



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

MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

**EFEITOS DA INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA NA IMUNIDADE DE
CAMUNDONGOS PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH E DOS SEUS
DESCENDENTES.**

RECIFE

2021

MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

**EFEITOS DA INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA NA IMUNIDADE DE
CAMUNDONGOS PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH E DOS SEUS
DESCENDENTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Tropical do Centro de Ciências
Médicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutora em Medicina
Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Dr^a Valdênia Maria Oliveira de Souza

RECIFE

2021

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

S586e	Silva, Maria da Conceição Efeitos da infecção esquistossomótica na imunidade de camundongos portadores de carcinoma de Ehrlich e dos seus descendentes / Maria da Conceição Silva . – 2021. 98 f.; il. Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas - CCM. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021. Inclui referências, apêndice e anexos. 1. Interações hospedeiro-parasita. 2. Macrófagos. 3. Linfócitos B. 4. Linfócitos T citotóxicos. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (orientadora). II. Título. 616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2020 - 254)
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

**EFEITOS DA INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA NA IMUNIDADE DE
CAMUNDONGOS PORTADORES DE CARCINOMA DE EHRLICH E DOS SEUS
DESCENDENTES**

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

Aprovada em: 27/01/2021.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof^a. Dr^a. Patrícia D'Emery Alves Santos (Examinadora Externa)
New York University (NYU)

Dedico a Deus, que como Senhor
supremo da minha vida, me deu
sabedoria e discernimento para enfrentar
cada obstáculo. E aos meus pais que
foram meu alicerce nessa longa
caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente pela dádiva da vida, pela sabedoria, pelo discernimento, por ter me capacitado para seguir em frente nos momentos em que eu mais pensei em desistir.

Aos meus pais Joselma e Bonifácio, por me ensinarem o verdadeiro sentido do amor, por todos os anos de dedicação, amor, confiança, determinação e persistência, por me ensinarem o significado de humildade, lealdade, solidariedade, enfim por terem me tornado o ser humano que sou hoje, nada do que fale será o bastante para expressar o meu amor por vocês.

A minha orientadora Prof^a Valdênia Souza, pela oportunidade oferecida, pela orientação, por todos os ensinamentos repassados. Pela compreensão em muitos momentos, pelos desafios que acredito que mesmo sem saber fez com que batessem a minha porta e eu o enfrentasse. Me tornei mais forte graças aos “empurrões” que me destes.

A Dr^a Virgínia Lorena, com todo carinho, por tanta atenção e dedicação, pela sua disponibilidade e pelo privilégio de conviver com uma profissional exemplar, tão amável, compreensiva.

A Prof^a Ivone pela disponibilidade em compartilhar do seu conhecimento na área de cancerologia experimental, pela disponibilidade em ir realizar a parte experimental nos meus experimentos.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica: por toda ajuda, pelos momentos de descontração, pela companhia nos experimentos, mesmo nos momentos mais complicados, por além de ensinar-lhes o pouco que sei, me proporcionarem o privilégio de a cada dia aprender mais e mais evoluindo como ser humano.

A todos do setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pelo auxílio nos experimentos.

A todos os profissionais que passaram ao longo da minha vida acadêmica, pois sempre estiveram ao meu lado ajudando a subir cada degrau e a vencer cada etapa neste longo trajeto.

A todos do biotério de experimentação do Instituto Aggeu Magalhães, pela disponibilidade, e pelo cuidado com os meus camundongos, tornando o meu trabalho mais fácil.

À CAPES pelo financiamento da bolsa que me proporcionou dedicação exclusiva ao doutorado. À FACEPE pelo financiamento da bolsa de prorrogação do doutorado.

Sucesso

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter tido sucesso. (Emerson, 1846).

RESUMO

Schistosoma mansoni é capaz de modular negativamente a imunidade para antígenos homólogos e heterólogos no hospedeiro. No contexto de câncer, nos modelos experimentais de infecção ou o uso de antígenos de *S. mansoni* são capazes de conter o desenvolvimento tumoral, porém pouco é sabido sobre o perfil de ativação das células do sistema imune. Na relação materno-fetal, em modelos murinos, a amamentação em mães esquistossomóticas, potencializou a imunidade humoral dos descendentes adultos, com melhora da capacidade de apresentação das células apresentadoras de antígenos (APCs), frente a ovalbumina. Enquanto, a gestação levou há um ambiente imunossupressor anti-ovalbumina via IL-10. Contudo, não é sabido qual o efeito da amamentação ou gestação em mães infectadas no desenvolvimento tumoral e ativação celular. Sendo assim, neste estudo, nós avaliamos em camundongos esquistossomóticos (INFECTADO-CE) ou em descendentes nascidos (MI), amamentados (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI) ou nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores do carcinoma de Ehrlich: a curva de sobrevida, peso corporal e tumoral, a produção de citocinas e anticorpos, além da frequência de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ expressando CD28, CTLA-4 ou CD40L, linfócitos B CD19⁺ expressando CD80, CD86 ou CD1d e macrófagos M1-CD16/CD32⁺ e M2-CD206⁺. Em comparação ao grupo CONTROLE-CE, os camundongos esquistossomóticos (INFECTADO-CE) demonstraram uma maior sobrevida, menor peso tumoral, alta frequência de linfócitos TCD8⁺, menor frequência de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ expressando CD28⁺, CD40L⁺ e CTLA-4⁺, maior frequência das células CD19⁺/CD80⁺ ou CD86⁺ e altos títulos de IgG total e IgG1 antígeno específica. Além de menor frequência de macrófagos M2 e menor produção de IFN- γ , IL-10, TGF- β e NO. Com relação aos descendentes, aqueles que foram apenas amamentados (AI) demonstraram uma maior sobrevida, menor peso tumoral, alta frequência de linfócitos TCD4⁺ ou CD8⁺, menor frequência de células CD8⁺/CD28⁺, maior frequência de células CD4⁺CTLA-4⁺ e CD19⁺/CD80⁺. Além disso, os grupos AI e MIAI apresentaram maior frequência de células CD8⁺/CTLA-4⁺ e CD40L⁺ com predominância do fenótipo M1 e menor produção de TGF- β , sob estímulo antigênico. Diferentemente, o grupo MI cursou com maior frequência de M2 e alta produção de IL-10. O grupo MIAI apresentou uma menor frequência de CD19⁺/CD86⁺ e maior produção de IFN- γ . Em suma, o contato com produtos parasitários pela infecção ou amamentação em mães infectadas levou há um retardo no desenvolvimento tumoral, com melhor resposta dos linfócitos TCD8⁺, B ou macrófagos classicamente ativados, enquanto à gestação levou a um microambiente imunossupressor, cursando com uma menor sobrevida.

Palavras-Chaves: Interações hospedeiro-parasita; macrófagos; linfócitos B; linfócitos T citotóxicos.

ABSTRACT

Schistosoma mansoni is able to negatively modulate immunity for homologous and heterologous antigens in the host. In the context of cancer, in the experimental models of infection or the use of *S. mansoni* antigens are capable of containing tumor development, but little is known about the activation profile of immune system cells. In the maternal-fetal relationship, in murine models, breastfeeding in schistosomious mothers enhanced humoral immunity of adult descendants, with improved presentation capacity of antigen-presenting cells (APCs) in the face of ovalbumin. While, pregnancy led there is an anti-ovalbumin immunosuppressive environment via IL-10. However, it is not known what effect breastfeeding or pregnancy has on infected mothers on tumor development and cell activation. Thus, in this study, we evaluated in schistososome mice (INFECTED-EC) or in offspring born (BIM), suckled (SIM), born and suckled in infected mothers (BSIM) or born and suckled in non-infected mothers (CONTROL-EC) with Ehrlich carcinoma: the survival curve, body and tumor weight, the production of cytokines and antibodies, in addition to the frequency of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes expressing CD28, CTLA-4 or CD40L, CD19⁺ B lymphocytes expressing CD80, CD86 or CD1d and macrophages M1-CD16/CD32⁺ and M2-CD206⁺. Compared to the CONTROL-EC group, schistososome mice (INFECTED-EC) demonstrated higher survival, lower tumor weight, high frequency of TCD8⁺ lymphocytes, lower frequency of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes expressing CD28⁺, CD40L⁺ and CTLA-4⁺, higher frequency of CD19⁺/CD80⁺ or CD86⁺ cells and high levels of total IgG and IgG1 specific antigen. In addition to lower frequency of M2 macrophages and lower production of IFN- γ , IL-10, TGF- β and NO. Regarding the offspring, those who were only suckled (SIM) demonstrated a higher survival, lower tumor weight, high frequency of TCD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes, lower frequency of CD8⁺/CD28⁺ cells, higher frequency of CD4⁺CTLA-4⁺ and CD19⁺/CD80⁺ cells. In addition, groups SIM and BSIM presented higher frequency of CD8⁺/CTLA-4⁺ and CD40L⁺ cells with predominance of the M1 phenotype and lower production of TGF- β , under antigenic stimulation. In the other hand, the MI group attended higher frequency of M2 and high production of IL-10. The BSIM group had a lower frequency of CD19⁺/CD86⁺ and higher production of IFN- γ . In short, contact with parasitic products by infection or breastfeeding in infected mothers led to a delay in tumor development, with better response of TCD8⁺, B lymphocytes or classically activated macrophages, while pregnancy led to an immunosuppressive microenvironment, attending with a lower survival. **Key words:** Host-parasite interactions; macrophages; B-lymphocytes; T-lymphocytes, cytotoxic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras da tese

Figura 1- Infecção, parasitológico, regulação do estro, acasalamento e formação dos grupos de estudo.....	37
Figura 2- Formação dos grupos de estudo.....	37

Figuras do artigo 1

Figura 1 - Curva de sobrevida e peso tumoral. Camundongos <i>Swiss Webster</i> implantados com carcinoma de Ehrlich (CONTROLE-CE) e infectado com 60 cercárias de <i>S. mansoni</i> (INFECTADO-CE) e foram acompanhados ao longo de 15 dias para mensurar a curva de sobrevivência (A). No 15º dia após a implantação, os tumores foram removidos e pesados (B). Os resultados representam a mediana do ganho de peso $\pm$ erro padrão. * $p < 0,005$ quando comparado com o grupo CONTROLE-CE.....	55
---	----

Figura 2 - Status de ativação de células T. Camundongos não infectados e livre de tumores (CONTROLE) e animais submetidos a implantação tumoral (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de <i>S. mansoni</i> (INFECTADO-CE) foram acompanhados ao longo de 15 dias para contagem de células CD4+ (esquerda A) e CD8+ (direita B) em esplenócitos quando cultivados (24h) apenas com meio (basal), e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 μ g/mL). A frequência da dupla marcação CD4+ ou CD8+ e CD28+ (C; D), CD40L+ (E; F), CTLA-4+ (G; H) foram analisadas em CONTROLE-CE e INFECTADO-CE depois da marcação com FITC anti-CD4 ou APC anti-CD8a e PE anti-CD28 ou PE anti-CD40L ou anti-CTLA-4 PE. Os resultados representam a mediana da frequência da dupla-marcação das células esplênicas $\pm$ erro padrão para sete animais/grupo. # $p < 0.005$ quando comparado com o grupo CONTROLE. * $p < 0.005$ quando comparado com o grupo CONTROLE-CE.....	56
---	----

Figura 3 - Status de ativação de células B. Frequência de células CD19+ expressando CD86+ (A), CD80+ (B), CD1d+ (C) em esplenócitos de camundongos livres de tumor e não infectados (CONTROLE), camundongos portadores de tumor (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de <i>S. mansoni</i> (INFECTADO-CE) cultivados (24h) apenas meio (basal) antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 μ g/mL, barra preta),. As células foram marcadas com APC anti-CD19 e PE anti-CD80 ou PE anti-CD86 ou PE anti-CD1d. Os resultados representam a mediana da frequência da dupla-marcação das células esplênicas $\pm$ erro padrão para sete animais/grupo. Os resultados mostram um experimento representativo de 3 experimentos independentes. * $p < 0.005$ quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.....	57
---	----

Figura 4 - Média da intensidade de fluorescência (MFI) de CD16/CD32+ células (A) e CD206+ (B) em esplenócitos de camundongos livres de tumor e não infectados (CONTROLE), camundongos portadores de tumor (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de <i>S. mansoni</i> (INFECTADO-CE) cultivados (24h) apenas meio (basal) antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 μ g/mL,barra preta), marcados com FITC anti-CD16/CD32 e APC anti-CD206. Os resultados representam a média da	
---	--

frequência da dupla-marcação das células esplênicas $\pm$ erro padrão para sete animais/grupo. Os resultados mostram um experimento representativo de 3 experimentos independentes. *p <0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE..... 58

Figura 5 - Fator de crescimento TGF- β (A) interleucina (IL)-10; (B) óxido nítrico NO; (C) interferon (IFN)- γ ; (D) secretado por células esplênicas de camundongos livres de tumor e não infectados (CONTROLE), camundongos portadores de tumor (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE). 12×10^6 (72 h) células foram cultivadas apenas com meio (Basal) e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 μ g/mL). Os resultados representam a mediana $\pm$ erro padrão. *p <0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE..... 59

Figura 6 - IgG total (A) IgG1 anti-CSA; (B) IgG2a anti-CSA; (C) anticorpos produzidos por camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE). Os níveis dos isótipos foram dosados por ELISA indireto nas diluições 1:50 (IgG total) and 1:2 (IgG1 e IgG2a) 15 dias pós implantação tumoral. Os resultados expressam a mediana da absorbância (D.O) $\pm$ desvio padrão de 7 a 10 animais/grupo. *p<0.05 quando comparado ao CONTROLE-CE..... 60

Figuras do artigo 2

Figura 1 - Frequência de células CD4+ (esquerda A) e CD8+ (direita B) em esplenócitos quando cultivados (24 h) apenas com meio (basal), e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 μ g/mL). A frequência da dupla marcação CD4+ ou CD8+ e CD28+ (C; D), CD40L+ (E; F), CTLA-4+ (G; H) foram analisadas em camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE), portadores do carcinoma de Ehrlich. Após a marcação com anticorpos anti-CD4 (FITC) ou anti-CD8a (APC) e anti-CD28 (PE) ou anti-CD40L(PE) ou anti-CTLA-4 (PE). Os resultados representam a mediana da frequência da dupla marcação de células esplênicas $\pm$ erro padrão de sete animais/grupo. *p <0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE. ** p <0.005 quando comparado ao grupo AI..... 76

Figura 2 - Frequência de células CD19+ expressando CD86+ (A), CD80+ (B), CD1d+ (C) em esplenócitos quando cultivadas (24h) apenas com meio (basal) e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 μ g/mL) foram analisadas em camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI) ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE), portadores de carcinoma de Ehrlich. Marcadas com anticorpos anti-CD19 (APC) e anti-CD80 (PE) ou anti-CD86 (PE) ou anti-CD1d (PE). Os resultados representam a mediana da frequência da dupla marcação de células esplênicas $\pm$ erro padrão de sete animais/grupo. Os resultados demonstram um representante de três experimentos independentes. *p <0,005 quando comparado com o grupo CONTROLE-CE..... 77

Figura 3 - CD16/CD32+/ NOS-2+ células (A) e CD206+/ IL-10+ (B) M1/M2 (C) em esplenócitos de camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectados com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich,

cultivados (24 h) apenas com meio (basal), antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 µg/mL), marcado com anticorpos anti-CD16/CD32 (FITC) e anti-NOS-2 (APC) e anti-CD206 (APC) e anti-IL-10 (PE). Os resultados representam a média da frequência da dupla marcação de células esplênicas ± erro padrão de sete animais/grupo. Os resultados demonstram um representante de 3 experimentos independentes. *p <0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE..... 78

Figura 4 - Níveis das citocinas fator de crescimento tumoral TGF-β (A) interleucina (IL)-10; (B) óxido nítrico (C) interferon (IFN)-γ; (D) produzidas por células esplênicas de camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectados com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich. 12 × 10⁶ (72 h) células foram cultivadas apenas com meio (basal) e antígeno solúvel do carcinoma (CSA) (200 µg/mL). Os resultados representam a mediana ± erro padrão. *p <0.005 quando comparado com o grupo CONTROLE-CE. ** p <0.005 quando comparado ao grupo AI..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva de sobrevida, peso tumoral e peso corpóreo em descendentes de mães não infectadas e infectadas com <i>S. mansoni</i>	75
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (Citotocidade celular mediada por anticorpos)
Anti-IIC	Anticorpo específico
APCs	Antigen Presenting Cells (Células Apresentadoras de Antígenos)
CD	Cluster of differentiation
CE	Carcinoma de Ehrlich
CEA	Tumor Ascítico de Ehrlich
CONTROLE-CE	Camundongos não infectados portadores do tumor sólido de Ehrlich
Cepa BH	Cepa Belo Horizonte
CTLs	Linfócitos T citolíticos
CSA	Carcinoma Soluble Antigen (Antígeno Solúvel de Carcinoma)
DCs	Dendritic cells (Células dendríticas)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
HDACs	Histone deacetylases
INFECTADO-CE	Camundongos esquistossomóticos portadores do tumor sólido de Ehrlich
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina12
IL-13	Interleucina 13
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
LNFP-III	LactoNfucopentose III
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
M1	Macrófagos classicamente ativados

M2	Macrófagos alternativamente ativados
NK	Células Natural Killers
NO	Nitric oxide (óxido nítrico)
OA	Ovalbumina
TAMs	Tumour associated macrophages (Macrófagos associados a tumores)
TGF- β	Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)
TgPLP	Fração proteica do <i>Toxoplasma gondii</i>
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Th9	T helper 9
Th22	T helper 22
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i> (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral)
Treg	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE.....	20
2.2	RELAÇÃO MATERNO FETAL NA ESQUISTOSSOMOSE.....	23
2.3	MECANISMOS EFETORES DA IMUNIDADE ANTITUMORAL	25
2.4	CARCINOMA DE EHRLICH.....	30
2.5	IMUNIDADE ANTITUMORAL FRENTE A DOENÇAS INFECCIOSAS.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	DESENHO DE ESTUDO.....	35
4.2	LOCAL DE ESTUDO.....	35
4.3	ANIMAIS.....	35
4.4	INFEÇÃO E PARASITOLÓGICO DE FEZES.....	36
4.5	SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTO.....	36
4.6	OPERACIONALIZAÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO.....	36
4.7	IMPLANTAÇÃO TUMORAL DO CARCINOMA DE EHRLICH.....	38
4.8	SANGRIA TOTAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA	38
4.9	PESAGEM DOS ANIMAIS E DO TUMOR.....	38
4.10	OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE CARCINOMA (CSA)	38
4.11	CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS.....	38
4.12	ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA IMUNOFENOTIPAGEM.....	39
4.13	DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO.....	39
4.14	DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS.....	40
4.15	VARIÁVEIS.....	41
4.15.1	Variáveis Independentes.....	41
4.15.2	Variáveis Dependentes.....	41
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	ARTIGO 1: CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> DEMONSTRARAM CRESCIMENTO REDUZIDO DO CARCINOMA DE EHRLICH E MELHOR RESPOSTA IMUNE DAS	

	CÉLULAS TCD8+ E B, COM MENOR FREQUÊNCIA DE MACRÓFAGOS M2.....	42
5.2	ARTIGO 2: AMAMENTAÇÃO EM MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS ALTERA O STATUS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS B, POLARIZA MACRÓFAGOS M1 E RETARDA O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH.....	64
6	CONCLUSÕES.....	84
7	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE A- TÍTULOS DE ANTICORPOS IgG TOTAL EM DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS SOB IMPLANTAÇÃO TUMORAL.....	95
	ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA IAM/FIOCRUZ PE.....	96
	ANEXO B- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1.....	97
	ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2.....	98

1 INTRODUÇÃO

O uso de parasitas e seus produtos vêm sendo estudados como provável ferramenta imunomoduladora no processo de carcinogênese e sua progressão, sendo potencial alternativa na imunoterapia. A esquistossomose é uma doença negligenciada, com fase crônica caracterizada por uma resposta Th2/Treg (IL-4, IL-5, IL-10 IL-13) (CHUAH et al., 2014; SOUZA et al., 2011). É sabido que a infecção por *S. mansoni* pode modular negativamente a resposta imune para antígenos heterólogos, como em doenças autoimunes, alergias e vacinas (AMU et al., 2010; CLEENEWERK; GARSSSEN; HOGENKAMP, 2020; OSADA et al., 2009; RUYSSERS et al., 2010).

