Immunology*, 1997).

4.8 Análise histopatológica do pâncreas

Na 17ª semana de vida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o pâncreas retirado. Fragmentos foram selecionados e fixados em formalina tamponada. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos (4 µm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan) e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Foi avaliada a presença de infiltrado inflamatório, com a presença de linfócitos e macrófagos. Os achados foram avaliados subjetivamente, comparando-os com os controles.

4.9 Obtenção de células esplênicas e sobrenadante de cultura celular

Na 17ª semana de vida, o baço dos animais dos grupos (NOD-AI, NOD-ANI, NOD e CONTROLE) foi retirado assepticamente e macerado em meio RPMI 1640 (Sigma – Aldrich, St. Louis, Mo. US), acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina 100 mg/L), HEPES (1M) e L - glutamina (200 mM). Após centrifugação (1.500rpm por 10min. / 4°C), as hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 20 segundos. As células foram ressuspensas em meio RPMI, mantidas no gelo por 5 min para deposição do estroma e, após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, e submetido a uma nova centrifugação. As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (Sigma-Aldrich® Chemical, St. Louis, Mo., USA). A contagem das células e o teste de viabilidade foram realizados com o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10% (90µl de Azul de Trypan a 10% + 10µl de suspensão de células). As células foram

cultivadas (10×10^6 células/mL) em placas de 48-poços (Costar Cambridge, MA, USA) e incubados a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂, no intervalo de 48 horas, com ou sem estímulo mitogênico, Concanavalina A (5 µg/mL). Após este período, o sobrenadante foi coletado e congelado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. As células foram submetidas à imunofenotipagem, sendo divididas em tubos de poliestireno para marcações de superfície e marcações internas, sendo neste último acrescentado Golgi Stop e incubados em estufa de CO₂ a 37°C por um intervalo de quatro horas.

4.10 Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem

Para marcação de superfície (CD8 (APC) e CD122 (PE)) foi adicionado aos tubos contendo a suspensão de células esplênicas 500 µL de PBS+BSA 0,5% com posterior centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e então foi adicionado 100 µL de PBS+SBF 2% e 0,6 µL de cada anticorpo, sendo incubado por 30 minutos a 4°C no escuro. Passado o tempo de incubação, os tubos foram lavados uma vez com 1 mL de PBS+2% de SBF. Os tubos foram fixados para posterior leitura, através da adição de 100 µL fixador (formaldeído 2%) e incubação por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, seguido de lavagem com 500 µL de PBS+BSA 0,5% e ressuspensão em 300 µL de PBS+SBF 2%.

Para a marcação de células CD4 produtoras de IL-10, após a incubação com Golgi Stop, foi separado em 2 tubos de citometria de poliestireno (150 µL em cada tubo) e completou-se o volume para 4 mL com PBS+BSA 0,5% estéril e gelado, seguida de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos sob a temperatura de 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 100 µL de PBS+2% de SBF. Foi acrescentado ao tubo 0,5 µL do anticorpo anti-CD4 (FITC), sendo incubado por 30 minutos a 4°C no escuro. Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas uma vez com 1 mL de PBS+BSA 0,5% e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 150 µL de solução fixadora, sendo incubado por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após este tempo, foi realizada lavagem com 1 mL de Perm-Wash (solução de permeabilização diluída 10x - eBioscience™) e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se o processo mais 1x. Então, foi adicionado 100 µL de Perm-Wash junto de 1,3 µL do anticorpo IL-10 (PE) e incubado por 30 minutos a 4°C em temperatura ambiente. Posteriormente as células foram lavadas com 1 mL de Perm-Wash. Após a centrifugação o

sobrenadante foi descartado e então foi adicionado 300 µL de PBS+SBF 2%, para guardar em geladeira até o momento da leitura no equipamento.

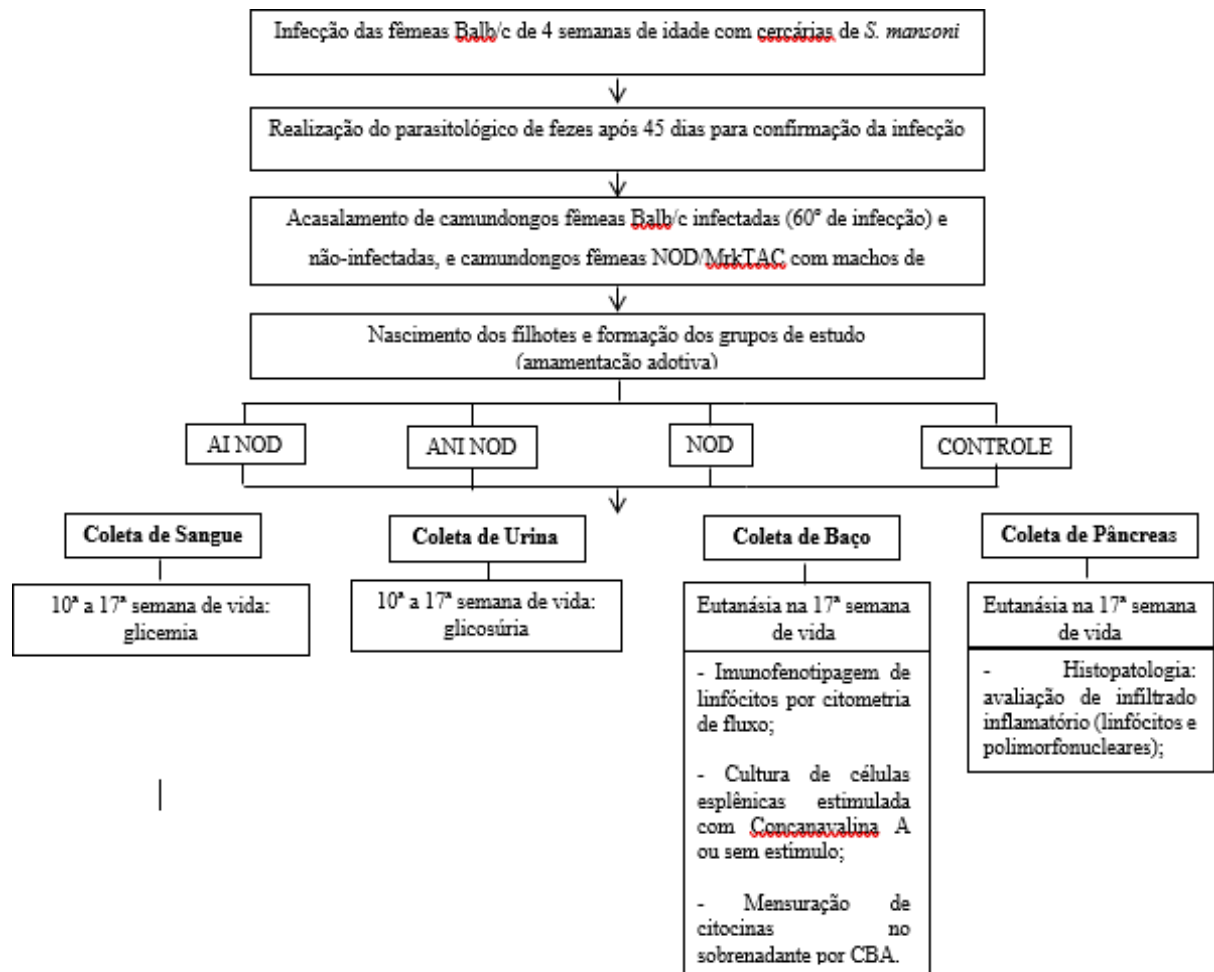
Para marcação CD4 (FITC), IL-17 (PE) e FoxP3 (Alexa Fluor 647) foi utilizado o kit Th17/Treg (BD Pharmingen™) e o volume da suspensão de células foi transferido para placa de 96 poços, seguido de centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e então foi adicionado 200 µL de solução fixadora gelada (Mouse FoxP3 Fixation Concentrate 20x – BD Pharmingen), homogeneizado e incubado por 15 minutos à 4°C no escuro. Após a incubação, foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos e desprezada a solução fixadora. Então foi adicionado 200 µL de Perm-Wash (Mouse FoxP3 Permeabilization Concentrate 5x – BD Pharmingen) e centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 200 µL de Perm-Wash novamente, seguido de incubação por 30 minutos à 37°C no escuro. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. Foi adicionado 200 µL de PBS+BSA 0,5% e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após desprezado o sobrenadante, o processo foi repetido mais uma vez. Então foi adicionado 20 µL do Mouse Th17/Treg Cocktail (CD4, IL-17 e FoxP3) e incubado por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após incubação foi adicionado 200 µL de PBS+BSA 0,5% e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após desprezado o sobrenadante, o processo foi repetido mais uma vez. Após desprezar o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de PBS+BSA 0,5% e guardado em geladeira até o momento da leitura no equipamento.