Com relação aos antígenos tumorais, em modelos de infecção/imunização há controvérsias se os produtos parasitários são capazes de induzir o retardo no processo carcinogênico (EISSA et al., 2019; TODA et al., 2015; YOSHIDA et al., 2002). Contudo, alguns autores têm demonstrado que tanto a infecção esquistossomótica quanto imunização com produtos do *S. mansoni* pode induzir diminuição do crescimento tumoral, melhorar curva de sobrevivência, levar ao menor número de lesões neoplásicas, além de aumentar a frequência de células TCD4⁺ (EISSA et al., 2019; PEREIRA; RASO; COELHO, 1986). Portanto, é possível que a infecção seja capaz de induzir uma resposta antitumoral.

É sabido da alta incidência de gestantes e de mulheres em idade fértil vivendo em áreas endêmicas para esquistossomose (FRIEDMAN et al., 2007; SALAWU, ODAIBO, 2013). Em humanos ou camundongos, mães infectadas podem modular, seja positivamente ou negativamente a resposta dos seus descendentes para antígenos homólogos e heterólogos (OTHMAN et al., 2010; STRAUBINGER et al., 2014; SANTOS et al., 2010; 2014; 2016). Sendo assim nosso grupo de pesquisa tem realizado estudo do efeito da gestação, separadamente, da amamentação em mães infectadas em diferentes modelos de imunização/infecção. A amamentação em mães esquistossomóticas potencializou a produção de anticorpos, induziu uma maior produção de IL-2, IL-5, TGF- β , IL-6, melhorou a capacidade de apresentação antigênica das APCs e aumentou a frequência de células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Com relação à gestação em mães esquistossomóticas, houve diminuição na produção de anticorpos, IL-10-dependente, e menor capacidade de apresentação antigênica das APCs nos descendentes adultos. Quando os camundongos são nascidos e amamentados em mães infectadas ocorre uma reversão da supressão de anticorpos, acompanhada do aumento da produção de IL-2 e diminuição de IL-10 (FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al.,

2010, 2014; SILVA et al., 2021). Desse modo, os componentes do leite materno, bem como fatores provenientes do contato *via utero*, podem modular a resposta a antígenos heterólogos tumorais em descendentes adultos.

No microambiente tumoral, no processo de rejeição e eliminação das células tumorais, é fundamental a participação das respostas imunes inata e adaptativa. Como componentes da imunidade inata, temos células natural killer (NK) e macrófagos, na imunidade adaptativa destacam-se a atuação dos linfócitos TCD8+, além dos linfócitos T CD4+ e B. Os macrófagos, dependendo do seu status de ativação, podem levar a eliminação ou progressão do tumor. Macrófagos classicamente ativados (M1), apresentam alta capacidade tumoricida, assim como a maior capacidade de recrutar linfócitos TCD8+ e NKs. Os macrófagos alternativamente ativados (M2), possui um caráter mais imunossupressor, com a produção de citocinas como TGF- β e IL-10, estão ligados a angiogênese e comumente presentes no microambiente tumoral e, atrelados há pior prognóstico (BISWAS; MANTOVANI, 2010; MANTOVANI et al 2006).

A cooperação entre os linfócitos TCD4+ e CD8+ na erradicação das células cancerígenas é conhecida, se por um lado é consolidado o auxílio de TCD4+ no *priming* de TCD8+, por outro lado, a resposta pode ser efetivamente dependente de linfócitos citotóxicos (ITO et al., 2000; LI et al., 2014). Os linfócitos B têm obtido grande enfoque na resposta antitumoral, pois estiveram associados a bom ou mau prognóstico. No que diz respeito ao auxílio aos linfócitos TCD8+, estudos *in vivo* e *in vitro* com células B ativadas com anti-CD40L e LPS, resultaram em menor foco de metástase e redução no tamanho dos tumores pulmonares, altos títulos de IgM, IgG e IgG2b específica, atuantes na atividade citolítica mediada por complemento, indução de linfócitos TCD8+ com potente ação citolítica antígeno específica, frente as células tumorais (FORTE et al., 2012; LI et al., 2009; 2011). Com relação ao mau prognóstico, está o subtipo linfócitos B regulatórios. Estes linfócitos produzem citocinas imunorregulatórias (IL-10 e TGF- β), induzem células Treg, inibem da proliferação de linfócitos T e células NK, com redução da secreção de granzimas e perforinas resultando no escape das células tumorais e consequentemente crescimento do tumor (CHEN et al., 2019; SARVARIA; MADRIGAL; SAUDEMONT, 2017).

Desta forma, o presente projeto se propôs a avaliar a influência da infecção esquistossomótica ou da gestação e amamentação, separadamente, em mães infectadas, na resposta imune antitumoral. Para isto, foram avaliados a frequência de linfócitos TCD4+ ou CD8+ expressando moléculas co-estimulatórias de ativação ou

inibição, a frequência de macrófagos clássicos e alternativamente ativados, o perfil dos linfócitos B, produção de citocinas e anticorpos em camundongos adultos infectados ou descendentes de mães infectadas submetidos à implantação do carcinoma de Ehrlich.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE.

A esquistossomose continua sendo um grave problema de saúde pública. Endêmica em 78 países, distribuídos nos continentes Africano, Asiático e Americano, estatísticas globais demonstram que mais de 700 milhões de indivíduos estão sob o risco de contrair a infecção por alguma espécie do *Schistosoma* (WHO, 2016). No Brasil a única espécie encontrada é *Schistosoma mansoni* e aproximadamente 25 milhões de indivíduos vivem em área de risco, e na região Nordeste, principalmente o estado de Pernambuco, exibem as maiores prevalências (BARBOSA, et al., 2006; DA PAZ; SEQUEIRA; PYRRHO, 2017).

Na infecção pelo *S. mansoni*, os mecanismos da imunidade inata são insuficientes. Com o intuito de proteger o hospedeiro, a imunidade adaptativa é desencadeada, por duas populações principais: os linfócitos B que são os mediadores da resposta imune humoral e os linfócitos T que são os reguladores centrais da imunidade celular. Os linfócitos T são divididos em linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺ e linfócitos T auxiliares (Th) ou CD4⁺ que após serem ativados, pela interação com APCs e sob o estímulo de citocinas se diferenciam em subtipos distintos (Th1 e Th2) (ROCHA; TANCHOT, 2004; STOCKINGER; BOURGEOIS; KASSIOTIS, 2004). Com o avanço nas pesquisas experimentais, outros tipos de linfócitos T foram descritos: as células T regulatórias (Tregs) e as células Th17.

A esquistossomose é uma doença que apresenta duas formas clínicas distintas, uma forma aguda e uma forma crônica. A fase aguda, ocorre nas primeiras 4 semanas após infecção e é caracterizada pela indução e predominância de um perfil de resposta Th1, induzido em resposta a migração dos esquistossômulos e vermes adultos imaturos. Esse perfil é caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 e INF- γ e com a evolução da doença, por volta de 6 a 8 semanas, tem-se início a liberação dos ovos, induzindo um perfil de resposta Th2, com a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e a síntese de IgE (CHUAH et al., 2014; SOUZA et al., 2011). Por volta da 12^a semana, é induzida uma resposta dirigida por células Treg com a produção de IL-10 e TGF- β , que regula o balanço (Th1/Th2).

Durante a fase crônica, têm-se como evento patogênico marcante a formação do granuloma. A reação granulomatosa, é orquestrada principalmente pelas células TCD4⁺, caracterizada por uma resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), com o predomínio de células mononucleares, eosinófilos, neutrófilos, células B e macrófagos

alternativamente ativados (M2). Com a evolução da doença o infiltrado eosinofílico iniciado ao redor dos ovos vai sendo substituído gradativamente por depósitos fibróticos. O granuloma maduro apresenta como fatores dominantes as fibras colágenas e os fibroblastos. A IL-13 é uma citocina fundamental no processo fibrogênico, pois acredita-se que a mesma seja capaz de induzir a transdiferenciação das células estreladas hepáticas em miofibroblastos que são a principal fonte de deposição de matriz extracelular durante a esquistossomose. Chiaromonte e colaboradores (2001) em estudos experimentais com camundongos deficientes para IL-13 demonstraram que na ausência desta citocina, não existe fibrose nem deposição de colágeno, corroborando sua função descrita em diversos estudos. Associada a resposta do perfil Th2, temos a estimulação dos linfócitos T regulatórios e a produção de IL-10, que auxiliam no controle do granuloma, protegendo o hospedeiro do agravamento da doença (MCKEE and PEARCE, 2004; WINN, 2007; CHUAH et.al., 2014). A progressão da fase aguda para a fase crônica da esquistossomose está relacionada com as alterações imunológicas e aos diferentes perfis de células TCD4⁺ que têm sido descritos nessa imunomodulação (PEARCE; MACDONALD, 2002; MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003).

Com relação aos macrófagos durante a esquistossomose, o contato com o ambiente preferencialmente Th2 devido aos antígenos dos ovos de *S. mansoni*, levam os macrófagos a polarizarem para um perfil M2. Observado pela expressão elevada de receptor de manose (CD206), secreção de IL-10 e TGF- β , expressão de Arg1 e contribuindo com o reparo tecidual necessário na esquistossomose (ASSUNÇÃO et al., 2017; HERBERT et al., 2004).

As células TCD4⁺, além de se diferenciarem em Th1 e Th2, também podem se diferenciar no perfil Th17, comumente desencadeado em doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. A participação dos linfócitos Th17 na esquistossomose tem sido associada com o desenvolvimento da doença grave, em animais polarizados para o perfil Th1 (RUTITZKY; STADECKER, 2006). A diferenciação das células T naive em células Th17 se dá por meio das citocinas IL-6 e TGF- β ao promoverem a ativação do fator de transcrição ROR γ T. Após a ativação são produzidas as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, além da expressão do IL-23r na superfície destas células. As citocinas IL-17A e IL-17F tem funções similares e induzem a produção de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e metaloproteinases em diversos tecidos que auxiliam no recrutamento de neutrófilos. IL-21 estimula a proliferação das células TCD8⁺, a produção de anticorpos e a troca isotópica IgG1 e IgG3 nos linfócitos B, induz a

expressão dos fatores de transcrição Blimp1 e Bcl-6 e a produção de IL-8 por células dendríticas (DCs) e macrófagos. A IL-22 é essencial para a proteção de barreiras imunes das mucosas (MADDUR et.al., 2012)

Rutitzky e colaboradores (2005) em seu estudo que verificou a exacerbação de patologia granulomatosa e a grave morbidade na infecção pelo *S. mansoni*, demonstraram que a neutralização da IL-17 (com anticorpos monoclonais anti-IL-17) controla o tamanho do granuloma, restaurando-o ao tamanho encontrado na fase crônica, indicando que apesar da capacidade dos antígenos parasitários de induzir clones de linfócitos Th17, a proliferação destas células deve ser controlada negativamente na fase crônica da doença.

Em modelos experimentais, a esquistossomose também alterou a resposta imune para antígenos heterólogos, como a ovalbumina. Foi demonstrado que, seja por meio da infecção ou imunização com antígenos parasitários do verme (SWAP) ou dos ovos (SEA) do *S. mansoni*, houve uma supressão da resposta alérgica anti-OA, com menores níveis de citocinas Th2, eosinófilos, anticorpos IgE anti-OVA maior indução de células T CD4⁺CD25⁺ e IL-10 e modulação negativa das respostas Th1 e Th2 (AMU et al. 2010; NASSEF et al. 2015; PACÍFICO et al. 2009; SMITS et al. 2007). Em modelos experimentais de infecção com apenas machos de *S. mansoni* em paralelo a colite ulcerativa, resultou em resistência a colite, menor dano tecidual no cólon e menor atividade da mieloperoxidase (FLOUDAS et al., 2019). Já em paralelo a artrite induzida por colágeno, houve uma redução na severidade da doença, além de um menor influxo de células inflamatórias, menores níveis de IgG e IgG2a anti-IIC, com menor produção de IFN- γ , IL-17A e TNF- α e maior de IL-4 e IL-10 (OSADA et al., 2009). Em modelo experimental de diabetes Tipo 1 e tipo 2, células T de camundongos diabéticos não obesos, imunizados com SWAP, produziram IL-10, que atua modulando negativamente e prevenindo o desenvolvimento da diabetes auto-imune, por intermédio da indução de células Tregs, bem como, do diabetes tipo 2, além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares (EBERLE et al., 2012; ZACCONE et al., 2003). Em humanos, a infecção por *S. mansoni* leva há uma redução na positividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata aos aeroalérgenos, além de sintomas atenuados em indivíduos asmáticos e infectados (ARAUJO et al., 2000; MEDEIROS et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2014). Estudo *in vitro* com células de pacientes asmáticos e infectados com *S. mansoni*, quando estimuladas com diferentes antígenos do parasita, demonstraram uma maior produção de IL-10, modulando negativamente a resposta

alérgica inflamatória visualizada pela menor produção de IL-5 (CARDOSO et al., 2011).

2.2 RELAÇÃO MATERNO FETAL PARA ANTÍGENOS HETERÓLOGOS.

Em áreas endêmicas, cerca de 10 milhões de gestantes e 40 milhões de mulheres em idade fértil estão cronicamente infectadas (FRIEDMAN et al., 2007, SALAWU, ODAIBO, 2013). Devido à alta prevalência, diferentes estudos têm sugerido que a infecção materna teria um papel importante no desenvolvimento da imunidade do descendente, favorecendo o controle da doença, bem como alterando a resposta imune para antígenos não relacionados ao parasita, alergias e doenças autoimunes em indivíduos de área endêmica.

Diversos estudos têm verificado que a exposição a anticorpos e antígenos, durante o período pré-natal ou a amamentação, esteve associada com a modulação da resposta imune dos descendentes para antígenos heterólogos (não-relacionados ao parasita) (MALHOTRA et al., 1999; SANTOS et al., 2010, 2014; SEYDEL et al., 2012). Foi observado em humanos, que a infecção materna pelo *Schistosoma haematobium* diminui a eficácia da vacinação contra o Bacilo Calmette-Guérin e a produção de IFN- γ (MALHOTRA et al., 1999). Adicionalmente, uma correlação positiva foi observada entre os níveis de IgE específica para antígeno de *S. mansoni* e as manifestações de alergia gastrointestinais, em crianças que receberam leite de mães esquistossomóticas (NOURELDIN; SHALTOUT, 1998).

Estudos prévios da nossa linha de pesquisa relatam que mães esquistossomóticas afetam a resposta imune pós-natal, para antígenos heterólogos, além de ressaltar o potencial dicotômico do leite dessas mães (FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al., 2010, 2014). Em descendentes adultos imunizados com OA o contato prévio com o leite materno de mães esquistossomóticas potencializa a imunidade humoral anti-OA, induz maior produção de citocinas relacionadas à indução e manutenção da produção de anticorpos (IL-2, IL-5, IL-6 e TGF- β), melhora a capacidade de apresentação antigênica demonstrada pelo aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD80 (SANTOS et al., 2010, 2014; SILVA et al., 2021). De modo intrigante, a amamentação além de potencializar a produção de anticorpos anti-OA, predispõe a uma frequência aumentada de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (FERNANDES et al., 2018) e houve supressão da reação inflamatória anti-OA pulmonar em um modelo de asma alérgica (dados não publicados). Sendo assim, é evidente o caráter imunomodulatório

do leite de mães esquistossomóticas, pois apesar do ambiente imunossupressor desencadeado pela presença de células e citocinas imunoregulatórias (Treg e TGF- β), a resposta imune humoral é potencializada. Enquanto a gestação em mães esquistossomóticas, parece induzir a produção de IL-10, o que leva há o favorecimento de um ambiente supressor, com uma redução na resposta humoral anti-OA e uma menor capacidade de apresentação pelas APCs, culminando em uma menor capacidade de ativação de ambos os perfis Th1 e Th2. Contudo, quando os camundongos são nascidos e amamentados em mães infectadas ocorre uma reversão da supressão de anticorpos anti-OA, acompanhada do aumento da produção de IL-2 e diminuição de IL-10 (SANTOS et al., 2010, 2014; SILVA et al., 2021).

Recentemente, Holanda e colaboradores (2019) demonstraram que o contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas pode promover modificações epigenéticas, ao elevar a expressão de enzimas envolvidas com deacetilação de DNA as HDACs. Houve aumento da expressão de HDAC 6, 11 e sirt2 que contrabalanceiam a produção de citocinas (IFN- γ e IL-10), além de estar associado com a regulação da função das células Treg, e da produção de espécies reativas de oxigênio cursando com uma resposta anti-inflamatória. No contexto apenas da gestação em mães esquistossomóticas, as modificações epigenéticas estão relacionadas a alta expressão de uma única histona deacetilase a HDAC9 que favorece a alta produção de IL-10, levando há um microambiente imunossupressor. É possível que este ambiente favoreça num contexto de câncer o desenvolvimento descontrolado das lesões neoplásicas. Desse modo, os componentes do leite materno, podem modular na tenra idade a resposta a antígenos heterólogos tumorais em descendentes adultos.

Em estudos *in vitro*, os linfócitos B imaturos cultivados com o leite de mães esquistossomóticas, passaram a expressar mais moléculas CD40 e CD80, favorecendo o status de ativação, já que neste mesmo estudo foi demonstrada uma maior frequência de células CD3+/CD28+ e uma menor frequência de células CD4+/CTLA-4+, desse modo favorecendo a interação CD28:CD80. Entretanto, este fenômeno parece ser dependente da maturação dos linfócitos B, visto que quando os linfócitos B maduros foram cultivados com o leite de mães infectadas, não houve diferença na frequência de células expressando as moléculas co-estimulatórias (SALES et al., 2015).

A interação entre componentes presentes no leite materno e as células da mucosa intestinal contribuem para o desenvolvimento do sistema imune do recém-nascido (ZIZKA et. al., 2007). Entre células e citocinas pró- e anti-inflamatórias, o leite materno

humano contêm o Lacto-N-Fucopentose-III (LFNP-III), também presente nos ovos do *S. mansoni* e responsável por induzir a proliferação dos linfócitos B (THOMAS, HARN, 2005). Com relação aos componentes do leite de mães infectadas, Holanda e colaboradores (2020), trabalhando com o soro do leite de camundongos esquistossomóticos, observaram que existe um mistura 15 proteínas reguladas positivamente e 14 reguladas negativamente, na análise por espectrometria de massa e comparada aos camundongos não infectados. Com funções associadas a vias bioquímicas de metabolismo da frutose 1,6-bifosfato, glicose, modulação de classes de enzimas histonas desacetilases, atuação em vias de sinalização como p53, inibição da via NF- κ B que colaboram com uma redução na resposta inflamatória. Um exemplo é a Catepsina B que no estudo do leite de mães infectadas foi observada em menor expressão, e sua alta expressão está associada a câncer, além de doenças autoimunes. Esse mistura de proteínas presentes no leite de mães infectadas pode ao longo prazo modular positivamente o sistema imune de tal modo, a conferir proteção frente a antígenos heterólogos.

Sendo assim, nossos resultados mostram que mães infectadas com *S. mansoni* podem afetar a resposta imune pós-natal a um antígeno heterólogo e enfatiza o papel do leite materno como protetor da doença alérgica e estimulante da imunidade em longo prazo, enquanto a gestação nestas mães leva há um potencial imunossupressivo nos descendentes.

2.3 MECANISMOS EFETORES DA IMUNIDADE ANTITUMORAL.

Câncer engloba mais de 100 doenças, que podem acometer qualquer parte do organismo. A interação de fatores genéticos e fatores externos, como agentes carcinogênicos (físicos, químicos e biológicos) acarretam modificações genéticas em células normais, que adquirem capacidade de proliferação descontrolada e disseminação por órgãos e tecidos saudáveis (INCA, 2017).

Com altas taxas de morbi-mortalidade, o câncer é um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Em 2018, foram registrados mundialmente cerca de 18 milhões de casos novos e 9,6 milhões de óbitos, estando no ranking das 4 principais causas de morte. Com o aumento da expectativa de vida, globalização e a urbanização estima-se que nas próximas duas décadas, o número de novos casos cresça em torno de 80% (INCA, 2020).

Desde meados de 1909, muito tem se questionado sobre a atuação do sistema imunológico no combate a tumores. Burnet e Thomas (1970) formularam a teoria da vigilância imunológica, onde antígenos associados a células tumorais induzem uma resposta imunológica e evitam o crescimento ou destruindo células transformadas antes que se tornem tumores lesivos. Com o avanço das pesquisas, percebeu-se que o sistema imune além de eliminar as células transformadas é capaz de editar a imunogenocidade do tumor. Assim, o conceito de vigilância imunológica foi reformulado, surgindo o conceito de imunoedição do câncer, composto de três etapas: eliminação – cooperação entre imunidade inata e adaptativa para eliminar as células transformadas, equilíbrio - fase de latência tumoral, mediada principalmente pela imunidade adaptativa e escape - células transformadas usam mecanismos para escapar da resposta imunológica e consequente progressão tumoral (DUNN et al., 2002, RIBATTI 2017; VESELY et al., 2011).

No microambiente tumoral, o infiltrado de células neoplásicas interage com as células imunes, podendo prevenir a iniciação e progressão do tumor, bem como facilitar o desenvolvimento de tumores. Além disso, diversos mecanismos imunes vêm sendo explorado, com o intuito de fornecer estratégias para erradicação de tumores (HAGERLING et al., 2014).

Na imunidade inata, as células naturais killers (NKs), são a primeira linha de defesa contra vírus, bactérias intracelulares e células neoplásicas. Para sua ativação, as NKs reconhecem a ausência ou menor expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC I) nas células alvo, e/ou expressão de ligantes para receptores de ativação, como o receptor NKG2D expresso em NKs e linfócitos citotóxicos TCD8⁺ (NARENDRA et al., 2013; LANGERS et al., 2012). A lise das células tumorais pode ser induzida pela liberação direta de granzimas e perforinas, expressão de FasL e ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL), secreção de IFN- γ , ou através da citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) (CHENG et al., 2013). Por meio da produção de IFN- γ , indiretamente as NKs podem ativar TCD8 citolíticos, assim como promover a diferenciação das células TCD4 em perfil Th1 (MARTIN-FONTECHA et al., 2004).

Além disso, as NK ativadas podem eliminar células dendríticas (DCs) imaturas, assim como ao secretarem IFN- γ e TNF- α , induzir a maturação de DCs, estimulando a produção de IL-12, proporcionando uma forte resposta protetora T CD8⁺ (MARKOV et al., 2016). Além de colaborarem com a imunidade inata, recentemente foi demonstrado

que as NKs apresentam propriedades de células de memória, apesar de não está esclarecido qual mecanismo para ativação deste fenótipo, é provável que seja apenas por estimulação de citocinas. Jin e colaboradores (2016) em modelo experimental de leucemia linfoblástica aguda, demonstraram que a pré-ativação e re-estimulação *in vivo* com interleucinas, pode gerar células NK com fenótipo de memória, com aumentada proliferação e produção de IFN- γ , potente atividade anti-leucêmica, podendo este fenótipo ser passada para próximas gerações de NKs.

As células dendríticas (DCs) são apresentadoras de antígeno profissionais, fator chave na iniciação e manutenção da imunidade tumoral, ligando imunidade inata e adaptativa e sustentando a tolerância imunológica (ZONG, 2016). Devido a sua heterogeneidade são classificadas em duas categorias: DCs convencionais e DCs plasmocitoides (pDCs). As DCs podem combater o tumor por dois mecanismos: 1) indução indireta de potente resposta T CD8⁺ e 2) citotoxicidade direta (PALUCKA et al., 2011). As pDCs humanas, após serem ativadas produzem altos níveis de IFN tipo I e além do efeito citotóxico direto, podem exercer efeitos indiretos: como ativação de NK, aumento da capacidade de apresentação antigênica das células T e geração de DCs “killers” por indução de IFN- α (TEL et al., 2014).

Os macrófagos dentro do contexto de resposta antitumoral exercem funções controversas, dependendo dos estímulos ambientais podendo assumir fenótipos distintos, além da questão de estar associados aos tumores (TAMs) ou envolvido na resposta sistêmica. Os mesmos podem inibir ou promover o desenvolvimento dos tumores, por meio da angiogênese, remodelação da matriz extracelular e supressão da imunidade adaptativa (CONWAY et al., 2016; MANTOVANNI et al., 2006). Basicamente são classificados em macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos alternativamente ativados (M2). Em um ambiente com predomínio de respostas Th1, citocinas pro-inflamatórias estimulam os macrófagos a assumir um perfil M1, que tem por funções alta capacidade tumoricida, secreção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (CXCL9, CXCL10 e CXCL15), ativação de NKs e apresentação de antígenos aos linfócitos. Num ambiente mediado por resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10), os macrófagos assumem um fenótipo (M2), que estão mais relacionados a remodelação tecidual, angiogênese, expressam quimiocinas anti-inflamatórias favorecem a liberação de ferro que está associado com a proliferação celular, além de apresentarem uma menor capacidade tumoricida, de apresentação

antigênica e favorece uma resposta Treg e adequado microambiente imunossupressor para crescimento tumoral (BISWAS; MANTOVANI, 2010).

O óxido nítrico (NO) é produzido através de um processo de oxidação mediada pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS). O NO apresenta diversas funções nos processos inflamatórios e vasodilatação, atua como antioxidante e possui ação citotóxica e citotástica frente a micro-organismos. No contexto de câncer, possui um papel dicotômico, podendo contribuir com o crescimento tumoral e por outro lado ter uma função tumoricida, ao induzir apoptose e aumentar a citotoxicidade. A alta produção pode trazer malefícios no contexto tumoral, facilitando os processos de angiogênese tumoral e metástase (THOMSEN et al., 1998; CHEN and STONER, 2004)

Na imunidade tumoral adaptativa, linfócitos B e T participam da destruição de células tumorais. Sendo o principal mecanismo, a eliminação por linfócitos T citotóxicos ou citolíticos (CTLs/ CD8+). Os CTLs desempenham a função de vigilância, pelo reconhecimento e morte de células potencialmente malignas que expressam peptídeos derivados de antígenos tumorais complexados com moléculas MHC classe I. Assim como as NKs, a citólise é mediada por granzimas e perforinas e a produção de IFN- γ atua de forma autócrina, potencializando a sua ativação (KIRAZ et al., 2016, PARDOLL et al., 1998). Li e colaboradores (2014), num modelo vacinal com células tumorais irradiadas e estimuladas com LPS, relataram elevada atividade citotóxica *in vitro* dos linfócitos TCD8+, além de inibição da imunidade antitumoral *in vivo* quando os linfócitos CD8 foram depletados.

Como é sabido, para uma efetiva resposta antitumoral é necessário o envolvimento de ambas as células T CD8+ e CD4+ (HUNG et al., 1998). Os linfócitos T CD4+ atuam na imunidade tumoral ao reconhecerem peptídeos complexados a moléculas MHC classe II, e dessa forma diversos perfis podem ser induzidos, Th1, Th2, Treg e Th17 (PROTTI et al., 2014). Quando induzido um perfil Th1, um espectro de citocinas, como IFN e TNF facilitam a proliferação de células TCD8 efectoras e de memória específicas ao tumor (OSTRAND et al., 2005). Num modelo experimental de câncer de mama espontâneo, a indução do perfil Th2, facilita a metástase pulmonar através da ativação de macrófagos (DENARDO et al., 2009). Uma função alternativa, das células TCD4 para auxiliar a resposta T citotóxica, é a elevada expressão de CD40L, que consequentemente aumenta a capacidade de apresentação antigênica e atividade co-estimulatória das APCs sobre os linfócitos TCD8+ (OSTRAND et al., 2005). Além de disso, a diferenciação nos perfis Th1 e Th2, pode ativar macrófagos e

eosinófilos a produzirem superóxido e óxido nítrico, acarretando a lise das células tumorais (HUNG et al., 1998). Ao longo dos anos, modelos vacinas tem demonstrado o potencial das células TCD4 em não apenas auxiliar a resposta T citotóxica, mas também ativar macrófagos e células NK e capacidade citotóxica direta ou indiretamente (CORTHAY et al., 2005; HAABETH et al., 2020; PEREZ-DIEZ et al., 2007). Usando um modelo de tumor pancreático, verificou-se que células TCD4+ tumor-específica, podem proporcionar benefícios adicionais na erradicação do tumor, por um mecanismo dependente de IFN- γ e IL-2, amplificando o recrutamento e a proliferação, bem como a expressão de granzimas nos linfócitos TCD8 específicos (BOS e SHERMAN, 2010)

As células Th17, pró-inflamatórias, presentes em doenças autoimunes, inflamação e no câncer, apresentam funções controversas, demonstrando mecanismos pró- e antitumorais (HEMDAN et al., 2013). Nos diferentes tipos de câncer, além da produção de IL-17, com o predomínio do perfil Th17, ocorre mínima produção de IL-10 e altos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-2 (KRYCZEC et al., 2009). A IL-17 parece ter função oncogênica, inibindo a apoptose de células tumorais, prejudicando a resposta imune antitumoral, promovendo angiogênese, invasão e metástase (QUIAN et al., 2015). De modo interessante, regula a resposta adaptativa, recrutando linfócitos T, aumentando a atividade das NKs e promovendo geração e ativação de CTLs (QUIAN et al., 2015; HIRAHARA et al., 2001).

Durante o desenvolvimento tumoral, a população de linfócitos B pode atuar de maneiras distintas, regulando positivamente ou negativamente a resposta de células T comprometendo ou favorecendo o desenvolvimento de células tumorais (WHANG et al 2016). Os linfócitos B podem inibir o desenvolvimento tumoral através da geração de anticorpos, apresentação de antígenos, interação com tecido tumoral e citotoxicidade direta. Por outro lado, outro subtipo de células B com função regulatória (Bregs) pode atenuar a resposta imune no microambiente tumoral, ao recrutar Treg, ao secretar IL-10 (SHEN et al 2016). Em um modelo de transferência adotiva de células B ativadas *in vitro*, verificou-se regressão tumoral, através da alta produção de IgG específica, inibição de metástase espontânea, alta síntese de IFN- γ e potencialização da atividade citotóxica (LI et al., 2011). Além disso, outras subpopulações como as células B IgG+, melhoram a capacidade de apresentação antigênica das APCs e induzem a maturação de células dendríticas. As células B CD20+, por intermédio da produção de IgG2b e sob influência da citocina IL-17, potencializam a atividade citotóxica das células T (FORTE et al., 2012). Estudo *in vitro* de células tumorais incubadas com linfócitos B pulmonares

demonstrou um aumento na expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86. Além disso, ao avaliar a produção de IFN- γ na ausência de linfócitos B, demonstrou-se uma redução na produção de IFN- γ . Os linfócitos B ao secretarem IFN- γ , contribuem com a indução de células NK, facilitando sua função citolítica (JONES et al., 2008).

2.4 CARCINOMA DE EHRLICH

O carcinoma de Ehrlich é um tipo de tumor transplantável comumente utilizado em estudos de oncologia experimental que avaliam a capacidade terapêutica de fármacos. Foi descoberto em 1886 por Paul Ehrlich ao observar o crescimento de modo espontâneo no tecido mamário de camundongos fêmeas. Portanto, é um adenocarcinoma mamário, espécie-específico, de origem epitelial. Podendo assumir a forma ascítica quando inoculado via intraperitoneal ou a forma sólida quando inoculado por via subcutânea (OZASLAN et al 2011). É comum, sua ampla utilização em estudos de modelos terapêuticos, devido à similaridade com os processos neoplásicos em humanos, como por exemplo, carcinomas gastrointestinais, câncer de pulmão, neoplasias abdominais e câncer de mama. No que diz respeito às repostas imunológicas sistêmicas, seja em modelo de tumor ascítico ou sólido, os estudos são escassos, devido a maior parte dos estudos serem voltados para a obtenção de drogas terapêuticas frente às células neoplásicas.

É sabido que carcinoma Ehrlich é uma neoplasia com baixa capacidade imunogênica, devido ao processo de perda da molécula de MHC II ao longo do processo de transformação (CHEN; WATKINS, 1970). De fato, em modelo experimental de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), houve uma redução na população total de linfócitos esplênicos TCD4⁺ e CD8⁺, seguido de um aumento na população de macrófagos e linfócitos B (SEGURA et al 1997; 2000), estes últimos restabelecem aos valores normais dentro de 7 dias. Além disso, foi demonstrado que TAE induz um forte resposta de anticorpos do tipo IgM (GIL et al 1990), configurando uma resposta imune tipo T-independente. Recentemente, foi relatado que nas semanas seguintes a implantação do TAE, ocorre uma menor frequência de linfócitos T (CD4 e CD8), além de linfócitos B (CD19⁺) esplênicos e maior de produção de IL-17 (FEITOSA et al 2021).

Durante o processo de carcinogênese do CE é sabido que ocorre um processo de inibição na maturação de células TCD4 e CD8, constatado pelo acúmulo de células

CD4⁺ CD8⁻, em contrapartida com menor população de células CD4⁺ CD8⁺ (MANDAL et al 2005). Este fato é resultante da regulação negativa do receptor da IL-7 e, consequente diminuição de fosforilação da via JAK3-STAT e favorece a ação da Bcl-2/Bax, levando ao aumento da apoptose de timócitos e diminuição da maturação de células T (MANDAL et al 2006). Mandal e colaboradores (2005;2006), utilizaram o TAE associado ao tratamento com extrato de chá preto e observaram redução na taxa de mortalidade e hipocelularidade tímica, volume tumoral baixo, menor número de células neoplásicas, inibição da produção intracelular de ROS pelos timócitos, menores danos no DNA indicando sua capacidade timoprotetora. Os autores relataram que o chá preto com seu efeito antioxidante, pode regular as vias de sinalização IL-7Ra e JAK-STAT-Bcl-2/Bax, resultando em regressão tumoral, ao restaurar a função tímica, culminando no melhor prognóstico para os camundongos tratados e portadores de tumor.

Na forma sólida do CE, após o sétimo dia de inoculação é potencializado o seu desenvolvimento. Do ponto de vista histológico, logo na primeira semana pós-inoculação ocorre uma extensa necrose, com poucas células inflamatórias, atipia celular, estroma escasso e pouca vascularização (FEITOSA et al 2021). São poucos os estudos que relatam sobre as modificações imunológicas no contexto do tumor sólido de Ehrlich. Entretanto, tem-se relatado alguns achados interessantes, como o aumento sérico de TNF- α , seguido de um status pró-inflamatório com elevação nas enzimas lactato desidrogenase (LDH) e Creatina Kinase (FRAJACOMO et al 2016). No 7º dia pós-implantação, houve redução na frequência de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, aumento nos níveis séricos de Qa-2 (homólogo murino do HLA-G humano) e na expressão de Foxp3⁺. Contudo, no 14º dia ocorre uma inversão do perfil de linfócitos infiltrantes, com redução nos níveis de Qa-2 e Foxp3⁺ e aumento de linfócitos CD8⁺ (SILVA et al 2017).

Com relação aos macrófagos, num modelo experimental com TAE, foi demonstrado macrófagos com alta expressão de CD206 e baixa produção de óxido nítrico (NO), caracterizando fenótipo M2. Neste mesmo estudo, ao injetar macrófagos pré-ativados e polarizados para um fenótipo M1, houve um aumento no tempo de sobrevivência dos camundongos com TAE, maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e maior produção de NO, elucidando o efeito do fenótipo M1 com o melhor prognóstico (KALISH et al., 2015). Recentemente, foi demonstrado que há uma tendência à polarização para o perfil alternativamente ativado (M2) com elevada produção de IL-1 β e IL-6 e menor frequência de macrófagos classicamente ativados

(M1) e menor produção de TNF- α e IL-1 α , além de menor produção de NO (FEITOSA et al 2021).

2.5 IMUNIDADE ANTITUMORAL FRENTE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS.

Apesar da alta incidência do câncer em países em desenvolvimento, nas últimas décadas, verificou-se um aumento na incidência em países desenvolvidos, provavelmente associada à baixa incidência de doenças infecciosas (OIKONOMOPOULOU et al., 2013). Estudos, em modelos experimentais e em humanos, têm reportado as parasitoses ou produtos relacionados ao parasita como fator de redução do crescimento tumoral (DARANI; YOUSEFI, 2012; UBILLIOUS et al., 2016). Entretanto, ainda não estão esclarecidos quais mecanismos imunomodulatórios estão associados a este efeito oncoprotetor.

Com relação aos macrófagos, num modelo de vacinação com células tumorais autólogas associado há uma fração proteica de *Toxoplasma gondii* (TgPLP), submetidos a implantação do carcinoma de cólon, houve uma maior sobrevida (60%), menor massa tumoral, aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias (MHC I, II, CD80 e CD86) em macrófagos. Além de uma produção aumentada das citocinas IL-12 e IFN- γ , potencialização do status de ativação das células imunes, apesar de não interferir com o aumento do número dessas células. Sendo assim, é provável que essa fração parasitária possa demonstrar um efeito adjuvante considerável a vacina de células tumorais (PYO et al., 2016). León-Cabrera e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos infectados por *T. crassiceps* e com câncer de cólon, apresentaram menor infiltrado inflamatório, aumento no recrutamento de macrófagos, principalmente os alternativamente ativados (M2), atenuada produção de mediadores inflamatórios (TNF- α e IFN- γ) e consequente redução na massa tumoral.

Em modelo de infecção fúngica associado a carcinoma de Ehrlich, foi demonstrada uma disseminação da infecção associada à alta síntese de IL-10 e baixa de IFN- γ e TNF- α , com indução de um fenótipo de macrófagos alternativamente ativados (CAMARGO et al., 2009). Então, estes resultados são controversos ao papel dos macrófagos no contexto tumoral, sendo importante saber se a indução de células como os macrófagos, em descendentes adultos de mães esquistossomóticas podem atuar na resposta imune antitumoral.

Em estudo experimental, foi demonstrado que a presença de níveis de anticorpos específicos para *T. cruzi* está diretamente relacionada com o efeito imunoprotetor, onde camundongos com baixos níveis de anticorpos específicos apresentaram alta frequência de células tumorais do carcinoma de Ehrlich (KALLINIKOVA et al., 2008).

Em infecções pelo *S. mansoni* associados à implantação do Sarcoma 180, foi observado uma redução no crescimento tumoral, bem como no número de células polimorfonucleares (PEREIRA; RASO; COELHO, 1986), provavelmente associados a ativação de macrófagos peritoneais. Por outro lado, Yoshida e colaboradores (2002) num modelo de infecção esquistossomótica com uma baixa carga parasitária, demonstraram menor produção de IL-2 e IFN- γ , associado há altos níveis de IL-4 e IL-1, entretanto o curso da erradicação das células de fibrosarcoma tumorais foram semelhantes nos camundongos não infectados e ressaltam a necessidade dos linfócitos T CD8⁺ neste fenômeno. Os autores relataram que apesar do ambiente Th2, e uma menor atividade citolítica *in vitro*, as células neoplásicas foram completamente eliminadas. Por sua vez, Eissa e colaboradores (2019), num modelo de imunização com antígeno bruto de *S. mansoni* num modelo de câncer de cólon, observaram uma curva de sobrevida em torno de 80%, alta frequência de células esplênicas TCD4⁺ e menor incidência de neoplasia intestinal. Apesar de Eissa e colaboradores (2019) avaliarem a reposta antitumoral mediada por imunização com antígenos, o mesmo sugere que a infecção pode reforçar a diminuição do tumor.