Os eventos foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest™ Pro (BD-Pharmingen®, San Diego, CA, USA).

4.11 Dosagens das citocinas

Os sobrenadantes da cultura das células esplênicas foram descongelados à temperatura ambiente e submetidos à detecção das citocinas IL-2 (limiar: 4.96), IL-4 (limiar: 2.46), IL-6 (limiar: 2.94), IL-10 (limiar: 1.95), IFN- γ (limiar: 3.13), IL-17 (limiar: 1.81) e TNF- α (limiar: 3.55) por citometria de fluxo através de partículas (bead) ligadas com PE padrão, (BD Biosciences) por meio da técnica: “Cytometric Bead Array” (CBA). O procedimento foi realizado conforme a descrição do manual de instrução do BD™ Cytometric Bead Array (CBA) for Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. O Software BD CellQuest™ foi utilizado para análise das amostras e formatação, e análise subsequente por meio do Software BD™ CBA.

4.12 Fluxograma dos procedimentos



4.13 Análise estatística

Para o resultado do acompanhamento glicêmico utilizou-se a análise de variância para dados paramétricos (ANOVA) dupla-entrada (tratamento x tempo) a fim identificar quais grupos diferiram entre si, seguido do teste de Wilcoxon para determinar a significância entre os grupos. Para os resultados das dosagens de citocinas e imunofenotipagem, a comparação entre os diferentes grupos de animais foi feita utilizando-se análise de variância para dados paramétricos (ANOVA), unidirecional seguida do teste de Tukey para comparação múltipla. O programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos será o Graph Pad Prism 5.0 e os resultados foram significantes quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

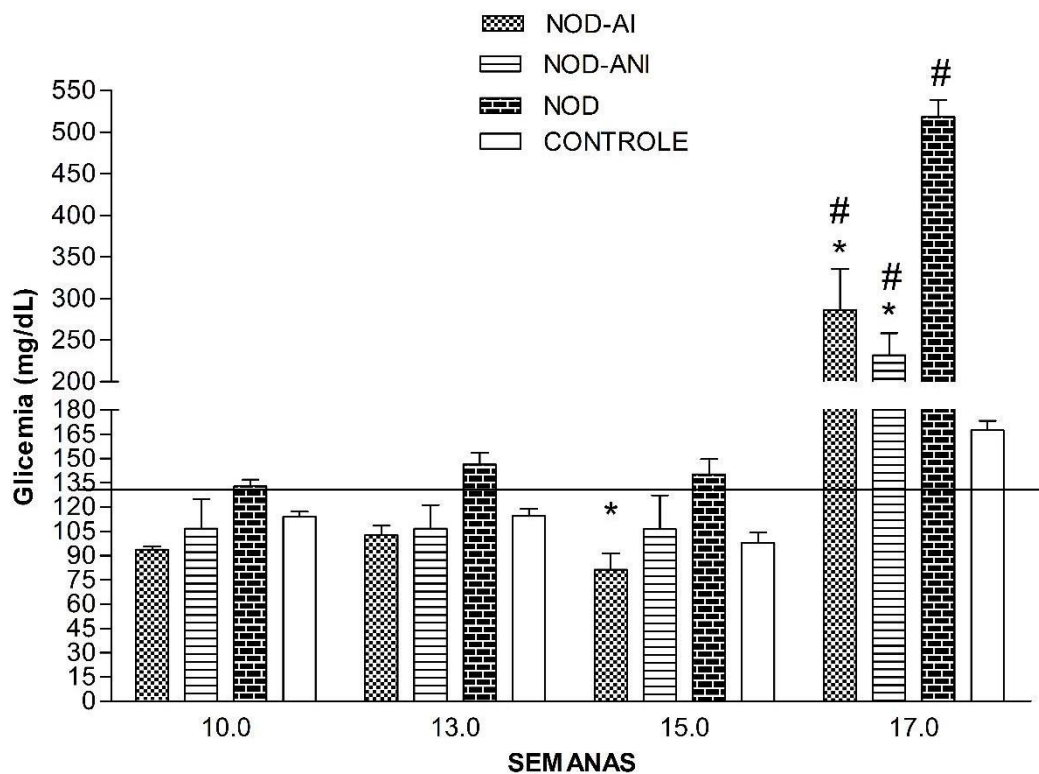
5.1 Efeito da amamentação em mães esquistossomóticas nos níveis de glicose no sangue e urina dos descendentes NOD

Logo após o nascimento, os animais tiveram suas mães trocadas, passando por amamentação adotiva e formação dos diferentes grupos de estudo. De acordo com *Current Protocols in Immunology* (LEITER, 1997), o monitoramento para estabelecer a curva de incidência da diabetes tipo 1 deve iniciar a partir da 10ª semana de vida, através de testes com tiras reagentes para sangue (glicemia) e urina (glicosúria). Esta análise foi realizada nos animais de todos os grupos.

Como ilustrado na Figura 1, a glicemia na 10ª semana nos animais NOD amamentados em mães infectadas (NOD-AI), NOD amamentados em mães não infectadas (NOD-ANI) e Balb/c amamentados em suas próprias mães (CONTROLE) estava na média considerada normal, não-diabéticos. O grupo de animais NOD amamentados em suas próprias mães (NOD) também possuíam valores normais, porém com níveis maiores quando comparados aos demais grupos, com aumento progressivo nas semanas subsequentes. Na 15ª semana foi possível observar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na glicemia apenas no grupo NOD-AI quando comparado ao NOD. Na mensuração da 17ª semana, os animais dos grupos experimentais (NOD-AI e NOD-ANI) e NOD foram diagnosticados para diabetes, tendo o grupo NOD a maior mensuração glicêmica ($\sim 518\text{mg/dL}$), sendo o dobro, quando comparada aos grupos NOD-AI e NOD-ANI ($\sim 259\text{mg/dL}$) ($p < 0,001$). Os níveis de glicose na urina (glicosúria) partiram de negativo para +++ no momento que a glicose no sangue atingiu $> 200\text{mg/L}$. Como esperado, os animais do grupo CONTROLE mantiveram seus níveis glicêmicos normais e não desenvolveram a doença.

Figura 2 – Acompanhamento semanal da glicemia. Camundongos fêmeas NOD amamentados em mães Balb/c infectadas pelo *S. mansoni* (NOD-AI), amamentados em mães não infectadas (NOD-ANI) ou nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) e (CONTROLE), foram acompanhados semanalmente, da 10^a até 17^a semana de vida, para dosagem da glicose, no sangue, utilizando o glicosímetro Accu-Check Active (ROCHE). Os resultados representam a média dos valores da diferença entre as medidas de 5 animais/grupo $\pm$ erro padrão. # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo Controle

* $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NOD.



5.2 A amamentação adotiva levou a diminuição da frequência de células CD4+IL17, mas quando em mães infectadas houve aumento na frequência de células CD4+IL10+ e CD8+CD122+

A frequência de células T foi avaliada em células esplênicas dos animais estudados por citometria de fluxo. As células foram obtidas das culturas celulares (48h) apenas com meio de cultivo (basal) ou acrescentado de mitógeno (Con-A). Foi realizada dupla marcação com anticorpos monoclonais para as moléculas CD8 e CD122, CD4 e IL-10, CD4 e IL-17 e CD4 e FoxP3).

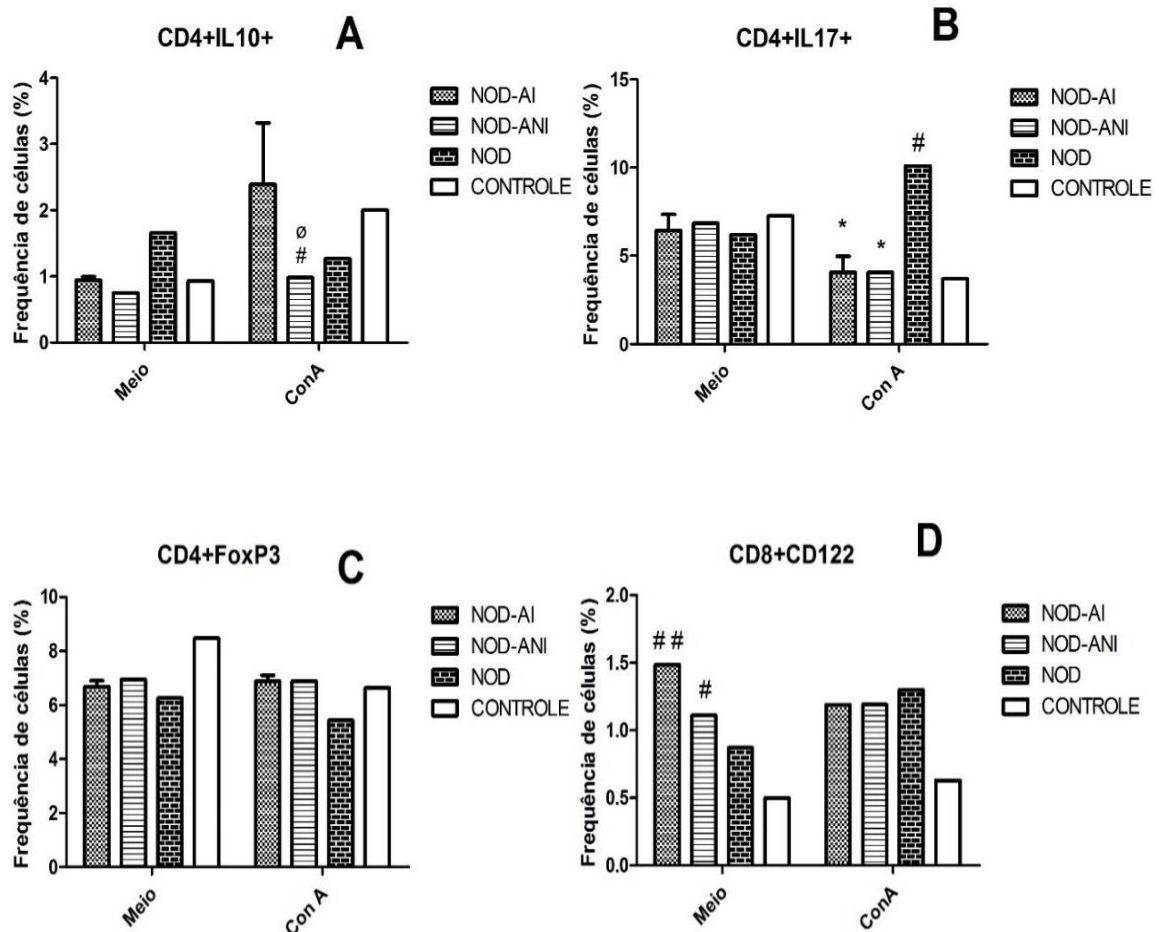
Com relação à frequência basal de células CD4+ produtoras de IL-10 (Figura 2A), não houve diferença estatística entre os grupos estudados (NOD-AI= 0.94%; NOD-ANI =0.75%; NOD= 1.60%; CONTROLE =0.93%). Quanto à cultura estimulada com Con A, foi possível observar menor frequência de células CD4+IL-10+ nos animais NOD-ANI, em relação ao CONTROLE e ao grupo NOD-AI. Embora sem significância estatística, houve maior frequência nos animais amamentados em mães infectadas comparados aos animais NOD (NOD-AI= 2.39%; NOD-ANI =0.98%; NOD= 1.27%; CONTROLE =2%).

A frequência basal de células CD4+ produtoras de IL-17 (Figura 2B), entre os grupos foi similar (NOD-AI= 6.43%; NOD-ANI = 6.84%; NOD= 6.2%; CONTROLE =7.27%). Do contrário, com estímulo mitogênico, a frequência de CD4+ produtoras de IL-17 foi significativamente ($p<0.05$) maior no grupo NOD, quando comparado aos grupos experimentais e grupo CONTROLE (NOD-AI= 4.06%; NOD-ANI =4.07%; NOD= 10.09%; CONTROLE =3.71%).

A frequência das células CD4+FoxP3+CD25+ (Figura 2C) não foi diferente para o cultivo com meio (NOD-AI= 6.68%; NOD-ANI= 6.95%; NOD= 6.25%; CONTROLE = 8.48%), bem como com a adição do mitógeno na cultura para os grupos estudados (NOD-AI= 6.89%; NOD-ANI = 6.89%; NOD= 5.43%; CONTROLE = 6.64%).

Em relação às células CD8+CD122+, cultivo apenas em meio, houve uma maior frequência (Figura 2D) nos animais amamentados em mães infectadas (3 vezes) e não infectadas (2 vezes) quando comparado aos animais CONTROLE (NOD-AI= 1.48%; NOD-ANI =1.10%; NOD= 0,87%; CONTROLE =0.5%). Frente ao estímulo mitogênico, a frequência destas células para todos os grupos não teve diferença estatística (AI NOD= 1.19%; ANI NOD =1.19%; NOD= 1.3%; CONTROLE =0.63%).

Figura 3 – Frequência de células esplênicas CD4+IL10 (A), CD4+IL17 (B), CD4+FoxP3 (C) e CD8+CD122+ (D) em camundongos fêmeas NOD amamentados em mães Balb/c infectadas pelo *S. mansoni* (AI NOD), amamentados em mães não infectadas (ANI NOD) ou nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) e (CONTROLE). 10×10^6 células cultivadas por 48h com meio RPMI e ConA e marcadas com anticorpos anti-CD8 (APC), anti-CD122 (PE), anti-CD4 (FITC), anti-IL10 (PE), anti-IL17 (PE), anti-FoxP3 (Alexa Fluor 647) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados representam a média das frequências celulares no “pool” dos baços de 5 animais/grupo $\pm$ desvio padrão. $\emptyset$ $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NOD-AI. # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo Controle. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NOD.