Sendo assim, o contato com produtos parasitários, seja via infecção ou imunização pode culminar na proteção antitumoral. Ao mesmo tempo, o leite de mães esquistossomóticas devido ao seu potencial dicotômico, modula a resposta para antígenos heterólogos. Então, é possível que a infecção ou o contato com o leite de mães infectadas module a evolução de tumores sólidos, bem como o status de linfócitos e macrófagos, a produção de anticorpos, citocinas e óxido nítrico contribuindo com a proteção contra o tumor, levando á regressão do mesmo. Enquanto a gestação com o seu ambiente imunossupressor, favoreça o desenvolvimento do tumor sólido e resultando em um mal prognóstico.

É possível que ocorra melhora na ativação dos linfócitos com supressão de células como macrófagos alternativamente ativados (M2), indução de macrófagos classicamente ativados (M1), além da potencialização da produção de anticorpos nos animais infectados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em camundongos infectados pelo *S. mansoni* e em descendentes adultos gerados ou amamentados em mães infectadas o desenvolvimento tumoral (peso e sobrevida) e a resposta imune anti-tumor através do status de ativação de linfócitos TCD4+, TCD8+ e linfócitos B, produção de citocinas, óxido nítrico, anticorpos e o fenótipo de macrófagos classicamente (M1) e alternativamente ativados (M2).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar nos camundongos esquistossomóticos e nos descendentes nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas, quando submetidos à implantação do Carcinoma de Ehrlich na vida adulta, com camundongos nascidos/amamentados em mães não infectadas submetidos ou não à implantação tumoral

3.2.1. A curva de sobrevida, o peso do animal e tumoral nos camundongos portadores do Carcinoma de Ehrlich.

3.2.2. Os níveis de IgG total e IgG1 e IgG2a anti-CE no soro

3.2.3 O perfil dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos (CD4+, CD8+, CD28+, CTLA-4+ e CD40L+).

3.2.4 A frequência de macrófagos CD16/CD32+/NOS-2+ ou CD206+/ IL-10+.

3.2.5 A frequência de linfócitos B regulatórios (CD19+/ CD1d+) e linfócitos B (CD19+ CD80+ e CD86+).

3.2.6 Dosagem de citocinas IFN- γ , IL-5, IL-4, IL-10 e TGF- β e óxido nítrico (NO) no sobrenadante de cultura de células esplênicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DE ESTUDO.

Realizou-se um estudo experimental e intervencionista com quatro populações de estudo, camundongos gerados e/ou amamentados em mães esquistossomóticas e camundongos infectados com *S. mansoni* submetidos à implantação do Carcinoma de Ehrlich. Para a obtenção da população de estudo, um grupo de camundongos fêmeas sofreu a intervenção (infecção com *S. mansoni*) e o outro grupo serviu para termos de comparação dos resultados.

Entretanto, não é possível afirmar que os resultados obtidos sejam reprodutíveis em seres humanos. Os animais do estudo foram escolhidos de forma aleatória, 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.

4.2 LOCAL DE ESTUDO.

As etapas do estudo relacionadas à infecção, acasalamento, manutenção das fêmeas infectadas e implantação das células tumorais, foram realizadas no Biotério de experimentação do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE). Posteriormente, todos os procedimentos laboratoriais (cultura das células esplênicas, imunofenotipagem, dosagens de citocinas, anticorpos e óxido nítrico) 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 IAM/FIOCRUZ.

4.3 ANIMAIS.

Para o estudo que avalia a resposta antitumoral frente à infecção foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com 4 semanas de idade para infecção com 60 cercárias de *S. mansoni* da cepa BH (Belo Horizonte) e 15 animais não-infectadas foram utilizadas como CONTROLE. Para o estudo que avalia a resposta antitumoral de descendentes de mães esquistossomóticas, foram utilizados 20 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com 4 semanas de idade para infecção com 20 cercárias de *S. mansoni* e 15 animais não-infectadas foram utilizadas como CONTROLE. Dezoito camundongos machos da mesma espécie foram utilizados

para o acasalamento. Os animais foram fornecidos e mantidos em condições adequadas no biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ) (CEUA 113/2017).

4.4 INFECÇÃO E PARASITOLÓGICO DE FEZES.

Duas infecções foram realizadas, com as seguintes cargas: 60 e 20 cercárias de *S. mansoni* por via percutânea recentemente emitidas e obtidas de exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e infectados por miracídeos da cepa BH (Belo Horizonte). Após 48 dias de infecção, os camundongos fêmeas foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. A infecção foi confirmada através da leitura de lâminas parasitológicas pelo método de Kato-Katz (KATZ, CHAVES; PELLEGRINO, 1972).

4.5 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTO.

Sessenta dias após a infecção, as fêmeas foram submetidas à indução 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). O mesmo procedimento foi realizado para as fêmeas não infectadas.

4.6 OPERACIONALIZAÇÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO.

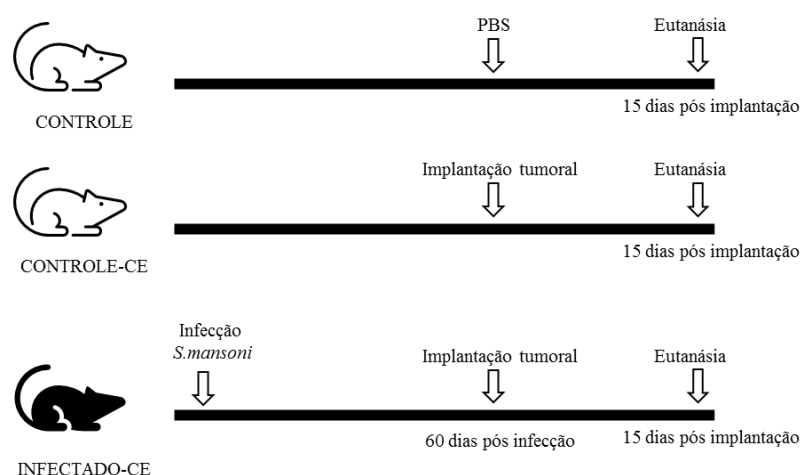
Vinte fêmeas foram infectadas com 60 cercárias, e paralelamente tivemos 15 fêmeas sem infecção. Após 60 dias de infecção foram submetidas a implantação tumoral e os seguintes grupos foram formados: não infectados e não portadores de tumor, sendo administrado solução salina fosfatada (PBS) (**CONTROLE**), animais não infectados e portadores de tumor (**CONTROLE-CE**) e infectados e portadores de tumor (**INFECTADO-CE**) (Figura 2).

Para o experimento dos descendentes de mães infectadas, foram utilizados 35 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* com 4 semanas de idade. Destas, 20 fêmeas foram infectadas (20 cercárias) e monitoradas no 45º dia para confirmação da infecção. No 60º dia, ocorreu sincronização do estro e acasalamento. Paralelamente, para formação do grupo **CONTROLE**, outras 15 fêmeas não-infectadas também tiveram seu estro sincronizado e acasalaram. Para formação dos grupos de estudo, parte dos filhotes de mães não infectadas foi amamentada em mães infectadas e a outra parte permaneceu amamentando em suas próprias mães (SANTOS et al 2010).

Após 60 dias de nascimento, as fêmeas foram selecionadas para implantação do tumor sólido com as células da forma ascítica do Carcinoma de Ehrlich, formando os seguintes grupos (n=15): **CONTROLE-CE** - fêmeas nascidas e amamentadas em mães não infectadas, **AI** fêmeas nascidas de mães não infectadas que foram amamentadas em mães infectadas, **MAI** fêmeas nascidas e amamentadas em mães infectadas, **MI** fêmeas nascidas em mães infectadas e amamentadas em mães não infectadas (Figura 1).

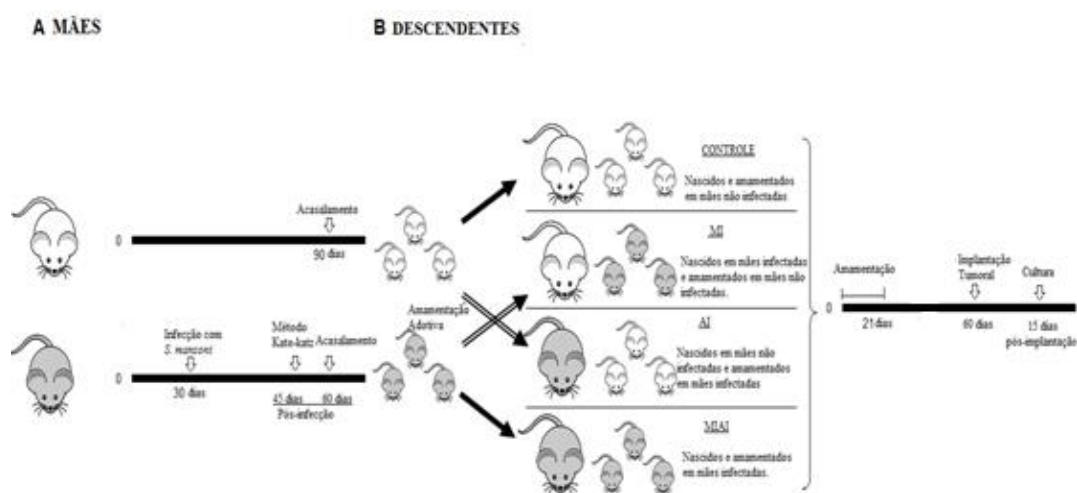
As células de todos os grupos de estudo que foram utilizadas para os ensaios *in vitro* foram obtidas de modo individual do baço dos camundongos adultos.

Figura 1 - Formação dos grupos de estudos



Fonte: o autor, 2021

Figura 2 - Delineamento experimental



Fonte: o autor, 2021

4.7 IMPLANTAÇÃO TUMORAL DE CARCINOMA DE EHRLICH

As células tumorais de Carcinoma de Ehrlich foram removidas de animais doadores por aspiração da forma ascítica e inoculada via subcutânea na região axilar em camundongos recipientes, na concentração de 25×10^6 cells/ml (SILVA et al 2016).

4.8 EXSANGUINAÇÃO TOTAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA

Os animais dos grupos **CONTROLE**, **CONTROLE-CE** e **INFECTADO-CE**, **AI**, **MI** e **MIAI** foram sangrados no 15º dia pós-implantação tumoral, por punção cardíaca, após anestesia com associação de Xilazina (5 mg/Kg) e Quetamina (80 mg/Kg) por via intramuscular (face posterior da coxa), utilizando seringa de 1mL e agulha 13 x 4,5mm). O sangue foi coletado com seringa de 1mL com anticoagulante. O volume de 1,0 mL de sangue, colhido, de cada animal, foi centrifugado $413g \times 5$ min para obtenção do plasma. Os plasmas foram estocados a -20°C para posterior dosagem de IgG total e IgG1 e IgG2a anti-CSA por ELISA direto e indireto, respectivamente.

4.9 PESAGEM DOS ANIMAIS E DO TUMOR.

Nos dias 0, 8 e 15 dias após a implantação das células tumorais os animais foram submetidos à pesagem. No 15º dia, após a eutanásia dos camundongos, o tumor foi removido e pesado.

4.10 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE CARCINOMA (CSA)

O CSA foi preparado como descrito por WANG et al (2012). Resumidamente, as células ascíticas de Carcinoma de Ehrlich foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongos portadores do tumor. Após a aquisição das células, as mesmas foram lavadas e centrifugadas três vezes em soro fisiológico estéril, em seguida, contadas e suspensas em solução salina numa concentração de 1×10^8 células/mL. As células foram lisadas por cinco ciclos de 30 minutos de congelamento em nitrogênio líquido e 10 minutos de descongelamento a 37°C .

4.11 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS.

Para os ensaios *in vitro*, os baços foram coletados e processados individualmente, dos animais dos diferentes grupos de estudo, no 15º dia após a implantação do tumor. As suspensões de células esplênicas foram, então, obtidas assepticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St.

Louis, USA). Após centrifugação (413 x g por 10min/ 4°C), as hemácias provenientes do órgão foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 20 segundos. As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com (10%) de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo. USA), mantidas no gelo por 5 min (para deposição do estroma) e, após esse período, a suspensão celular foi transferida para outro tubo. A contagem das células e o teste de viabilidade foi realizada 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 (2×10^7 células/mL (24 h) e 12×10^6 células/mL (72h), em placas de 48 poços (Costar Culture Plates, City, USA), e foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ humidificada, no intervalo de 24h e 72h. Os sobrenadantes foram coletados após 24h e 72h de cultivo para ensaios de dosagem de citocinas: IL-4, IL-5 (24h), IFN- γ , TGF- β , NO e IL-10 (72 h). As células cultivadas foram coletadas após 24h para imunofenotipagem.

4.12 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA IMUNOFENOTIPAGEM.

Após 24 horas, foram coletadas, lavadas e submetidas às marcações com anticorpos monoclonais específicos e conjugados a substâncias fluorescentes. Marcação para Linfócitos T efetores e citotóxicos (anti-CD4 FITC ou anti-CD8 APC anti-CD28 PE, anti-CD40L PE, anti-CTLA-4 PE,); Macrófagos (anti-CD16/CD32 FITC, anti-NOS2 APC, anti-CD206 APC, anti-IL-10 PE), linfócitos B de função regulatória (anti-CD1d PE e anti-CD19 APC) e linfócitos B (anti-CD19 APC, anti-CD80 PE, anti-CD86 PE) (SANTOS et al 2016; De HOLANDA et al 2020). Os eventos (50.000 para linfócitos e 5000 para macrófagos) foram adquiridos e analisados com o programa Flow Jo, LLC. As células foram analisadas inicialmente quanto ao tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) e as células mortas foram dispensadas. Os resultados foram expressos como a média da porcentagem ou o número absoluto de células positivas acrescida do desvio padrão ou pela intensidade média de fluorescência (MIF).

4.13 DOSAGEM DAS CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO.

Os sobrenadantes da cultura das células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos, foram coletados. Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ foram determinados por ELISA sanduíche, nos sobrenadantes dos tempos de 24 e 72 horas de cultivo (SANTOS et al 2010). Placas de ELISA (2595, Costar, Cambridge, MA, USA)

foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura específico para cada citocina e incubadas à temperatura de 4°C por 18 horas. Em seguida, foram bloqueadas por 30 minutos. Após lavagem e distribuição das amostras, as placas foram incubadas a 4°C por 18 h, e após esse período, foram lavadas, para posterior adição do segundo anticorpo biotinilado, específicos para as diferentes citocinas, Em seguida à incubação à temperatura ambiente por 1 h, cada placa foi novamente lavada e, então, adicionada o conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA). Após incubação à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas com PBS-T e a reação revelada pela adição do substrato contendo H₂O₂ e o cromógeno ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1M e fosfato de sódio 0,2M pH= 5,5. A reação foi então bloqueada com ácido cítrico 0,2M e a leitura realizada a 405 nm em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550). A mensuração de TGF- β foi realizada usando o kit Human TGF- β CytoSet™ (Invitrogen, Camarillo, CA) seguindo as especificações do fabricante para ativação do TGF- β com o tratamento com HCl e NaOH (SILVA et al 2021). As curvas padrão foram usadas para quantificar as amostras com limites de detecção de 0.625 ng/ml para IL-10, 2.5 ng/ml para IFN- γ , 62.5 pg/mL para TGF- β , 0.312 ng/ml para IL-5, e 0.3125 ng/ml ou IL-4. Os níveis de NO foram mensurados em cultura de sobrenadante usando o método de Griess. Os resultados foram apresentados como mediana da concentração $\pm$ erro padrão.

4.14 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS

Amostras de sangue foram coletadas 15 dias após a implantação tumoral para avaliação das imunoglobulinas tumorais (IgG1 e IgG2a) e IgG total usando placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Denmark). As placas foram sensibilizadas com 10 μ g/mL CSA para detecção de IgG1 e IgG2a anti-tumor por ELISA indireto. IgG total foi mensurado por meio do ELISA direto (NASCIMENTO et al 2014). Anticorpos biotinilados de cabra anti-camundongo foram utilizados (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA). As reações foram reveladas usando o conjugado estreptoavidina peroxidase (Sigma-Aldrich) e O-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) mais H₂O₂. Os resultados foram obtidos após a leitura em 450 nm e foram expressos como a mediana da densidade óptica de cada grupo (n = 7) em uma diluição apropriada (1:50 para IgG total e 1:2 para IgG1 e IgG2a anti-tumor) $\pm$ erro padrão.

4.15 VARIÁVEIS

4.15.1 Variáveis Independentes

Foram consideradas variáveis independentes a infecção pelo *S. mansoni*. Foram infectadas fêmeas *Swiss webster* para a obtenção de descendentes nascidos ou amamentados em mães infectadas. As variáveis são consideradas dicotômicas (sim/não).

4.15.2 Variáveis Dependentes

As variáveis dependentes contínuas foram a expressão de CD4, CD8, CD28, CD40L, CTLA-4, CD16/CD32, NOS-2, CD206, IL-10, CD19, CD80, CD86 e CD1d na cultura de células esplênicas, os níveis de IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-10 e TGF- β e o peso corpóreo e tumoral, e os anticorpos total e específicos em camundongos nascidos e/ou amamentados em mães infectadas e não-infectadas assim como em camundongos esquistossomóticos submetidos à implantação tumoral.

4.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados usando o teste de Bartlett para determinar se a distribuição dos dados segue a normalidade. Para o peso corpóreo e tumoral, foi realizado o teste one way ANOVA seguido do teste de Tukey. Para a curva de sobrevivência, foi realizado o teste log-rank. Para os parâmetros avaliados por citometria de fluxo, produção de anticorpos, síntese de citocinas e NO foi realizado o teste Kruskal–Wallis seguido do teste Mann–Whitney U para múltiplas comparações no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram significantes com $p < 0.05$. Os experimentos foram realizados em triplicata para avaliar a reprodutibilidade dos dados. Nós demonstramos um experimento representativo de 3 experimentos independentes.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1: CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI* DEMONSTRARAM CRESCIMENTO REDUZIDO DO CARCINOMA DE EHRLICH E MELHOR RESPOSTA IMUNE DAS LINFÓCITOS B E TCD8+, COM MENOR FREQUÊNCIA DE MACRÓFAGOS M2.

INTRODUÇÃO

Infecções e produtos parasitários são conhecidos por induzir respostas imunes anti-tumorais que retardam o desenvolvimento tumoral (DARANI; YOUSEFI, 2012). No entanto, durante as infecções com *Schistosoma mansoni*, a relação entre fatores que favorecem ou inibem o desenvolvimento de tumores ainda é controverso (EISSA et al., 2019; TODA et al. 2015; YOSHIDA et al. 2002). Em modelos murinos, houve demonstrações do potencial de infecções e produtos parasitários como oncoprotetores; no entanto, os mecanismos ainda permanecem incertos. Pereira e colaboradores (1986) relataram a regressão do Sarcoma 180 (tumor ascítico) e inibição do influxo de células polimorfonucleares. Sabe-se que, durante a esquistossomose, há uma predominância das respostas Th2/Treg (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10) (LUNDY E LUKACS, 2013) que podem prejudicar as respostas anti-tumorais Th1 (SCHIAVONI et al., 2013). No entanto, Yoshida et al. (2002) demonstraram que, *in vivo*, apesar do ambiente Th2 e da redução da atividade citotóxica *in vitro*, as células do fibrosarcoma foram completamente eliminadas pelas células TCD8+. Os autores sugeriram um mecanismo de erradicação de tumores independente dos linfócitos TCD4+. Recentemente, Eissa e colaboradores (2019) demonstraram que a administração do antígeno bruto de *S. mansoni* diminuiu o tamanho das lesões inflamatórias e o número de lesões neoplásicas, seguido do aumento do número de células efectoras TCD4+, células T regulatórias e produção de IL-10. Portanto, para determinar o potencial anti-tumoral da infecção por *S. mansoni*, investigamos o status de ativação de linfócitos CD4+, CD8+, B e macrófagos.

O carcinoma de Ehrlich é um adenocarcinoma mamário que ao ser inoculado via subcutânea, se desenvolve na forma sólida, com uma forma homogênea e bem delimitada. É um modelo usado principalmente para entender processos imunológicos, fisiológicos, assim como em novos protocolos terapêuticos e métodos diagnósticos. Ao estudar sobre o tumor de Ehrlich, ainda são poucos os estudos referentes a forma sólida. Contudo, tem-se demonstrado uma redução na população de linfócitos TCD4 infiltrantes, com um aumento de Qa-2 (marcador de maturação de linfócitos T e B),

seguido de redução na frequência de TCD8 e aumento de Foxp3 nos primeiros 7 dias pós-implantação, ocorrendo uma inversão ao final do 15º dia (SILVA et al 2017). Além de aumento na produção de TNF- α seguido de um status pro-inflamatório, com elevação nas enzimas lactato desidrogenase (LDH) e creatinina fosfoquinase (CK) (FRAJACOMO et al 2016). Azevedo e colaboradores (2014) demonstraram uma redução no crescimento do tumor sólido associado a imunidade concomitante, desencadeada por linfócitos B1 capazes de se diferenciar em fagócitos mononucleares, produção de IgM que provavelmente se liga a antígenos tumorais, levando há uma polarização do fenótipo de macrófagos M1. Ainda é necessário mais estudos para melhor compreensão da atuação dessas células no contexto de tumor sólido de Ehrlich.

Os macrófagos no microambiente tumoral podem assumir fenótipos e funções distintas a depender do estímulo recebido. Assumindo o perfil de macrófagos classicamente ativados (M1), (síntese de óxido nítrico (NO), secreção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias) alta capacidade tumoricida com a habilidade de recrutar linfócitos TCD8⁺ e NK. Quando ativados por citocinas do perfil Th2, assumem o fenótipo alternativamente ativados (M2), que secretam citocinas regulatórias (IL-10), participam da fibrogênese e angiogênese, além de pior prognóstico na maioria dos cânceres (CARAS et al., 2011; KALISH et al., 2015).

Os linfócitos B e T participam da destruição de células tumorais. Sendo uma forte resposta de linfócitos TCD8⁺, como principal mecanismo de erradicação de células neoplásicas, que requer o auxílio de células TCD4⁺ por intermédio de citocinas e contato celular por moléculas de membrana (BOS E SHERMAN, 2010). Para a interação entre as células B-TCD4 é requerida a ligação CD40-CD40L. O CD40L é uma molécula co-estimulatória no linfócito T que aumenta a expressão de moléculas CD80 e CD86 nas células apresentadoras de antígeno (APCs) que auxiliam na ativação das células T, levando a maior capacidade de apresentação antigênica e atividade co-estimulatória das APCs (MADDALY, 2010). Para os linfócitos B esta interação favorece a produção de anticorpos e troca isotópica (MA AND CLARCK, 2009).

Os linfócitos B no microambiente tumoral, podem contribuir para um bom ou mal prognóstico. Há três mecanismos distintos desempenhados pelos linfócitos B incluindo a produção de anticorpos, atividade como APCs e a citotoxicidade direta (NELSON, 2010). A transferência adotiva de células B ativadas, foi associada com a regressão tumoral, alta produção de IgG específica para antígenos tumorais, alta síntese de IFN- γ , potencialização da atividade citotóxica direta e ativação do sistema

complemento (LI et al., 2009, 2011). Forte e colaboradores (2012), em camundongos com melanoma e bloqueio de CD73, houve elevada frequência de células CD19+B220+ e síntese de IgG2b no ambiente tumoral, com altos níveis de IFN- γ e IL-17, ambas citocinas envolvidas com a produção deste isótipo, que promove melhor atividade dos linfócitos TCD8+ infiltrados no tecido tumoral.

Os linfócitos B com função regulatória podem contribuir com o mal prognóstico no microambiente tumoral, através da secreção de citocinas (IL-10, IL-35 e TGF- β), assim como o contato célula-célula, inibindo a proliferação de linfócitos efetores e citotóxicos (SHEN et al., 2016). Em pacientes com câncer cervical, houve uma alta frequência de linfócitos B regulatórios CD19+CD5+CD1d+, com elevada produção de IL-10 e redução na secreção de perforinas e granzima B, por linfócitos TCD8 co-cultivados com células Breg (CHEN et al., 2019).

Dado o potencial de proteção anti-tumoral de infecções e produtos parasitários, é possível que a infecção por *S. mansoni* module positivamente a resposta imune anti-tumoral, levando há uma redução do tumor, bem como melhorando a frequência de linfócitos e macrófagos M1. Portanto, neste estudo, nós mensuramos a curva de sobrevivência, o peso tumoral, o status de ativação dos linfócitos T e linfócitos B, bem como a frequência de macrófagos M1 e M2, juntamente com a produção de anticorpos, citocinas e NO em camundongos infectados por *S. mansoni* portadores de carcinoma Ehrlich.

MATERIAIS E MÉTODOS

Infecção com *S. mansoni*

Camundongos fêmeas *Swiss Webster*, com 4 semanas de vida foram infectados com cercárias de *S. mansoni* (cepa Belo Horizonte). Após 50 dias a infecção foi confirmada usando o método Kato-Katz. Os camundongos foram mantidos em condições adequadas no biotério do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brasil (IAM/FIOCRUZ). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da FIOCRUZ-PE sob o número de protocolo (CEUA-113/2017).

Implantação tumoral e formação dos grupos de estudo

Células tumorais (Carcinoma de Ehrlich) foram obtidas de animais doadores por aspiração do líquido ascítico e foram administradas via subcutânea na região sub

axilar na concentração de 25×10^6 células/mL (SILVA et al., 2016). Os seguintes grupos foram formados ($n = 15$ cada): não infectados e não portadores de tumor (CONTROLE) que receberam solução salina fosfatada (PBS), não infectados e portadores do tumor carcinoma de Ehrlich (CONTROLE-CE) e infectados e portadores do tumor carcinoma de Ehrlich (INFECTADO-CE).

Antígeno solúvel de Carcinoma (CSA)

CSA foi preparado como descrito por Wang e colaboradores (2012). Resumidamente, as células de carcinoma de Ehrlich foram recuperadas da cavidade peritoneal de camundongos portadores de tumor ascítico, as células foram lavadas e ressuspendidas em salina (1×10^8 células/mL) e foram lisadas em ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e aquecimento (37°C).

Peso tumoral e cultura de células esplênicas

Quinze dias após a implantação do carcinoma de Ehrlich, os animais foram eutanasiados (deslocamento cervical) para remoção do baço e tumor, e o último foi pesado. A suspensão de células esplênicas foi preparada em meio suplementado RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As células esplênicas de cada camundongo ($n = 7$) foram cultivadas apenas com meio (Basal), após estimulação com antígeno solúvel de carcinoma CSA ($200 \mu\text{g/mL}$) na concentração final de 2×10^7 (24 h) ou 12×10^6 (72 h) células/mL em placas de cultura de 48 poços (Corning, Inc., Corning, NY, USA) em 37°C e 5% CO_2 . Depois de 24h, as células foram marcadas para fenótipo de linfócitos T e B e macrófagos.

Análises da citometria de fluxo

As suspensões das células esplênicas (1×10^7 células/ml) foram marcadas duplamente com os seguintes anticorpos: anti-CD4 (FITC) ou anti-CD8a (APC) mais PE anti-CD28 ou CD40L ou CTLA-4. Os linfócitos B foram marcados com anti-CD19 (APC) mais anti-CD80 (PE), anti-CD86 (PE) ou anti-CD1d (PE). Os macrófagos foram marcados com anti-CD16/CD32 (FITC) ou anti-CD206 (APC) (eBioscience, San Diego, CA). Após a lavagem, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em PBS com soro bovino fetal 5% e seguiram para aquisição no citômetro FACSCalibur (BD-Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA) (mínimo 50.000 linfócitos ou 5.000 monócitos) seguidos de análises usando o software

FlowJo (v.10, Camarilo, CA, EUA). A subpopulação de linfócitos T foram inicialmente selecionados como células CD4⁺ em FL1/anti-CD4-FITC ou FL4/anti-CD8-APC versus o plot laser side-scatter (SSC). Dando seguimento ao primeiro gate, um segundo gate foi definido usando gráficos FL1/anti-CD4-FITC ou FL4/anti-CD8-APC versus FL2/anti-CD28-PE ou anti-CD40L-PE ou anti-CTLA-4-PE por quadrantes de mensurações estatísticas. As células B foram selecionadas como células CD19⁺ FL4/anti-CD19-APC versus SSC. Um segundo gate foi definido usando gráficos FL4/anti-CD19-APC versus FL2/anti-CD80-PE ou anti-CD86-PE ou anti-CD1d-PE. Os resultados foram expressos como a mediana da frequência de células de cada grupo $\pm$ erro padrão. Para monócitos/macrófagos, um gate foi realizado em torno da população de monócitos baseando-se no SSC versus FL1/anti-CD16/CD32 FITC ou FL4/anti-CD206. A partir do gate de monócitos, a fluorescência FITC (CD16/CD32) e APC (CD206) foi plotada em um histograma usando a intensidade média da fluorescência.

Dosagem de citocinas e NO

Os sobrenadantes da cultura foram coletados e os níveis de citocinas foram mensurados usando ELISA sanduíche, com os seguintes anticorpos monoclonais de captura para IFN- γ , AN18, e biotilado XCM1.2; para IL-10, C252-2A5 e biotilado SXC-1; para IL-5, 39D10 e biotilado 5A10; e para IL-4, 11B11 e biotilado BVD6-24G2. As reações foram reveladas usando um conjugado de estreptoavidina peroxidase (Sigma-Aldrich) e ABTS (2-2-azinobis (3 ethylbenzene-thiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich) mais H₂O₂. A mensuração de TGF- β foi realizada usando o kit humano TGF- β CytoSet™ (Invitrogen, Camarilo, CA) seguindo as especificações do fabricante para ativação do TGF- β com o tratamento com HCl e NaOH. As curvas padrão foram usadas para quantificar as amostras com limites de detecção de 0.625 ng/ml para IL-10, 2.5 ng/ml para IFN- γ , 62.5 pg/mL para TGF- β , 0.312 ng/ml para IL-5, e 0.3125 ng/ml ou IL-4. Os níveis de óxido nítrico foram mensurados na cultura de sobrenadantes usando o método de Griess. Os resultados obtidos foram expressos como a mediana da concentração $\pm$ desvio padrão.

Imunoglobulinas totais e anti-tumorais

Amostras de sangue foram coletadas 15 dias após a implantação tumoral para avaliação das imunoglobulinas tumorais (IgG1 e IgG2a) e IgG total usando placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Denmark). As placas foram sensibilizadas com 10 µg/mL CSA para detecção de IgG1 e IgG2a anti-tumor por ELISA indireto. Nós usamos ELISA direto para mensurar IgG total. Anticorpo biotinilado de ovelha anti-camundongo foram usados para mensurar IgG total e IgG1 ou IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA). As reações foram reveladas usando o conjugado estreptoavidina peroxidase (Sigma-Aldrich) e O-phenylenediamine (Sigma-Aldrich) mais H₂O₂. Os resultados foram obtidos após a leitura em 450 nm e foram expressos como a mediana da densidade óptica de cada grupo (n = 7) em uma diluição apropriada (1:50 para IgG total e 1:2 para IgG1 e IgG2a anti-CSA) ± erro padrão.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando o teste de Bartlett para determinar se a distribuição dos dados segue a normalidade. Para o peso tumoral, foi realizado o teste one way ANOVA seguido do teste de Tukey. Para a curva de sobrevida, foi realizado o teste log-rank. Para a citometria de fluxo, produção de anticorpos e síntese de citocinas foi realizado o teste Kruskal–Wallis test seguido do teste Mann–Whitney U- para múltiplas comparações no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram significantes com $p < 0.05$. Os experimentos foram realizados em triplicata para avaliar a reprodutibilidade dos dados. Nós demonstramos um experimento representativo de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS

Camundongos infectados por *S. mansoni* exibiram aumento da curva de sobrevida e redução do peso do tumor.

Os camundongos em ambos os grupos foram seguidos por 15 dias para a análise da curva de sobrevida. O grupo INFECTADO-CE demonstrou uma maior curva de sobrevida (73%) em comparação ao CONTROLE-CE (46%) (Figura 1A). No 15º dia pós-implantação, os tumores foram removidos e pesados. A Figura 1B

mostra que no grupo INFECTADO-CE houve significativamente menor peso tumoral em relação ao grupo CONTROLE-CE.

Infecção esquistossomótica melhora a frequência de linfócitos TCD8⁺ e altera a expressão de moléculas de membrana de ativação em linfócitos T.

Para a análise da frequência dos linfócitos T utilizamos um grupo de animais não infectado e sem tumor (CONTROLE) para fins de comparação com animais submetidos à implantação tumoral (CONTROLE-CE) e infectados (INFECTADO-CE) após cultivo com meio (basal) e sob estímulo antigênico (CSA). Nessas condições de cultivo, pôde ser observado que houve, significativamente menor frequência de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nos animais CONTROLE-CE em relação ao grupo CONTROLE (Fig. 2A e 2B). Nos animais infectados, também houve diminuição significativa da frequência de linfócitos TCD4⁺. A frequência de linfócitos TCD8, para basal, foi similar nos grupos CONTROLE e grupo INFECTADO-CE, mas não para estímulo antigênico em que houve menor frequência neste último. Vale à pena ressaltar que a frequência de linfócitos TCD8⁺ foi maior nos animais INFECTADO-CE quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.

Foram analisadas a expressão das moléculas CD28, CD40L e CTLA-4 nos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Houve uma maior frequência basal e sob estímulo antigênico de células CD4⁺/CD28⁺ e CD8⁺/CD28⁺ nos animais CONTROLE-CE e não houve diferença estatística para o grupo INFECTADO-CE, em relação ao grupo CONTROLE (Figura 2C e D). Em comparação ao CONTROLE-CE, os camundongos INFECTADO-CE demonstraram uma frequência menor de células CD4⁺/CD28⁺ e CD8⁺/CD28⁺ para as condições de cultivo utilizadas (Figura 2C e D).

A frequência das células CD4⁺/CD40L⁺ (Figura 2E) foi maior no grupo CONTROLE-CE em comparação ao CONTROLE, mas sem diferença estatística. Nos camundongos infectados a frequência de células CD4⁺/CD40L⁺, foi significativamente menor que o grupo CONTROLE-CE para basal e sob estímulo antigênico. Achado similar pôde ser observado para a frequência de célula CD8⁺/CD40L⁺ (Figura 2 F).

Na reestimulação *in vitro* com o CSA, o grupo CONTROLE-CE, apresentou uma maior frequência de células CD4⁺/CTLA-4⁺ em comparação ao CONTROLE.

Em comparação ao grupo CONTROLE-CE, a frequência das células CD4+/CTLA-4+ foi significativamente menor (em torno de duas vezes) no grupo INFECTADO-CE (Figura 2G). Na figura 2H, os camundongos CONTROLE-CE apresentaram uma maior frequência basal de CD8+/CTLA-4+ em comparação ao CONTROLE. Enquanto no grupo INFECTADO-CE houve uma diminuição (em torno de cinco vezes) para o cultivo basal e sob estímulo antigênico quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.

Camundongos esquistossomóticos com Carcinoma de Ehrlich apresentaram notável incremento na frequência de linfócitos B CD80+ e CD86+.

Os camundongos do grupo CONTROLE-CE demonstraram menor frequência basal e sob estímulo antigênico das células CD19+/CD86+ em relação ao CONTROLE, enquanto no grupo INFECTADO-CE foi significativamente maior que o grupo CONTROLE-CE (Figura 3A). A frequência basal de células CD19+/CD80+ foi menor no grupo CONTROLE-CE em comparação ao grupo CONTROLE. Houve aumento na frequência de células CD19+/CD80+ no cultivo basal ou com antígeno no grupo INFECTADO-CE quando comparado ao CONTROLE-CE (Figura 3B).

Em relação a dupla marcação CD19+/CD1d+, sob as condições de cultivo utilizadas os camundongos portadores de tumor, com ou sem infecção, demonstraram uma maior frequência em comparação ao CONTROLE. Enquanto, no grupo INFECTADO-CE houve diminuição em relação ao grupo CONTROLE-CE (Figura 3C).

A infecção pelo *S. mansoni* levou a uma diminuição de macrófagos tipo M2 em camundongos portadores do Carcinoma Ehrlich, mas não do M1.

A proporção da intensidade de fluorescência para os macrófagos M1 e M2 foi avaliada mediante a marcação com CD16/CD32 e CD206, respectivamente. Os animais com tumor, infectados ou não, demonstraram uma maior proporção da marcação CD16/CD32+ basal e sob estímulo antigênico em comparação ao CONTROLE. No grupo INFECTADO-CE, para cultivo basal, houve uma sutil diminuição da proporção da marcação CD16/CD32+, em comparação ao grupo CONTROLE-CE (Figura 4A). Quanto à marcação CD206+, houve maior proporção no grupo CONTROLE-CE em comparação ao grupo CONTROLE, enquanto houve

uma notável diminuição das células CD206+ nos grupos INFECTADO-CE em comparação ao CONTROLE-CE, para as condições de cultivo utilizadas (Figura 4B).

Camundongos infectados com *S. mansoni* produziram menos IFN- γ , IL-5, TGF- β , IL-10 e NO em resposta ao CSA.

Os sobrenadantes das células esplênicas dos grupos de estudos, quando cultivadas na presença de antígeno ou apenas meio, foram coletados para mensurar o conteúdo de citocinas. Nossos resultados demonstraram que no grupo CONTROLE-CE houve detecção de TGF- β e IL-10 no cultivo apenas com meio ou antígeno, sendo significativamente maior em comparação ao CONTROLE (Figura 5A e 5B). Em comparação ao CONTROLE-CE, no grupo submetido à infecção houve menor produção de TGF- β e não foi detectada IL-10, para basal e estímulo com antígeno. Não houve detecção de IL-5 e IL-4 em nenhuma condição de cultivo.

Sob as condições de cultivo utilizadas houve produção de IFN- γ e NO, em todos os grupos. Contudo, sob estímulo antigênico houve menor produção de IFN- γ no grupo INFECTADO-CE, em comparação ao grupo CONTROLE-CE (Figura 5C). Em relação ao NO, o grupo CONTROLE-CE apresentou maior produção, enquanto o grupo INFECTADO-CE menor produção, em comparação ao CONTROLE (Figura 5D).

Camundongos esquistossomóticos e com tumor produzem maiores níveis de IgG total e IgG1 antígeno específico.

Os níveis de IgG total foi significativamente maior nos camundongos INFECTADO-CE em comparação ao CONTROLE-CE (Figura 6A). No que diz respeito, a produção de anticorpo específico para antígenos do Carcinoma de Ehrlich, o grupo INFECTADO-CE apresentou maiores níveis de IgG1 anti-CSA, porém menores níveis de IgG2a em comparação ao CONTROLE-CE (Figura 6B e 6C).

DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que a infecção ou imunização com antígenos do parasita pode culminar na proteção antitumoral. No presente estudo, a infecção com *S. mansoni* levou ao aumento do percentual de linfócitos CD8+ e menor status de ativação dos linfócitos CD4+ e CD8+ com menos moléculas CD28 e CD40L, porém também com

menor expressão da molécula inibitória CTLA-4. Houve menor produção de citocinas (IL-10, TGF- β e IFN- γ) e níveis de NO em resposta aos antígenos tumorais. Notavelmente, a infecção com *S. mansoni* restaurou o status de ativação de linfócitos B e a produção de anticorpos totais e desviou para IgG1 antitumoral, com uma diminuição no número de macrófagos M2. Juntos, esses achados sugerem a participação de linfócitos CD8+, linfócitos B e macrófagos M1 no retardo do desenvolvimento do tumor durante a infecção por *S. mansoni*.