5.3 A amamentação adotiva diminuiu a produção de IL-17 e IFN- γ nos descendentes NOD, mas quando em mães infectadas foi acompanhada de maior produção de IL-10

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos, dos diferentes grupos de estudos, foram analisados quanto ao conteúdo de citocinas após cultivo com ou sem mitógeno. Os níveis basais de IL-2 (Figura 3A) foram muito baixos e semelhantes entre os grupos NOD, experimentais e CONTROLE. Para estímulo mitogênico, quando comparado com meio, houve elevada síntese de IL-2 no grupo CONTROLE que foi significativamente menor nos grupos NOD-AI e NOD-ANI e NOD. Quando comparado ao grupo NOD, houve maior produção desta citocina nos grupos AI ($p < 0,001$) e ANI NODs ($p < 0,01$).

A produção basal de IL-4 (Figura 3B) no grupo CONTROLE e outros grupos foram semelhantes. No estímulo com o mitógeno, foi encontrado nível elevado desta citocina no grupo CONTROLE, a qual foi significativamente menor nos NOD-AI, NOD-ANI e NOD. As condições de cultura sem estímulo mitogênico renderam baixos níveis de IL-6 (Figura 3C) e sem diferença estatística. Quando estimuladas com ConA, foi observada uma produção significativamente diminuída nos animais do grupo NOD-ANI em relação ao grupo CONTROLE e NOD ($p < 0,01$).

A produção de TNF-alfa (Figura 3D) na cultura sem estímulo foi similar entre os grupos NOD, AI-NOD e ANI-NOD, quando comparado ao CONTROLE. Houve menor produção desta citocina no grupo NOD-ANI quando comparado ao grupo NOD-AI ($p < 0,05$). Frente ao mitógeno, houve produção semelhante desta citocina tanto pelos controles quanto pelos animais alvo, tendo o grupo NOD-ANI menor produção quando comparado ao grupo NOD-AI ($p < 0,05$).

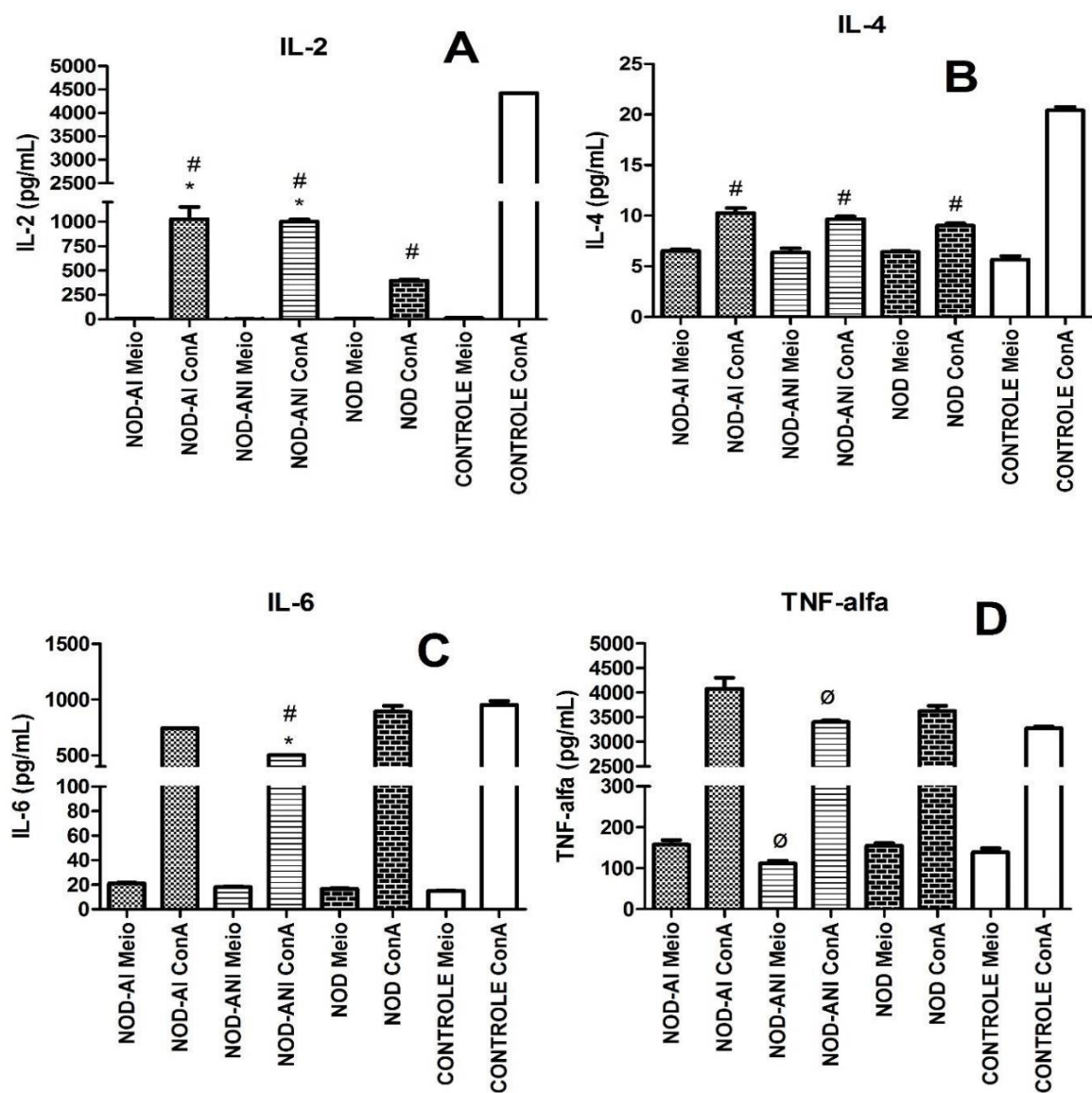
A figura 3E mostra a análise da produção de IFN- γ . Nas culturas sem estímulo foram obtidos níveis quase indetectáveis desta citocina em todos os grupos de estudo, porém com elevada síntese no grupo NOD quando comparado com os experimentais AI ($p < 0,01$) e ANI NODs ($p < 0,001$). Sob estímulo com Con-A, uma notável e significativa síntese de IFN- γ foi observada no grupo CONTROLE, quando comparado ao meio ($p < 0,001$). Comparando a este último grupo, houve uma diminuição sutil no grupo NOD (~23%), seguido de menores níveis no grupo NOD-ANI (~46%) e diminuição mais intensa no grupo NOD-AI (~63%).