Como já esperado, animais portadores de tumores, mas sem infecção, apresentaram menor número de linfócitos CD4+ e CD8+, enquanto em camundongos infectados com tumores, apenas os níveis de linfócitos CD8+ foram restaurados. Foi demonstrado que indivíduos infectados com *S. mansoni* apresentaram uma ligeira queda no número de linfócitos CD4+, sem alterar a frequência de CD8+ (OLIVEIRA-PRADO et al., 2009). Li e colaboradores (2014) relataram, em um modelo vacinal de células tumorais, a inibição da imunidade antitumoral *in vivo* quando os linfócitos CD8+ foram depletados, mas a depleção de CD4+ contribuiu parcialmente para a resposta antitumoral. No que diz respeito ao status de ativação, a literatura vem demonstrando a ação dos linfócitos TCD8+ anti-tumor apesar de uma parcial sinalização via membrana. Deola e colaboradores (2008) relataram proliferação sustentada e capacidade citolítica de linfócitos CD8+, independentemente da ativação via CD28. Ito e colaboradores (2000) mostraram que a vacina de peptídeo lipossomal, seguida de estimulação via CD40-CD40L, e o tratamento com anticorpo anti-CTLA-4 levam à ativação de linfócitos CD8+ e alta curva de sobrevivência. Sendo assim, é possível que não seja fundamental a colaboração dos linfócitos CD4+, na indução e manutenção de uma resposta efetora anti-tumoral via linfócitos TCD8+, assim como visto em modelos em humanos que a alta frequência de CD4+ cursa com um pior prognóstico.

Aqui, observamos níveis de expressão mais baixos de CD28 e CD40L, mas redução muito mais acentuada no CTLA-4+ nos grupos INFECTADO-CE, que corrobora uma ativação parcial devido à queda maior da sinalização inibitória do CTLA-4 (CD80/CD86).

Yoshida e colaboradores (2002) demonstraram, usando uma baixa carga de infecção, que não houve nenhuma diferença no resultado da eliminação do tumor em comparação com camundongos não infectados e linfócitos TCD8+ com uma menor capacidade citolítica *in vitro*. No entanto, foi suficiente para matar células tumorais altamente antigênicas em animais infectados com *S. mansoni*. Eles também observaram

que a depleção das células TCD8⁺ comprometeu a erradicação das células neoplásicas *in vivo*. Embora não tenhamos avaliado a atividade citolítica, é possível que animais infectados com *S. mansoni* (alta carga parasitária) melhoraram a ativação e proliferação de linfócitos T CD8⁺ para produzir uma resposta citolítica antitumoral eficaz.

As células B efectoras atuam na terapia antitumoral, melhorando a atividade dos linfócitos CD8⁺. Ao induzir a proliferação de linfócitos infiltrantes tumorais, utilizando anti-CD3, IL-2 e células B ativadas, houve maior frequência de linfócitos CD8⁺ e capacidade citolítica, via moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, bem como FcRγII (TAMADA et al., 1995). A depleção de células B resultou em maior crescimento tumoral, maiores focos metastáticos e menor número de células efectoras de memória CD4⁺ e CD8⁺ do baço (DILILLO et al., 2010). A relação entre a presença de linfócitos B no tecido tumoral e a melhora do prognóstico tem sido demonstrada (NELSON, 2010). A ativação de linfócitos B favoreceu a proliferação de linfócitos CD8⁺ por meio da apresentação de antígenos por via direta ou apresentação cruzada com APCs residentes no ambiente tumoral (SHEN et al., 2016).

De acordo com Kamel e colaboradores (2014), que mostraram maior frequência de células CD19⁺ em indivíduos infectados com *Schistosoma*, observamos maior frequência de linfócitos CD19⁺/CD80⁺ e, em maior número, de linfócitos CD19⁺/CD86⁺. Além disso, houve redução dos linfócitos Breg (CD19⁺CD1d⁺) nos animais infectados. Dessa forma, a redução do número de linfócitos TCD4⁺/CTLA-4⁺ associada ao aumento do número de linfócitos B CD80⁺ e CD86⁺ pode favorecer a ligação de CD28/CD80: CD86 e, assim, sustentar alta produção de IgG total (OLIVEIRA et al., 2009) em camundongos infectados com tumores.

A imunoterapia antitumoral tem sido fortemente baseada em anticorpos e seus mecanismos de bloqueio de fatores de crescimento, ativação do complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP) (KARAGIANNIS et al., 2013; TSENG et al., 2013). Avaliamos os isótipos IgG1 e IgG2a que são marcadores das respostas Th2 e Th1, respectivamente, em modelo murino, pois na esquistossomose há um viés em direção às respostas Th2/IL-10 em detrimento das respostas Th1. Níveis mais elevados de IgG2a específica para tumor foram observados em animais portadores de tumores na presença de IFN-γ. Em contraste, nos animais infectados, houve uma mudança para a produção de IgG1 e baixos níveis de IFN-γ. Furlan e colaboradores (2014) demonstraram que células dendríticas, estimuladas com células tumorais que expressam a porção Fc de

IgG1, quando co-cultivadas com células CD8+, levaram a um aumento na proliferação, alta produção de granzima B, níveis de TNF- α e IFN- γ intracelular, aumento da atividade citolítica, mas sem alterar a proliferação das células CD4+.

O microambiente tumoral é rico em macrófagos ativados alternativamente (M2) que têm sido associados à angiogênese e ao crescimento tumoral (CARAS et al., 2011). No presente estudo, camundongos apenas com tumores apresentaram maior frequência de macrófagos CD206+, com alta produção basal e antigênica de IL-10, coincidindo com pior prognóstico. Embora os granulomas hepáticos na esquistossomose sejam ricos em macrófagos M2 (DEWALS et al., 2010), em nosso estudo no nível sistêmico (baço), os níveis de M2 foram drasticamente reduzidos, levando a uma maior proporção de M1 juntamente com menor síntese de IL-10. Embora a função dos macrófagos M2 seja controversa em diferentes infecções (KALISH et al., 2015, 2017; LÉON-CABRERA et al., 2014), a maioria corrobora nossos resultados.

No modelo de infecção associado ao carcinoma de Ehrlich, altos níveis de IL-10 e baixos níveis de IFN- γ e TNF- α foram demonstrados com a indução de um fenótipo M2 (CAMARGO et al., 2009). Kalish e colaboradores (2015) demonstraram que as células do carcinoma de Ehrlich foram polarizadas para o fenótipo M2. Além disso, os macrófagos M1 estavam comprometidos com o recrutamento de linfócitos CD8+, NK, pela produção de quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9, CXCL10 e CXCL15) (KOHLE et al., 2019). No contexto da regulação da razão M1/M2, foi recentemente demonstrado que células mieloides supressoras (MDSC) podem causar anergia de linfócitos CD8+ antitumorais e promover a polarização de macrófagos M2 de uma maneira dependente de NO e TGF- β (KUMAR et al., 2016). Aqui, observamos uma melhora na população citotóxica e uma maior presença de M1 e baixa produção de TGF- β e NO; no entanto, a possível participação de células mieloides supressoras precisa ser investigada.

Estamos cientes que há evidências conflitantes em humanos e animais experimentais durante a esquistossomose e a carcinogênese. No entanto, os estudos concordam com relação ao potencial carcinogênico dos antígenos do *Schistosoma haematobium* (HONEYCUTT et al., 2015; TUFFOR et al., 2018). Com relação ao *S. mansoni*, tem sido demonstrada a indução de oncogenes e ativação das vias de sinalização de p53, c-Jun e STAT3, contribuindo para acelerar as alterações displásicas; no entanto, em conjunto com infecções virais, como os vírus da hepatite B e C (EL-TONSY et al., 2013; RODERFELD et al., 2019; VAN-TONG et al., 2015). Além disso,

foi demonstrado que as células tumorais e *S. mansoni* compartilham epítomos glicosilados (DARANI; YOUSEFI, 2012; THORS et al. 2006; ZHANG et al., 1998). Sendo assim, hipótese é que o último poderia desencadear uma melhor imunidade antitumoral e quebrar a tolerância imunológica de certos tumores.

Neste estudo, observamos que o contato com antígenos de *S. mansoni* levou à limitação do crescimento tumoral seguido de melhor prognóstico. Os resultados apontam para o desempenho dos linfócitos CD8+, melhora da imunidade humoral, participação de anticorpos e direcionamento para polarização de macrófagos M1. É verdade que a heterogeneidade das células cancerosas no que diz respeito à indução de imunossupressão (mecanismo de escape) ou imunogenicidade (indução de processos inflamatórios) pode exigir diferentes mecanismos de eliminação. Nossos dados sugerem melhora das respostas imunes antitumorais e destacam a necessidade de mais estudos da esquistossomose com relação às células não CD4+ e o uso de produtos parasitários como ferramentas imunomoduladoras de suporte à imunoterapia antitumoral.

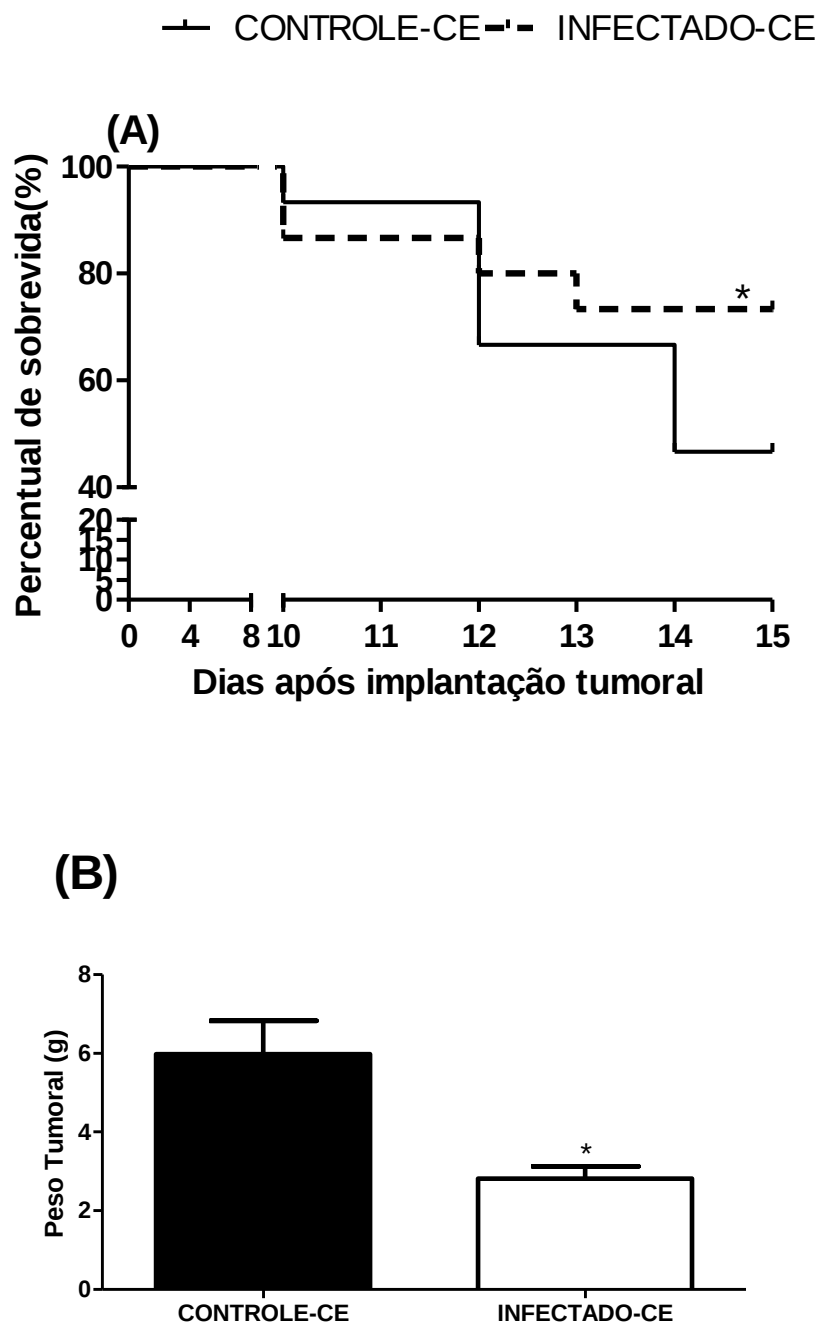


Figura 1 - Curva de sobrevida e peso tumoral. Camundongos *Swiss Webster* implantados com carcinoma de Ehrlich (CONTROLE-CE) e infectado com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE) e foram acompanhados ao longo de 15 dias para mensurar a curva de sobrevivência (A). No 15º dia após a implantação, os tumores foram removidos e pesados (B). Os resultados representam a mediana do ganho de peso $\pm$ erro padrão. * $p < 0,005$ quando comparado com o grupo CONTROLE-CE.

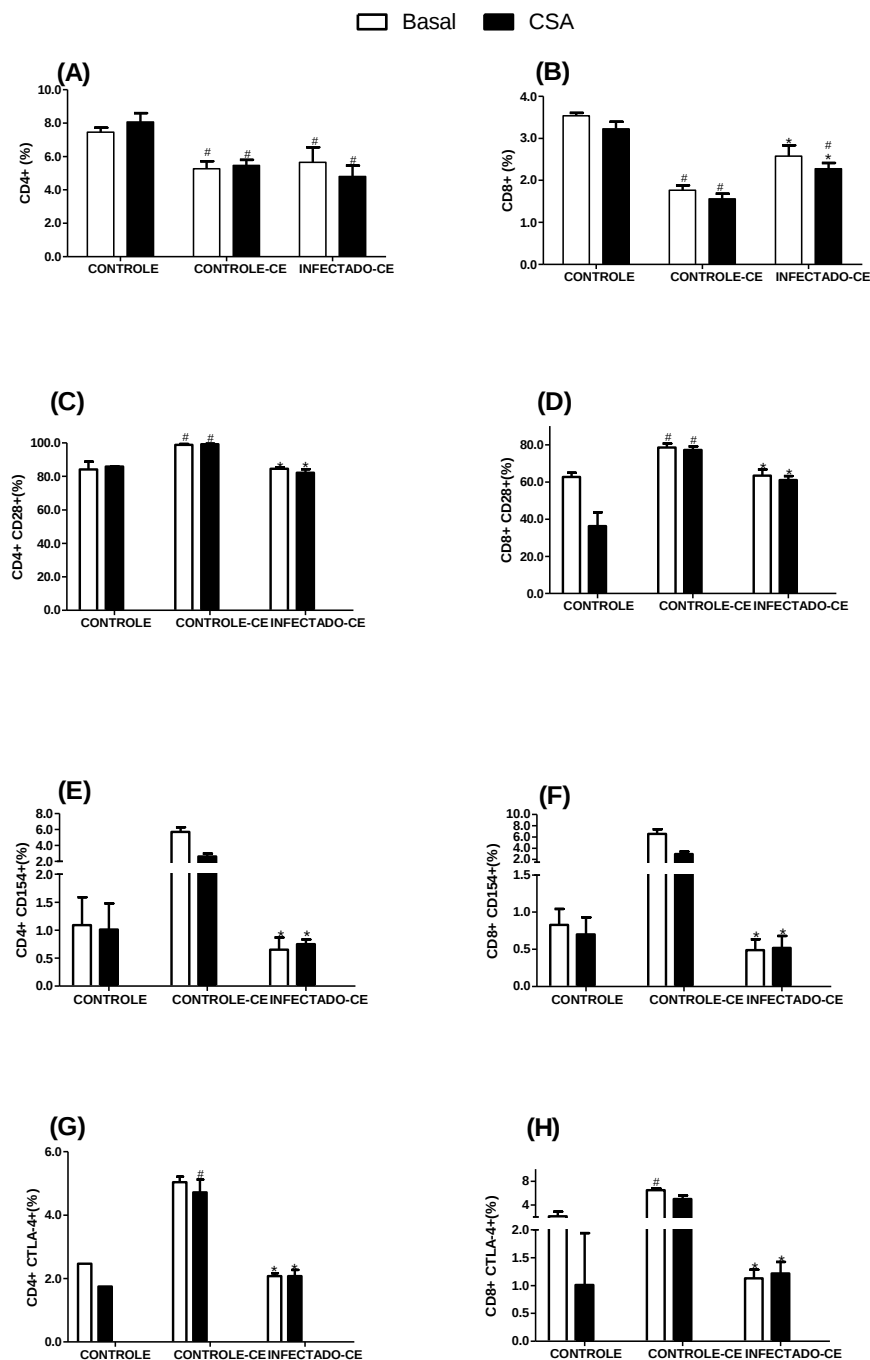


Figura 2 - Status de ativação de células T. Camundongos não infectados e livre de tumores (CONTROLE) e animais submetidos a implantação tumoral (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE) foram acompanhados ao longo de 15 dias para contagem de células CD4+ (esquerda A) e CD8+ (direita B) em esplenócitos quando cultivados (24h) apenas com meio (basal), e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 µg/mL). A frequência da dupla marcação CD4+ ou CD8+ e CD28+ (C; D), CD40L+ (E; F), CTLA-4+ (G; H) foram analisadas em CONTROLE-CE e INFECTADO-CE depois da marcação com FITC anti-CD4 ou APC anti-CD8a e PE anti-CD28 ou PE anti-CD40L ou anti-CTLA-4 PE. Os resultados representam a mediana da frequência da dupla-marcação das células esplênicas $\pm$ erro padrão para sete animais/grupo. # $p < 0.005$ quando comparado com o grupo CONTROLE. * $p < 0.005$ quando comparado com o grupo CONTROLE-CE.

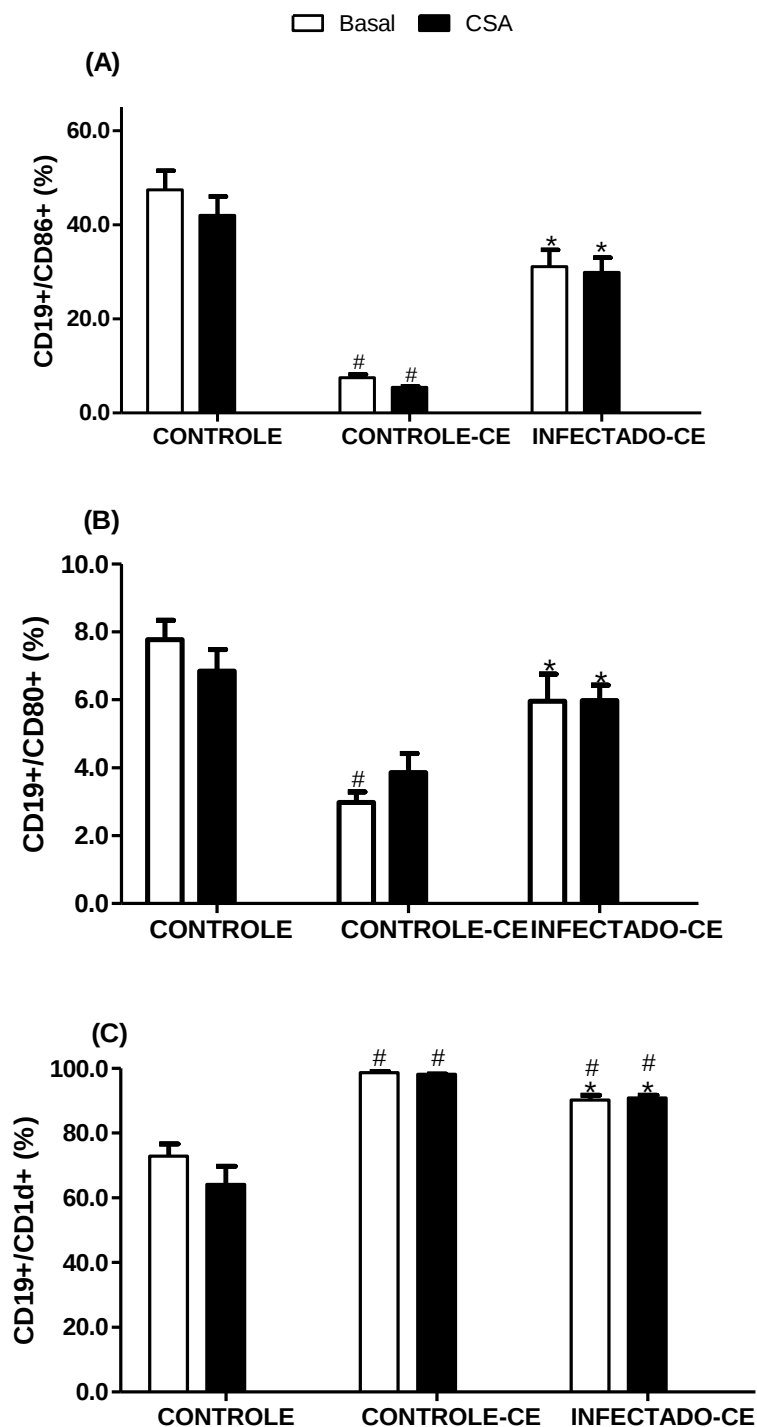


Figura 3 - Status de ativação de células B. Frequência de células CD19+ expressando CD86+ (A), CD80+ (B), CD1d+ (C) em esplenócitos de camundongos livres de tumor e não infectados (CONTROLE), camundongos portadores de tumor (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE) cultivados (24h) apenas meio (basal) antígeno solúvel de carcinoma (CSA)(200 µg/mL, barra preta). As células foram marcadas com APC anti-CD19 e PE anti-CD80 ou PE anti-CD86 ou PE anti-CD1d. Os resultados representam a mediana da frequência da dupla-marcação das células esplênicas $\pm$ erro padrão para sete animais/grupo. Os resultados mostram um experimento representativo de 3 experimentos independentes. *p < 0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.

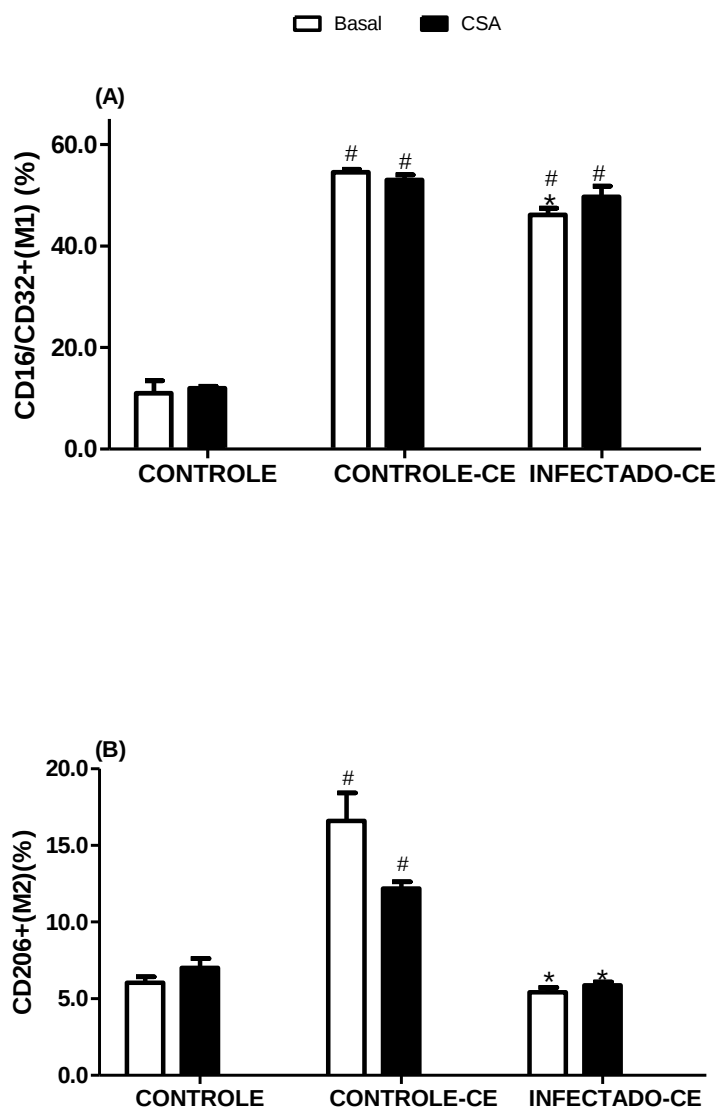


Figura 4 - Média da intensidade de fluorescência (MFI) de CD16/CD32+ células (A) e CD206+ (B) em esplenócitos de camundongos livres de tumor e não infectados (CONTROLE), camundongos portadores de tumor (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE) cultivados (24h) apenas meio (basal) antígeno solúvel de carcinoma (CSA)(200 µg/mL, barra preta), marcados com FITC anti-CD16/CD32 e APC anti-CD206. Os resultados representam a média da frequência da dupla-marcação das células esplênicas $\pm$ erro padrão para sete animais/grupo. Os resultados mostram um experimento representativo de 3 experimentos independentes. *p <0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.

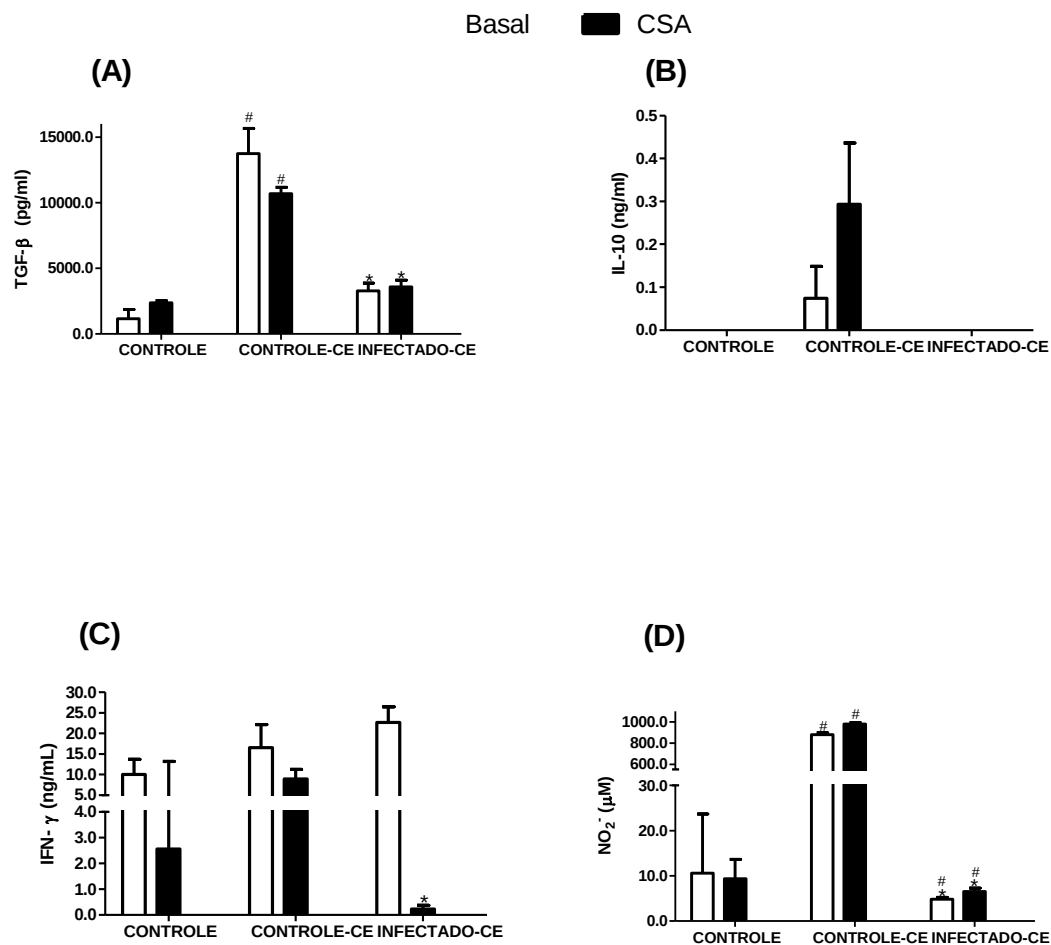


Figura 5 - Fator de crescimento TGF- β (A) interleucina (IL)-10; (B) óxido nítrico NO; (C) interferon (IFN)- γ ; (D) secretado por células esplênicas de camundongos livres de tumor e não infectados (CONTROLE), camundongos portadores de tumor (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE). 12×10^6 (72 h) células foram cultivadas apenas com meio (Basal) e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados representam a mediana $\pm$ erro padrão. *p < 0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.

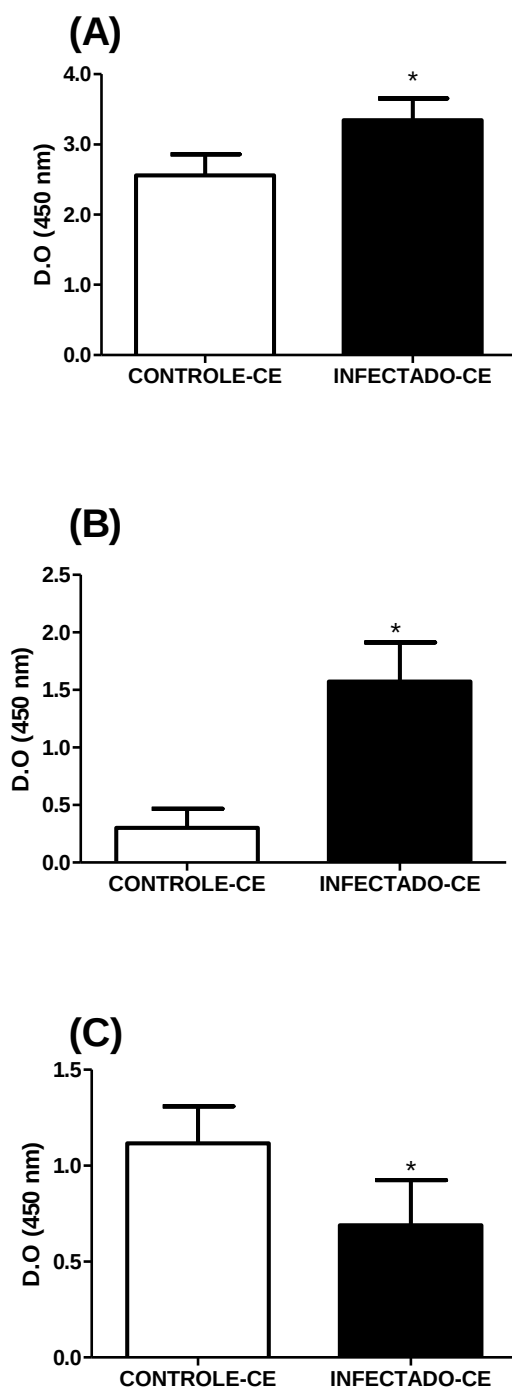


Figura 6 - IgG total (A) IgG1 anti-CSA; (B) IgG2a anti-CSA; (C) anticorpos produzidos por camundongos portadores do carcinoma de Ehrlich (CONTROLE-CE) e infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* (INFECTADO-CE). Os níveis dos isótipos foram dosados por ELISA indireto nas diluições 1:50 (IgG total) e 1:2 (IgG1 e IgG2a) 15 dias pós implantação tumoral. Os resultados expressam a mediana da absorbância (D.O) $\pm$ desvio padrão de 7 a 10 animais/grupo. *p,0.05 quando comparado ao CONTROLE-CE.

REFERÊNCIAS

- BOS, R; SHERMAN, L. A. CD4+T cell in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. **Cancer Res.** v. 70, n.1, p. 8368-8377, 2010.
- CARAS, I. et al. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: In vitro models of macrophage-tumor environment interaction. **Tumori**, v. 97, n. 5, p. 647–654, 2011.
- CAMARGO, M. R. et al. Modulation of macrophage cytokine profiles during solid tumor progression: susceptibility to *Candida albicans* infection. **BMC Infectious Diseases**. v. 9, p. 1-8, 2009.
- CHEN, Z. et al. Role of regulatory B cells in the progression of cervical cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.
- DARANI, H. Y.; YOUSEFI, M. Parasites and cancers: Parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. **Future Oncology**, v. 8, n. 12, p. 1529–1535, 2012.
- DEOLA, S. et al. Helper B Cells Promote Cytotoxic T Cell Survival and Proliferation Independently of Antigen Presentation through CD27/CD70 Interactions. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1362–1372, 2008.
- DEWALS, B. et al. Control of *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation by IL-4-responsive CD4(+)CD25(-)CD103(+)Foxp3(-) cells is IL-10-dependent. **European journal of immunology**, v. 40, n. 10, p. 2837–47, out. 2010.
- EISSA, M. M. et al. Immuno-therapeutic potential of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* antigens in a murine model of colon cancer. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 1, p. 47–56, 2019.
- FORTE, G. et al. Inhibition of CD73 Improves B Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity in a Mouse Model of Melanoma. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2226–2233, 2012.
- FURLAN, S. N. et al. Enhancement of anti-tumor CD8 immunity by IgG1-mediated targeting of Fc receptors. **mAbs**, v. 6, n. 1, p. 108–118, 2014.
- ITO, D. et al. Induction of CTL Responses by Simultaneous Administration of Liposomal Peptide Vaccine with Anti-CD40 and Anti-CTLA-4 mAb. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1230–1235, 2000.
- KALISH, S. et al. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. **Medical science monitor basic research**, v. 23, p. 8–19, 2017.
- KALISH, S. V. et al. Macrophages Reprogrammed In Vitro Towards the M1 Phenotype and Activated with LPS Extend Lifespan of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. **Medical science monitor basic research**, v. 21, p. 226–234, 2015.

KAMEL, M. M.; FOUAD, S. A.; BASYONI, M. M. A. P Selectins and immunological profiles in HCV and Schistosoma mansoni induced chronic liver disease. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

KARAGIANNIS, P. et al. IgG4 subclass antibodies impair antitumor immunity in melanoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 4, p. 1457–1474, 2013.

KOHLER, J. B. et al. Microenvironmental stimuli induce different macrophage polarizations in experimental models of emphysema. **Biology Open**, v. 8, n. 4, 2019.

LEÓN- CABRERA, S. et al. Extraintestinal Helminth Infection Reduces the Development of Colitis-Associated Tumorigenesis. **International Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 9, p.948-956, 2014.

LI, Q. et al. In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy, **J. Immunol.** v.1, p.195-3203. 2009.

LI, Q. et al. Adoptive Transfer of Tumor Reactive B Cells Confers Host T- Cell Immunity and Tumor Regression. **Clin Cancer Res.** v.17, n.15, p. 4987–95, 2011.

LI, Y. et al. Irradiated tumor cells of lipopolysaccharide stimulation elicit an enhanced anti-tumor immunity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 11, p. 1815–1823, 2014.

LUNDY, S. K.; LUKACS, N. W. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. **Frontiers in immunology**, v. 4, n. February, p. 39, jan. 2013.

MA, D. Y.; CLARK, E. A. The role of CD40 and CD40L/CD40L in dendritic cells. **Seminars in Immunology**, v. 21, n. 5, p. 265–272, 2009.

MADDALY, R. et al. Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation - Insights from both in vivo and in vitro approaches. **FEBS Letters**, v. 584, n. 24, p. 4883–4894, 2010.

NELSON, B. H. CD20 + B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes . **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 4977–4982, 2010.

OLIVEIRA-PRADO, R. et al. CD4 + and CD8 + distribution profile in individuals infected by schistosoma mansoni. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 6, p. 521–528, 2009.

OLIVEIRA, R. R. et al. Schistosoma mansoni infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 223–229, 2009.

PEREIRA, F. E.; RASO, P.; COELHO, P. M. Evolution of sarcoma 180 (ascitic tumor) in mice infected with Schistosoma mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de**

Medicina Tropical, v. 19, n. 1, p. 39–42, 1986.

RODERFELD, M. et al. Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. **Hepatology**, v. 72, n. 2, p. 626–641, 2020.

SCHIAVONI, G.; GABRIELE, L.; MATTEI, F. The tumor microenvironment: A pitch for multiple players. **Frontiers in Oncology**, v. 3 APR, n. April, p. 1–15, 2013.

SHEN, M. et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55828–55839, 2016.

SILVA, G. C. DA S. et al. Evaluation of ethanolic extract of Morinda citrifolia Linn for antitumor activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 66–72, 2016.

TAMADA, K. et al. Specific antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded first in a culture with both anti-CD3 monoclonal antibody and activated B cells and then in a culture with interleukin-2. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 41, n. 6, p. 339–347, 1995.

THORS, C. et al. Thomsen-Friedenreich oncofetal antigen in Schistosoma mansoni: Localization and immunogenicity in experimental mouse infection. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 73–81, 2006.

TODA, K. S. et al. Hepatocellular carcinoma related to schistosoma mansoni infection: Case series and literature review. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 3, n. 4, p. 260–264, 2015.

TSENG, D. et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 27, p. 11103–11108, 2013.

TUFFOUR, I. et al. Schistosoma egg antigen induces oncogenic alterations in human prostate cells. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2018, 2018.

WANG, Z. Y. et al. Original Article Materials and Methods Tumor cell line and mice Peptide synthesis vaccine. p. 295–305, [s.d.].

YOSHIDA, A. et al. Enhanced UV γ 1 tumor growth in CBF1 mice infected with Schistosoma mansoni due to modulation of Th1-like responses. **Parasitology International**, v. 51, n. 2, p. 177–186, 2002.

ZHANG, S. et al. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 295–302, 1998.

5.2 ARTIGO 2: AMAMENTAÇÃO EM MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS ALTERA O STATUS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS B, POLARIZA MACRÓFAGOS M1 E RETARDA O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH.

INTRODUÇÃO

Exposição materna a doenças infecciosas modula a imunidade dos descendentes na vida adulta para antígenos heterólogos (DA PAZ; SEQUEIRA; PYRRHO, 2017; STRAUBINGER et al., 2014). Diante disso, os estudos do efeito da amamentação, separadamente da gestação, em mães infectadas em diferentes modelos de imunização/infecção busca melhores esclarecimentos do potencial de componentes parasitários na modulação da resposta imune na tenra idade. Foi demonstrado que a amamentação em mães esquistossomóticas potencializou a produção de anticorpos, induziu uma maior produção de IL-2, IL-5, TGF- β e IL-6 [3, dados não publicados], melhorou a capacidade de apresentação antigênica dos linfócitos B em resposta à imunização com ovalbumina em adjuvante e diminuiu a reação granulomatosa ao redor dos ovos do *S. mansoni*, com menor produção de colágeno (SANTOS et al., 2014, 2016). Com relação à gestação em mães esquistossomóticas, houve diminuição na produção de anticorpos, IL-10-dependente, menor capacidade de apresentação antigênica das células dendríticas (DCs) e maior frequência de linfócitos B produtores de IL-10 em resposta à OA (FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al., 2010, 2014) e levou à intensa reação inflamatória granulomatosa hepática e produção de colágeno nos descendentes adultos infectados. Quando os camundongos foram nascidos e amamentados em mães infectadas ocorreu uma reversão da supressão de anticorpos, acompanhada do aumento da produção de IL-2 e diminuição de IL-10, menor granuloma, ou seja, o contato com componentes imunomodulatórios do leite reverte a supressão observada via útero (SANTOS et al., 2016, 2010, 2014).

Produtos parasitários vêm sendo estudados em modelos de câncer devido aos efeitos imunomodulatórios na erradicação de células cancerígenas, sendo uma alternativa em potencial na imunoterapia (EISSA et al., 2019; PEREIRA; RASO; COELHO, 1986; YOSHIDA et al., 2002). Foi demonstrado que a infecção ou imunização com *S. mansoni* em camundongos portadores de tumores levou a menores lesões neoplásicas e tumores, uma maior porcentagem de células TCD4⁺ esplênicas, além de ressaltar a eficácia das células TCD8⁺ na erradicação das células neoplásicas.