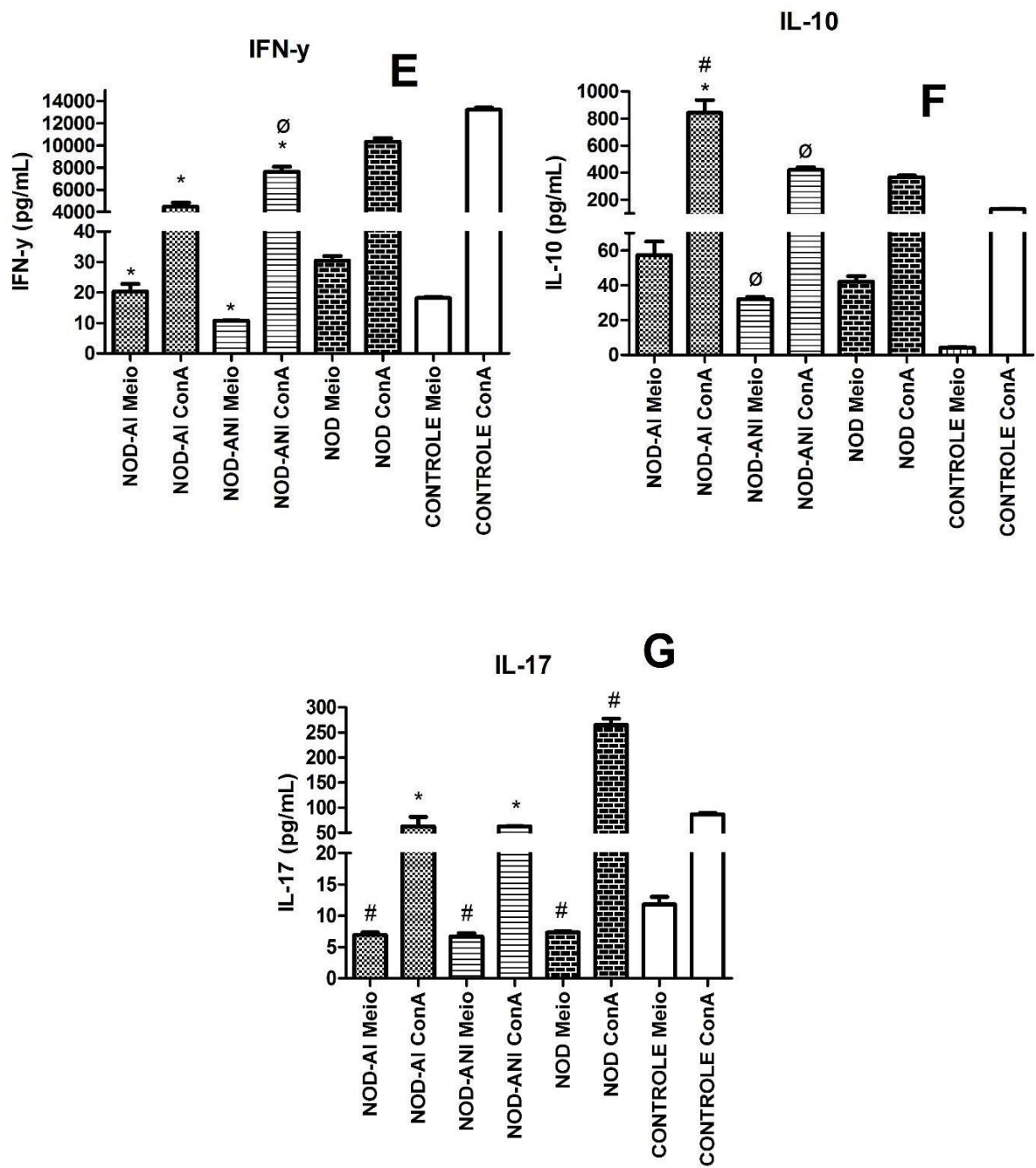
Do contrário, para a IL-10, frente ao estímulo mitogênico, houve intensa produção de IL-10 pelo grupo NOD-AI quando comparado tanto ao grupo CONTROLE e NOD ($p < 0,001$)

quanto ao experimental NOD-ANI ($p<0,01$). Em relação à produção basal (Figura 3F), também foram encontrados altos níveis desta citocina no grupo NOD-AI quando comparado ao grupo NOD-ANI ($p<0,05$).

Quando avaliada a dosagem de IL-17 (Figura 3G), houve produção basal no grupo CONTROLE, quando comparado ao meio. Os outros grupos NOD-AI, NOD-ANI e NOD também secretaram a citocina, porém em quantidade significativamente ($p<0,001$) menor em relação ao controle. No estímulo com Con-A, foi encontrado nível elevado e significativo ($p<0,001$) desta citocina no grupo NOD, tanto comparado ao CONTROLE quanto aos grupos.

Figura 4 – Níveis das citocinas IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), TNF (D), IFN- γ (E), IL-10 (F) IL-17 (G) em camundongos fêmeas NOD amamentados em mães Balb/c infectadas pelo *S. mansoni* (AI NOD), amamentados em mães não infectadas (ANI NOD) ou nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) e (CONTROLE). 10 $\times$ 10⁶ células estimuladas com RPMI e ConA. As citocinas foram quantificadas no sobrenadante depois de 48 horas por *Cytometric Bead Array* (CBA). Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão. $\emptyset$ $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NOD-AI. # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo Controle. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo NOD.



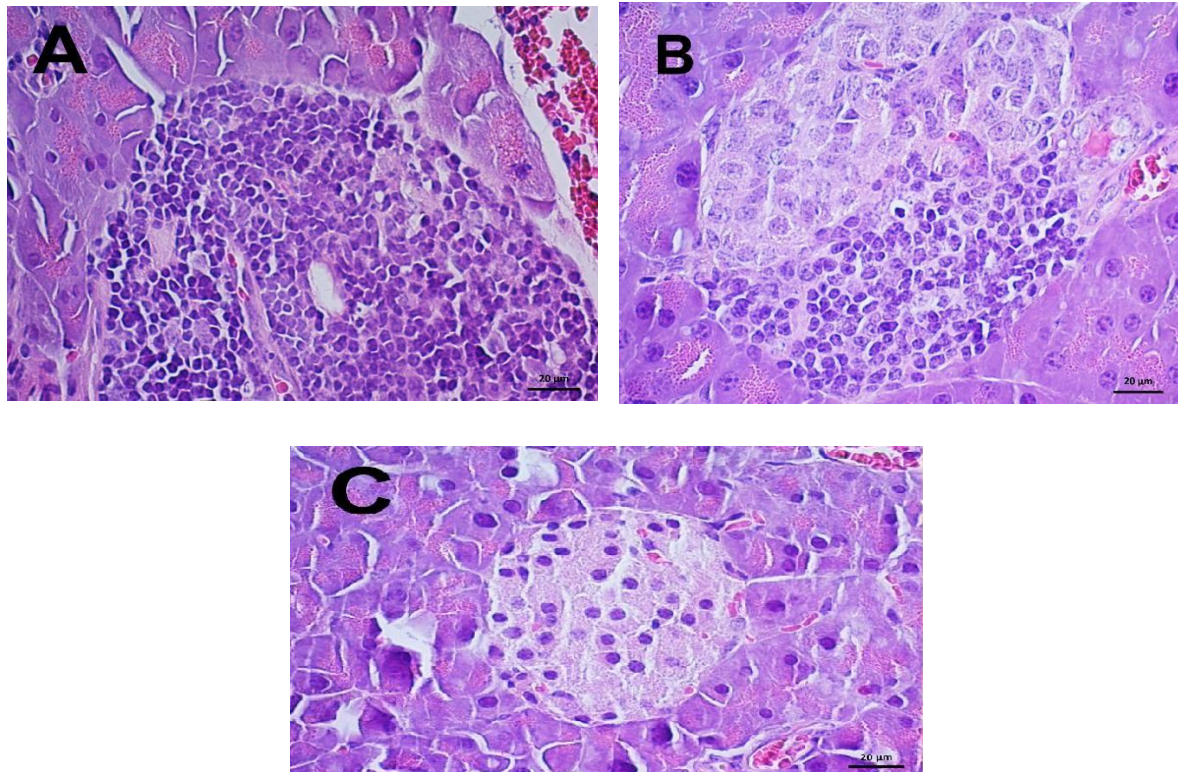


5.4 A amamentação adotiva levou a diminuição da proporção de alterações degenerativas das ilhotas pancreáticas nos descendentes NOD

A histopatologia foi realizada nos grupos NOD e NOD-AI. Foi observado nas amostras de camundongos do grupo NOD a alta presença de alterações reativas e degenerativas nas ilhotas pancreáticas, caracterizada por visualização de maior número de células hipercromáticas, porém com ausência de infiltrados leucocitários (Figura 5A). Nos animais que receberam leite de mães infectadas (NOD-AI) também foram encontradas alterações reativas e degenerativas, porém em menor proporção quando comparadas aos animais do grupo NOD (menor associado a um processo reativo), caracterizado por núcleos aumentados em tamanho, cromatina clara, anisocitose e nucléolos evidentes (Figura 5B).

Como esperado, nos animais do grupo CONTROLE (Figura 5C) foram observadas características citomorfológicas normais.

Figura 5 – Análise histopatológica do pâncreas de camundongos fêmeas NOD nascidos/amamentados em suas próprias mães (NOD) (A), amamentados em mães infectadas (NOD-AI) (B) e camundongos fêmeas Balb/c nascidos/amamentados em suas próprias mães (CONTROLE) (C). O grau de insulite foi observado em cortes corados com HE (hematoxilina-eosina).



6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a influência da amamentação adotiva em mães infectadas por *S. mansonii* na diabetes autoimune, na vida adulta, utilizando descendentes NOD. Pôde ser observado que a amamentação em mães infectadas proporcionou diminuição nos níveis glicêmicos dos descendentes, mesmo não prevenindo a diabetes, tendo destaque pela alta produção de IL-10, acompanhada de notável diminuição de IFN- γ e IL-17 e maior frequência de células potencialmente regulatórias CD8+CD122+.

Com a finalidade de mimetizar o perfil da doença, nós utilizamos camundongos NOD, os quais tiveram os parâmetros de perfil autoimune Th1/Th17 (AUBIN et al. 2022) dentro do esperado (alto índice glicêmico, elevados níveis de IL-17 e IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10) (JAYASIMHAN et al., 2014). Com relação à glicemia, nós estamos cientes que nos animais do grupo CONTROLE, foi observado um nível mais elevado que o esperado (164 mg/dL de glicemia) na 17ª semana. Este fato pode ser devido a fatores externos nutricionais ou condições inerentes da linhagem. Essa teoria é corroborada por Petri e colaboradores (2020), ao avaliarem as alterações no perfil bioquímico de roedores de laboratório alimentados com rações contendo diferentes fontes lipídicas e métodos de

esterilização, sendo concluído que diferenças genéticas, fenotípicas e ambientais podem ocasionar divergências nos valores de referência de cada biotério, além da dificuldade de coleta das amostras e técnica laboratorial para pequenos volumes (ALMEIDA et al., 2008).

A análise histopatológica confirma o quadro diabético dos animais estudados. Ao analisarmos a correlação entre o nível de índice glicêmico e o processo degenerativo observado nas ilhotas pancreáticas, é possível observar uma tendência de aumento na intensidade do processo inflamatório, assim como sua diminuição enquanto níveis glicêmicos menores, o que corrobora com Berbert e colaboradores (2019) em estudo de determinação da curva glicêmica e alterações histológicas de camundongos NOD. Dessa forma, aqui foi observada uma menor proporção de processo degenerativo nas ilhotas pancreáticas dos animais que receberam o leite de mães infectadas (NOD-AI), diretamente proporcional aos seus níveis glicêmicos, que também foram menores.

De fato, a amamentação adotiva foi um fator protetor para o desenvolvimento da diabetes autoimune. Aqui, o contato com o leite de mães adotivas não infectadas levou ao redirecionamento para citocinas com perfil Th2, com a diminuição nos níveis de IL-17, IFN- γ , IL-6. Corroborando com estes dados, foi visto por XIAO et al. (2018) que os oligossacarídeos

presentes no leite humano foram capazes de retardar e suprimir o desenvolvimento da diabetes tipo 1, além de reduzir o grau de insulite, em camundongos NOD, a partir do aumento de IL-4 e TNF (associada a diminuição da destruição das ilhotas), diminuição de IFN- γ e IL-17 (ambos promovem inflamação pancreática) e alterações na microbiota. Adicionalmente, neste estudo citado foi considerada que a intervenção realizada foi curta (4-10 semanas) e que uma intervenção dietética mais longa (aleitamento materno) poderia trazer resultados melhores.

Muitos estudos visam entender os mecanismos que influenciam na proteção para a diabetes autoimune a partir da infecção por *S. mansoni* (COOKE et al., 1999; ZACCONE et al., 2003; 2009), assim como seu fenômeno regulatório passado à prole, através da sensibilização imunológica perinatal (WANG et al., 2017; LACCORCIA et al., 2018; da PAZ et al., 2017). O potencial imunomodulador do leite de mães esquistossomóticas já foi demonstrado experimentalmente, com aumento na produção de citocinas regulatórias (IL-10) (HOLANDA et al. 2019), e de Th2 (TGF- β , IL-5) (SILVA et al., 2021) e também na frequência de células Tregs (SANTOS et al., 2016). Aqui, a amamentação em mães infectadas proporcionou nos descendentes NOD supressão do perfil Th1/Th17 e redirecionamento para Th2/IL-10. Realmente, produção de IL-10 foi detectada no sobrenadante de cultura e em células CD4+IL-10+. A IL-10 é produzida por macrófagos, mas também células Th2 e Treg e está diretamente relacionada com a supressão da resposta Th1/IFN- γ (MITCHELL et al., 2017). Estes dados sugerem um perfil regulatório dependente de IL-10, que induz imunossupressão da resposta inflamatória vista no grupo controle NOD, porém sem participação das células CD4+/Foxp3+ (FERNANDES et al., 2018).

É importante destacar que, embora não tenhamos o perfil regulatório das células TCD8+ completo (CD8+CD122+CD25+), a maior frequência basal de células CD8+CD122+ e maior produção de IL-2 por amamentados em mães infectadas, leva a crer na participação destas células no fenômeno regulatório. De fato, células T CD8+CD122+ já foram identificadas como supressoras de respostas de células T, sendo IL-10 um importante mediador da sua atividade supressiva (ENDHARTI et al., 2005). O que ocorre é que células T CD8+ virgens de baixa avidéz (diferentemente de células T CD8+ reativas, que possuem alta avidéz) se diferenciam em células autorreguladoras (CD122) que funcionam como um feedback negativo, suprimindo e destruindo células APCs no pâncreas, visando combater a progressão da doença (TSAI et al., 2010). O desenvolvimento destas células é regulado por IL-2, através de uma interação homeostática (níveis mais altos de IL-2 aumentam a potência reguladora, porém essa potencialização resulta na supressão da ativação de células T CD4+ e formação e T CD8+ reguladoras) (SHAMELI et al., 2013).

Sendo assim, é perceptível o redirecionamento de resposta para Th2 nos descendentes que recebem leite de mães infectadas, mas algo além dos antígenos parece estar modulando esta resposta, independente da infecção, pois não foi possível observar diferença significativa quando comparado com a amamentação em não infectadas. Esses dados podem corroborar com a hipótese de que a amamentação está associada com a melhora da integridade intestinal, um componente essencial que vem sendo estudado por sua capacidade de moldar a progressão da diabetes autoimune, principalmente devido à mucosa intestinal abrigar mais linfócitos do que todos os órgãos linfoides combinados (SANE et al., 2018; MIRANDA et al., 2019). Contudo, este efeito pode ser por vias diferentes e em condições melhores quando o leite é proveniente de mães esquistossomóticas. Estes achados auxiliam no esclarecimento do uso do leite destas mães na interação parasita-hospedeiro e como ferramenta imunomodulatória, ainda no início da vida.

7 CONCLUSÕES

- Existe uma correlação entre o nível glicêmico e o processo degenerativo observado nas ilhotas pancreáticas. A amamentação adotiva proporcionou diminuição de alterações reativas e degenerativas nas ilhotas pancreáticas e consequentemente menores índices glicêmicos.
- A amamentação adotiva levou a diminuição da frequência de células CD4+IL17, assim como diminuição dos níveis de IL-17 e IFN- γ
- A amamentação por mães infectadas aumentou a frequência de células potencialmente regulatórias (CD8+CD122+) e também de células CD4+IL10+, acompanhada de maior produção de IL-10.
- A amamentação adotiva foi capaz de suprimir a resposta inflamatória pancreática e modular negativamente o desenvolvimento da diabetes através de supressão do perfil Th1/Th17 e redirecionamento para Th2/IL-10, porém sem participação das células CD4+/Foxp3+.

REFERÊNCIAS

- AJENDRA, J. et al. Combination of work antigen and proinsulin prevents type 1 diabetes in NOD mice after the onset of insulinitis. **Clinical Immunology**, v. 164, p. 119-122, 2016.
- ALMEIDA, A. S. et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **J Bras Patol Med Lab**. v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008
- ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: A model of immune dysregulation. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 447–485, 2005.
- ARAUJO, M. I. et al. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 27-32, 2004.
- ARDNT, B. et al. CD8⁺ CD122⁺ PD-12 effector cells promote the development of diabetes in NOD mice. **J. Leukoc. Biol.** 97: 111–120; 2015.
- ARNUSH, M. et al. Potential Role of Resident Islet Macrophage Activation in the Initiation of Autoimmune Diabetes. 2020.
- ATTALLAH, A. M. et al. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 137–145, 2006.
- AUBIN A-M. et al. The NOD Mouse Beyond Autoimmune Diabetes. **Front. Immunol.** 13:874769, 2022.
- BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 175–180, 1999.
- BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatr Clin North Am** 2013; 60: 49–74.
- BERBETI, L. R. et al. Influência da temperatura e alterações na curva glicêmica de camundongos NOD produzidos no Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos da Fundação Oswaldo Cruz. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v.7 n.2, pg. 114-121, 2019.
- BERBUDI, A. et al. Parasitic helminths and their beneficial impact in type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, p. 238-250, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Educação em saúde para o controle da esquistossomose / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- BRESSON, D. et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1371-1381, 2006.

- CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, p. 109–117, 2008.
- CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 403–407, 2014.
- CARVALHO, O. S. et al. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: **Editora FIOCRUZ**, 2008, pp. 85-145.
- CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, p. 1–10, 2014.
- CLEENEWERK, L. et al. Clinical use of *Schistosoma mansoni* antigens as novel immunotherapies for autoimmune disorders. **Frontiers on Immunology**, v. 11, article 1821, 2020.
- COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.
- COOKE, A. et al. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 4, p. 169–176, 1999.
- COPPIETERS, K. T. et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 1, p. 51–60, 2012.
- CORREALE, J.; FAREZ, M. F. Parasite Infections in Multiple Sclerosis Modulate Immune Responses through a Retinoic Acid-Dependent Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 7, p. 3827–3837, 2013.
- DA PAZ, V. R. F.; SEQUEIRA, D.; PYRRHO, A. Infection by *Schistosoma mansoni* during pregnancy: Effects on offspring immunity. **Life Sciences**, v. 185, n. May, p. 46–52, 2017.
- DELOVITCH, T. L.; SINGH, B. Erratum: The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: Immune dysregulation gets the NOD (Immunity (1997) 7 (727-738)). **Immunity**, v. 8, n. 4, p. 530, 1998.
- DEOL, A. K. et al. Schistosomiasis — Assessing progress toward the 2020 and 2025 global goals. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 26, p. 2519–2528, 2019.
- EISSA, M. M. et al. Anti-arthritic activity of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* derived-antigens in adjuvant arthritis in rats: Role of FOXP3+ treg cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–20, 2016.
- ELLIOTT, D. E.; WEINSTOCK, J. V. Helminthic therapy: Using worms to treat immune-mediated disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 666, p. 157–166, 2009.
- ENDHARTI, A. T., et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. **J. Immunol.** 175, 7093–7097, 2000.

ERB, K. J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? **Trends in Immunology**, v. 30, 2009.

FERNANDES, A. P. M. et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus tipo 1. **Revista Latino-am Enfermagem**, v. 13, 2005.

FERNANDES, E. DE S. et al. Maternal schistosomiasis: IL-2, IL-10 and regulatory T lymphocytes to unrelated antigen in adult offspring mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 4, p. 546–549, 2018.

FLEMING, J.; FABRY, Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 61, n. 2, p. 85–89, 2007.

FRIEDMAN, J. F. et al. Schistosomiasis and pregnancy. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 159–164, 2007.

HARNETT, W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 130–136, 2014.

HEYLEN, M. et al. Worm proteins of *Schistosoma mansoni* reduce the severity of experimental chronic colitis in mice by suppressing colonic proinflammatory immune responses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–16, 2014.

HOLANDA, G. C. R. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomal mice differentially alters the expression of histone deacetylases (HDACs) in adult offspring. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 12, p. 1–10, 2019.

HOLANDA, G. C. R. et al. Whey milk proteomics from *Schistosoma mansoni*-infected mice reveals proteins involved in immunomodulation of the offspring. **Parasitology Research**, v. 119, n. 5, p. 1607–1617, 2020.

HUBNER, M. P. et al. Inhibition of type 1 diabetes in filaria-infected non-obese diabetic mice is associated with a T helper type 2 shift and induction of FoxP3⁺ regulatory T cells. **Immunology**, v. 127, p. 512–522, 2009.

HUBNER, M. P. et al. Helminth Protection against Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice Is Independent of a Type 2 Immune Shift and Requires TGF- β . **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 559–568, 2012.

HUTCHINGS, P.; TONKS, P.; COOKE, A. Effect of MHC transgene expression on spontaneous insulin autoantibody class switch in nonobese diabetic mice. **Diabetes**, v. 46, n. 5, p. 779–784, 1997.

IDF Diabetes Atlas, 9 ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2017.

KALANTARI, P.; BUNNELL, S. C.; STADECKER, M. J. The c-type lectin Receptor-Driven, Th17 Cell-Mediated severe pathology in schistosomiasis: Not all immune responses to helminth parasites are Th2 dominated. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JAN, p. 1–7, 2019.

KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses Belo Horizonte: **CPqRR**; 2018.

- KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 1, p. 3, 2010.
- KULMALA, P. et al. Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. **Diabetes**, v. 49, n. 1, p. 48–58, 2000.
- JANSSEN, L. et al. Schistosome-Derived Molecules as Modulating Actors of the Immune System and Promising Candidates to Treat Autoimmune and Inflammatory Diseases. **Journal of Immunology Research**, 2016.
- JAYASIMHAN, A. et al. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. **Clinical Science**, 126, 1–18, 2014.
- LACCORCIA M., da COSTA, C. U. P. Maternal Schistosomiasis: Immunomodulatory Effects with Lasting Impact on Allergy and Vaccine Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, article 2960, 2018.
- LA FLAMME, A. C.; SCOTT, P.; PEARCE, E. J. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 7, p. 339–345, 2002.
- LAYLAND, L. E. et al. *Schistosoma mansoni*-Mediated Suppression of Allergic Airway Inflammation Requires Patency and Foxp3⁺ Treg Cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, 2013.
- LEITER, E. H. The NOD Mouse: A Model for Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Current Protocols in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 1–23, 1997.
- LIMA, L. M. et al. *Schistosoma* antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. **NeuroImmunoModulation**, v. 20, n. 4, p. 233–238, 2013.
- LIMA, L. M. et al. *Schistosoma* antigens downregulate CXCL9 production by PBMC of HTLV-1-infected individuals. **Acta Tropica**, v. 167, p. 157–162, 2017.
- MACEDO, J. L. et al. Perfil epidemiológico do diabetes mellitus na região nordeste do Brasil. **Research, Society and Development**, vol. 8, núm. 3, 2019.
- MAKINO, S. et al. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken dobutsu. Experimental animals** vol. 29, p. 1-13, 1980.
- MARINHO, F. V. et al. *Schistosoma mansoni* Tegument (Smteg) Induces IL-10 and Modulates Experimental Airway Inflammation. **PLoS ONE** 11(7), 2016.
- MARTINS, F. L. et al. Fatores de risco e possíveis causas de esquistossomose. **Revista Saúde em Foco** – Edição nº 11 – Ano: 2019
- MEDEIROS, M. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, p. 947-951, 2003.
- MENG, F. et al. NIH Public Access. v. 143, n. 3, p. 1–18, 2013.

- MIRANDA, M. C. G. et al. Abnormalities in the gutmucosa of non-obese diabetic mice precede the onset of type 1 diabetes. **J Leukoc Biol**; 106:513–529, 2019.
- MITCHELL, R.E., et al. IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation. **Sci Rep** 7, 11315, 2017.
- NUNES, R.; CORDOVA, C. M. M. DE. Th1 and Th2 Response Cytokins in Type 1 Diabetes Mellitus. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 4, p. 359–364, 2017.
- ORBAN, T. et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the diabetes prevention trial-type 1. **Diabetes Care**, v. 32, n. 12, p. 2269–2274, 2009.
- OSADA, Y. et al. Schistosoma mansoni infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 4, p. 457–464, 2009.
- OSADA, Y. et al. STAT6 and IL-10 are required for the anti-arthritis effects of Schistosoma mansoni via different mechanisms. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 195, n. 1, p. 109–120, 2019.
- PETRI, G. et al. Reference values for biochemical parameters in Balb/c mice bred in the Faculdade de Medicina do ABC housing facilities – Santo André/SP – Brazil. **RESBCAL**, São Paulo, v.8 n.1, pg. 52-56, 2020.
- RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine Schistosoma mansoni infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . **Eur J Immunol**. v. 41, n. 9, p. 2677-2687.
- RUYSSERS, N. E. et al. Schistosoma mansoni proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 6, p. 703–712, 2010.
- SANE F. et al. Diabetes progression and alterations in gut bacterial translocation: prevention by diet supplementation with human milk in NOD mice. **J Nutr Biochem**. 62:108-122, 2018.
- SANTOS, P. E. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res*, v. 107, p. 95-102, 2010.
- SANTOS, P. E. A. et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. **Experimental Parasitology**, v. 141, n. 1, p. 62–67, 2014.
- SANTOS, P. E. A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomal mothers differently modulate the immune response of adult offspring to postnatal Schistosoma mansoni infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 2, p. 83–92, 2016.
- SAUNDERS, K. A. et al. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 397-407, 2007.
- SEWELL, D. et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. **International Immunology**, v. 15, n. 1, p. 59-69, 2003.

- SHAMELI, A. et al. IL-2 promotes the function of memory-like autoregulatory CD8⁺ T cells but suppresses their development via FoxP3⁺ Treg cells. **Eur. J. Immunol.**, 43: 394–403, 2013.
- SHIMOKAWA, C. et al. CD8⁺ regulatory T cells are critical in prevention of autoimmune-mediated diabetes. **Nature Communications**, v. 11, 2020.
- SILVA, F. L. et al. Suckling by *Schistosoma mansoni*-infected mothers restored IgG2a and TGF- β production, but not IL-6 and delayed-type hypersensitivity in IL-12/IL-23-deficient mice. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e0744, 2021.
- SONG, X. et al. Impact of *Schistosoma japonicum* infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: A murine model of human rheumatoid arthritis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- SOUSA, A. A. DE; ALBERNAZ, A. C.; ROCHA SOBRINHO, H. M. Diabetes Mellito tipo 1 autoimune: aspectos imunológicos. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, 2016.
- SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural *. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 9, n. 4, p. 300–307, 2011.
- TANG, C. L. et al. *Schistosoma* infection and *Schistosoma*-derived products modulate the immune responses associated with protection against type 2 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, p. 1–8, 2018.
- TAKAYAMA, E., et al. Mouse CD8⁺ CD122⁺ T cells with intermediate TCR increasing with age provide a source of early IFN γ production. **J. Immunol.** 164, 5652–5658, 2000.
- TISCH, R.; WANG, B. Role of plasmacytoid dendritic cells in type 1 diabetes: Friend or foe? **Diabetes**, v. 58, n. 1, p. 12–13, 2009.
- TONGA, C. et al. Schistosomiasis among pregnant women in Njombe-Penja health district, Cameroon. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 12, p. 1150–1158, 2019.
- TSAI, S. et al. Reversal of autoimmunity by boosting memorylike autoregulatory T cells. **Immunity** 2010. 32: 568–580.
- van der VLUGT, L. E. P. M. et al. Schistosomes Induce Regulatory Features in Human and Mouse CD1dhi B Cells: Inhibition of Allergic Inflammation by IL-10 and Regulatory T Cells. **PLoS ONE** 7(2), 2012.
- VIGITEL BRASIL 2019. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
- WAKNINE-GRINBERG, J. H. et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2010.
- WÄLLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 12, p. 583–591, 2013.

- WALL, S. K. et al. Blood-derived proteins in milk at start of lactation: Indicators of active or passive transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7748–7756, 2015.
- WANG, B. et al. Th17 Down-regulation Is Involved in Reduced Progression of Schistosomiasis Fibrosis in ICOSL KO Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2015.
- WANG, L. et al. rSj16 protects against DSS-induced colitis by inhibiting the PPAR- α signaling pathway. **Theranostics**, v. 7, n. 14, p. 3446–3460, 2017.
- WOLFS, I. M. J. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. **FASEB Journal**, v. 28, n. 1, p. 288–299, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2020), Schistosomiasis. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 14 março. 2020.
- XIAO, L. et al. Human milk oligosaccharides protect against the development of autoimmune diabetes in NOD-mice. **Sci Rep** 8, 3829. 2018.
- YAN, K. et al. Amelioration of type 1 diabetes by recombinant fructose-1,6-bisphosphate aldolase and cystatin derived from *Schistosoma japonicum* in a murine model. **Parasitology Research**, v. 119, n. 1, p. 203–214, 2020.
- ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1439–1449, 2003.
- ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 4, p. 1098–1107, 2009.
- ZACCONE, P. et al. Immune modulation by *Schistosoma mansoni* antigens in NOD mice: Effects on both innate and adaptive immune systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- ZHENG, X. et al. Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. **Journal of Neuroimmunology**, v. 194, n. 1–2, p. 107–114, 2008.
- ZHOU, W. et al. Inhibition of Rho-Kinase Downregulates Th17 Cells and Ameliorates Hepatic Fibrosis by *Schistosoma japonicum* Infection. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1–15, 2019.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - CPqAM/FIOCRUZ).



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**EFEITO DA AMAMENTAÇÃO E GESTAÇÃO EM MÃESQUISTOSSOMÓTICAS NOS DESCENDENTES ADULTOS PORTADORES DE DOENÇAS AUTOIMUNES**” protocolado sob nº **165/2021** pela pesquisador(a) **Virgínia Maria Barros de Lorena**, está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até **22 de outubro de 2024** com a finalidade de **pesquisa científica**. É responsabilidade da coordenadora do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. A coordenadora concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados								
Animal	Espécie e linhagem	Quant. (total)	Sexo			Idade	Peso	Origem
			♂	♀	Ambo s			
Camudongo	Balb/c	128	40	88	128	30-35 dias	17-20 gramas	Biotériode Criação do Instituto Aggeu Magalhães-IAM-FIOCRUZ
Camudongo	NOD/MrkTac	60	20	40	60	30 dias	17-20 gramas	Centro de Criação de Animais de Laboratório-CECAL-FIOCRUZ
Outro	Descendentes Balb/c	240	96	144	240	Recém-nascidos	17-20 gramas	Biotério de Experimentação Animaldo Instituto Aggeu Magalhães-IAM-FIOCRUZ
	Descendentes NOD/MrkTac	160	51	77	160			
Total		588						

Recife, 29 de abril de 2021

Carlos Ralph Batista Lins