Sendo assim é possível que o leite materno de mães esquistossomóticas culmine em uma melhora da resposta imune frente às células tumorais dos seus descendentes, enquanto apenas a gestação levaria a uma piora. Corroborando esta hipótese, Holanda e colaboradores (2019) demonstraram que o contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas pode promover modificações epigenéticas, ao elevar a expressão de HDACs que estão associadas com a redução de citocinas inflamatórias, regulação da função das células Treg, e da produção de espécies reativas de oxigênio cursando com uma resposta anti-inflamatória. No contexto apenas da gestação em mães esquistossomóticas, é demonstrado modificações epigenéticas, relacionadas a alta expressão da HDAC9 que favorece a alta produção de IL-10, que pode levar há um microambiente imunossupressor que favorece o desenvolvimento descontrolado das lesões neoplásicas. Diante do exposto, nos propomos avaliar o efeito da amamentação e gestação em mães esquistossomóticas na ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ anti-tumor a longo prazo, bem como a contribuição dos linfócitos B e macrófagos

De fato, além da conhecida colaboração dos linfócitos TCD4⁺ em auxiliar a citotoxicidade via CD8⁺ na imunidade anti-tumoral, têm sido estudado a influência dos macrófagos neste microambiente. Devido a sua plasticidade em assumir fenótipos diferentes dependendo dos estímulos ambientais podem ser classificados em: macrófagos classicamente ativados chamado de M1 (CD16/CD32⁺/iNOS⁺, IL-12, IL-23, CXCL9, CXCL10) e macrófagos alternativamente ativados chamado de M2 (CD206⁺/CD163⁺ IL-10, Fizz, Arg, CCL17, CCL22). Os M1, além da conhecida capacidade microbicida apresenta também alto potencial tumoricida, podendo apresentar antígenos tumorais as células T e contribuir com a resposta efetora contra o tumor. Enquanto os M2 tem função imunonregulatória, devido à alta produção de IL-10, leva a um ambiente imunossupressor que permite o crescimento tumoral, além de auxiliar no processo de angiogênese (BISWAS; MANTOVANI, 2010). Com relação aos linfócitos B, estas células podem contribuir com a imunidade tumoral, pela secreção de anticorpos, como células apresentadoras de antígenos (APCs) induzindo um perfil Th1 e citotoxicidade direta por alguns mecanismos como: via FAS-FASL, TRAIL/Apo-2L, produção de granzimas B induzida por IL-21 (LARGEOT et al., 2019) que por meio destes mecanismos proporciona uma melhor atividade/ação dos linfócitos TCD8⁺ (FORTE et al., 2012; LI et al., 2009; 2011).

Com base nos dados acima descritos, neste estudo foi avaliado a curva de sobrevida, o peso do tumor, o status de ativação dos linfócitos T e B e frequência de

macrófagos M1 e M2, citocinas e óxido nítrico em camundongos descendentes de mães esquistossomóticas e portadores do Carcinoma de Ehrlich, modelo de adenocarcinoma mamário espontâneo murino, bem utilizado em estudos do processo de carcinogênese e desenvolvimento de agentes antitumorais (MISHRA et al., 2018; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003). Os resultados apontam que amamentação alterou ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como levou a um caminho de ativação dos macrófagos diferente da gestação. Além disso, o leite materno incrementou o status de ativação dos linfócitos B que pareceu ser requerido para melhor sobrevivência dos descendentes portadores do tumor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Infecção materna, amamentação adotiva e formação dos grupos de estudo

Camundongos *Swiss webster* com quatro semanas de vida foram infectados via percutânea com 20 cercárias de *S. mansoni* da cepa Belo Horizonte (BH). Após 50 dias de infecção foi confirmado usando o método Kato-Katz. No 60º dia pós-infecção (dpi) as fêmeas foram acasaladas com camundongos machos em uma proporção de 1:2. O mesmo procedimento foi realizado em fêmeas não infectadas. Imediatamente após o nascimento, uma parte de camundongos recém-nascidos de mães infectadas ou não infectadas de *S. mansoni* foi adotado por mães do grupo oposto. Os seguintes grupos foram formados (n= 15): descendentes fêmeas nascidas de mães infectadas (MI) foram amamentadas por mães não infectadas, e descendentes de mães não infectadas foram amamentados por mães infectadas (AI). Uma parte dos camundongos nasceu e permaneceu amamentada por mães infectadas (MIAI). Animais nascidos de fêmeas não infectadas foram amamentados por suas mães formando o grupo CONTROLE-CE. Camundongos com seis semanas de vida foram submetidos à implantação do tumor Carcinoma de Ehrlich: injeção subcutânea na região sub-axilar em 25×10^6 células/mL, as células tumorais foram removidas de animais doadores por aspiração do líquido ascítico e introduzidas nos animais receptores (SILVA et al., 2016).

Os camundongos foram mantidos no biotério de experimentação animal do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), município de Recife, Pernambuco. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Comissão FIOCRUZ-PE (CEUA-113/2017).

Antígeno solúvel de Carcinoma (CSA)

O CSA foi preparado como descrito por Wang e colaboradores (2012) . Resumidamente, as células do Carcinoma de Ehrlich foram recuperadas da cavidade peritoneal de camundongos foram lavadas e ressuspensas em salina (1×10^8 céls/mL) e foram lisadas em ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e aquecimento (37°C).

Peso corpóreo, tumoral e cultura de células esplênicas

Peso corpóreo dos animais foram determinados nos dias 0, 8 e 15 pós implantação. Quinze dias após a implantação dos tumores, os animais foram eutanasiados (deslocamento cervical) e a necropsia foi realizada com a remoção dos baços e dos tumores. As células esplênicas de cada animal ($n = 7$) foram preparadas em meio RPMI-1640 suplementado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e cultivadas só com meio (Basal), ou com antígeno solúvel de carcinoma (CSA) ($200 \mu\text{g/mL}$) na concentração final de 2×10^7 (24 h) or 12×10^6 (72 h) células/mL em placas de cultura de 48 poços (Corning, Inc., Corning, NY, USA) em 37°C em 5% CO_2 . Após 24 h, as células foram recuperadas e encaminhadas para imunofenotipagem.

Análises de citometria de fluxo

As células de baço foram submetidas a dupla marcação com anticorpos marcados com fluorocromos em 1×10^7 células/mL: anti-CD4 (FITC) ou anti-CD8a (APC) mais anti- CD28, CD40L ou CTLA-4 (PE). Os linfócitos B foram marcados com anti- CD19 (APC) mais anti-CD80, CD86 ou CD1d (PE). Os macrófagos foram marcados com anti- CD16/CD32 (FITC) e anti-NOS-2 (APC) (M1) e anti-CD206 (APC) e anti-IL-10 (PE) (M2) (eBioscience, San Diego, CA). Após a marcação, as suspensões foram lavados com PBS contendo soro bovino fetal (5%). Após a centrifugação, o pellet de células foram ressuspensas com PBS contendo soro bovino fetal (5%) e mantido em 4°C até a aquisição de dados, que foi realizado utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD-Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) com aquisição de um mínimo de 50.000 linfócitos ou 5.000 monócitos. A frequência das células positivas foi analisada utilizando-se o software FlowJo (v.10, Camarillo, CA) um conjunto de gating baseado em populações negativas e controles isotípicos. Realizou-se uma análise descritiva da frequência das células no quadrante superior direito (células

duplas positivas). Foram utilizadas estratégias distintas de gating para analisar cada subpopulação de células. Subpopulações de linfócitos T foram selecionadas primeiramente como células CD4⁺ usando células FL1/anti-CD4-FITC ou células CD8⁺ FL4/anti-CD8-APC com gráficos de pontos complexidade (SSC). Após este procedimento de gating, um segundo gate foi definido usando gráficos FL1/anti-CD4-FITC ou FL4/anti-CD8-APC versus FL2/anti-CD28-PE ou anti-CD40L-PE ou anti-CTLA-4-PE e quadrantes de mensurações estatísticas. As células B foram selecionadas primeiramente num gate como células CD19⁺ altas FL4/anti-CD19-APC versus SSC. Um segundo gate foi definido usando gráficos FL4/anti-CD19-APC versus FL2/anti-CD80-PE ou anti-CD86-PE ou anti-CD1d-PE e quadrantes de mensurações estatísticas. Os monócitos foram selecionados primeiramente em células de CD16/CD32^{high} usando gráficos FL1/anti-CD16/32 ou FL4/anti-CD206-APC versus gráficos de pontos SSC, um segundo gate foi definido usando FL1/anti-CD16/CD32 ou FL4/anti-CD206-APC versus FL4/anti-NOS-2-APC e FL2/anti-IL-10-PE, respectivamente. Os resultados foram expressos como a mediana da frequência de células duplo positivas de cada grupo $\pm$ erro padrão.

Dosagem de citocinas e óxido nítrico

Os sobrenadantes da cultura foram coletados e os níveis de citocinas foram mensurados usando ELISA sanduiche, com os seguintes anticorpos monoclonais de captura para IFN- γ , AN18, e biotilado XCM1.2; para IL-10, C252-2A5 e biotilado SXC-1; para IL-5, 39D10 e biotilado 5A10; e para IL-4, 11B11 e biotilado BVD6-24G2. As reações foram reveladas usando um conjugado de estreptoavidina peroxidase (Sigma-Aldrich) e ABTS (2-2-azinobis (3 ethylbenzene-thiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich) mais H₂O₂. A mensuração de TGF- β foi realizada usando o kit Human TGF- β CytoSet™ (Invitrogen, Camarilo, CA) seguindo as especificações do fabricante para ativação do TGF- β com o tratamento com HCl e NaOH. As curvas padrão foram usadas para quantificar as amostras com limites de detecção de 0.625 ng/ml para IL-10, 2.5 ng/ml para IFN- γ , 62.5 pg/mL para TGF- β , 0.312 ng/ml para IL-5, e 0.3125 ng/ml ou IL-4. Os níveis de NO foram mensurados em cultura de sobrenadante usando o método de Griess. Os resultados obtidos forma expressos com a mediana da concentração $\pm$ desvio padrão.

Análise estatística

Os resultados foram analisados usando o teste de Bartlett para determinar se a distribuição dos dados segue a normalidade. Para a curva de sobrevida, foi realizado o teste log-rank. Para o peso tumoral e corpóreo, citometria de fluxo, e síntese de citocinas foi realizado o teste Kruskal–Wallis seguido do teste Mann–Whitney U-para múltiplas comparações no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram significantes com $p < 0.05$. Os experimentos foram realizados em triplicata para avaliar a reprodutibilidade dos dados. Nós demonstramos um experimento representativo de 3 experimentos independentes.

RESULTADOS

Camundongos apenas amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram um menor peso corpóreo e melhor curva de sobrevida.

Ao analisar o peso corpóreo pós-implantação tumoral no 8º dia, em relação ao peso inicial, do grupo AI demonstraram um menor ganho de peso significativo em comparação aos camundongos do grupo CONTROLE-CE. No 15º dia, apesar de não apresentar diferença estatística, houve menor peso corpóreo do grupo AI em relação ao grupo CONTROLE-CE. Os animais do grupo AI apresentaram uma curva de sobrevida estatisticamente maior em relação ao grupo CONTROLE-CE. porém não houve diferença entre os grupos MIAI e MI. No 15º dia, após a eutanásia os tumores foram removidos e pesados. Não houve diferença estatística entre os grupos CONTROLE-CE e experimentais, embora possa ser observada sutil diminuição no grupo AI (Tabela 1).

A amamentação em mães esquistossomóticas aumenta a frequência de linfócitos TCD8+ e CD4+ e altera expressão de moléculas de membrana.

A figura 1A e 1B mostra que a frequência de linfócitos TCD4+ e CD8+ basal e sob presença do antígeno (CSA) foi estatisticamente maior nos descendentes do grupo AI, em comparação ao CONTROLE-CE, MIAI e MI. Foram analisadas a expressão das moléculas CD28, CD40L e CTLA-4 nos linfócitos TCD4+ e TCD8+. Não houve diferença estatística na frequência das células CD4+/CD28+ (Figura 1C), mas houve maior frequência basal e sob estímulo antigênico das células CD8+/CD28+ apenas no grupo AI em relação CONTROLE-CE. Nos animais do grupo MIAI e MI a frequência

de células CD8+/CD28+ foi menor em relação ao grupo AI (Figura 1D). Apenas a frequência basal de células CD4+/CD40L+ foram diminuídas nos descendentes que tiveram contato com o leite de mães esquistossomóticas (AI e MIAI) em comparação ao CONTROLE-CE (Figura 1E), sem diferença estatística para o grupo MI. Frente à re-estimulação com antígeno tumoral houve uma maior frequência de células CD8+/CD40L+, nos animais do grupo AI e MIAI, em relação ao CONTROLE-CE (Figura 1F).

Em comparação ao CONTROLE-CE, a frequência basal e sob estímulo antigênico dos linfócitos TCD4+ expressando CTLA-4+ foi maior no grupo AI, enquanto que para os animais MI apenas a frequência basal dessas células foi aumentada (Figura 1G). Na figura 1H, observamos uma maior frequência das células CD8+/CTLA-4+ em resposta ao antígeno tumoral nos descendentes que tiveram contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas (AI e MIAI), comparado ao CONTROLE-CE e não houve diferença para os animais do grupo MI.

O contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas altera o status de ativação dos linfócitos B diferentemente se precedido ou não da gestação

Em relação ao CONTROLE-CE, os descendentes que tiveram contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas (AI e MIAI) demonstraram uma maior frequência basal e sob estímulo antigênico das células CD19+/CD80+ (Figura 2A), porém a frequência de células CD19+/CD86+ (Figura 2B) foi estatisticamente menor apenas do grupo MIAI. No grupo AI a frequência antigênica das células CD19+/CD1d+ foi menor em comparação ao CONTROLE-CE (Figura 2C). Não houve diferença nos parâmetros avaliados para o grupo MI.

Contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas melhora a frequência de macrófagos M1, enquanto a gestação aumentou a frequência de macrófagos M2.

Os grupos AI e MIAI tiveram uma alta frequência basal e antigênica de macrófagos classicamente ativados M1 (CD16/CD32+/NOS-2+) quando comparado ao grupo CONTROLE-CE (Figura 3A). Do contrário, a frequência de macrófagos alternativamente ativados M2 (CD206+/IL-10+) (Figura 3B) foi maior apenas nos camundongos do grupo MI quando cultivadas com ou sem antígeno, em relação ao grupo CONTROLE-CE. Ao analisar a razão M1/M2 os descendentes que tiveram

contato com o leite de mães esquistossomóticas apresentaram uma alta frequência basal e sob estímulo antigênico quando comparado ao CONTROLE-CE (Figura 3C).

Amamentação em camundongos esquistossomóticos levou à menor produção de TGF- β , enquanto a gestação levou ao aumento de IL-10 nos descendentes.

Nossos resultados demonstraram que, em comparação ao grupo CONTROLE-CE e sob estímulo antigênico, as células dos camundongos que foram amamentados em mães infectadas, grupos AI e MIAI, produziram menos TGF- β sob estímulo antigênico (Figura 4A). Para o estímulo basal, o grupo MI produziu menos TGF- β . Com relação a produção de IL-10, as células dos camundongos que foram gerados em mães infectadas, grupos MIAI E MI, tiveram uma maior produção desta citocina sob estímulo antigênico (Figura 4B). A produção de IFN- γ (Figura 4C) foi maior apenas no grupo MIAI. Os grupos AI, MIAI e MI apresentaram menor produção de NO em comparação ao grupo CONTROLE-CE (Figura 4D). Não foram detectados IL-4 e IL-5 sob as condições de cultivo e ensaio imunoenzimáticos utilizados.

DISCUSSÃO

É sabido que o leite materno pode induzir efeitos estimulatórios e tolerogênicos (HOSEA BLEWETT et al., 2008). Estudos prévios relataram que a amamentação em mães esquistossomóticas ressaltou este potencial dicotômico do leite materno e afetou a resposta imune pós-natal para antígenos heterólogos (DE HOLANDA et al., 2019, 2020; FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al., 2010, 2014). Aqui, em um modelo de implantação de células de carcinoma de Erlich na idade adulta, apenas o prévio contato com leite materno levou maior sobrevida, acompanhado de aparente diminuição do tumor no início do desenvolvimento. A gestação parece não conter o desenvolvimento tumoral visto que houve maior peso corpóreo e menor sobrevida, mesmo seguida da amamentação. O status de ativação celular e produção de citocinas deste estudo apontam que o contato prévio com leite de mães infectadas imprime uma melhora na resposta imune anti-tumoral, enquanto à gestação leva à um microambiente imunossupressor à longo prazo.

A prévia amamentação em mães esquistossomóticas incrementou o número linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, em resposta aos antígenos tumorais, com um perfil de moléculas de membrana que parece refletir o efeito dicotômico do leite materno. De fato, no compartimento de linfócito T CD4⁺ o caráter supressor foi marcado pela maior

expressão de CTLA-4, porém com manutenção da expressão da molécula CD40L(CD40L). Já nos linfócitos T CD8⁺ houve maior expressão de CTLA-4, junto com aumento das moléculas ligadas ativação celular CD28 e CD40L. É sabido que o aumento de CD28 no linfócito TCD8⁺ pode favorecer a ligação CD80:CD28 em vez do CD80:CTLA-4 nas APCs e favorecer proliferação e ativação celular (FIELDS et al., 1998; WALKER; SANSOM, 2011). Além disso, a forte interação CD40L-CD40 via APCs, bem como, potente estimulação antigênica via receptor de células T promovem escape dos linfócitos T de mecanismos supressores (HÄNIG; LUTZ, 2008; SERRA et al., 2003). Sendo assim, o contato prévio com o leite de mães infectadas que induziu melhor frequência CD8⁺/CD40L⁺/CD28⁺ pode sobrepor o efeito inibitório exercido pela molécula CTLA-4. O requerimento da molécula CD40L foi demonstrada em camundongos portadores de tumor e knockout para CD40L, nos quais houve uma menor indução da resposta TCD8⁺ de memória e alta incidência de tumores pulmonares (XIE et al., 2013).

Neste contexto, a atuação dos linfócitos B como APCs para linfócitos TCD8⁺ é destaque em estudos *in vivo e in vitro*. Linfócitos B ativados com anti-CD40L foram responsáveis por melhor capacidade de apresentação antigênica via MHC classe II, expansão de linfócitos T CD8⁺ antígeno específico, com consequente retardo no desenvolvimento tumoral(LAPOINTE et al., 2003; LI et al., 2009; 2011; RITCHIE et al., 2004). No nosso estudo, os animais do grupo AI exibiram maior frequência de linfócitos B expressando mais CD80. De acordo com Santos(SANTOS et al., 2014), camundongos amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram alta frequência de CD40 e CD80 em linfócitos B em apenas 3 dias após imunização com OA+ adjuvante, em contrapartida aos 8 dias de imunização requerido por camundongos amamentados por mães não infectadas. Esses resultados reforçam uma antecipada melhora da capacidade dos linfócitos B enquanto APCs frente aos antígenos tumorais e pode explicar o menor peso corpóreo dos animais AI no início do desenvolvimento do tumor, sendo reflexo do retardo do crescimento tumoral. Então, o aumento de CD40L e CD28 nos linfócitos TCD8⁺, levam a crer na maior interação CD40:CD40L e CD80:CD28 nos linfócitos B com o linfócito TCD8⁺, do que com o linfócito TCD4⁺, favorecendo uma resposta citotóxica anti-tumor e menor requerimento da resposta CD4⁺ mediada. Reforçando o papel dos linfócitos B em direção à atenuação do crescimento tumoral, houve menor frequência de células com fenótipo regulatório no grupo AI. Os linfócitos Breg estão envolvidos com maior produção de IL-10 e maior

crescimento tumoral em murinos e humanos (CHEN et al., 2019; SHEN et al., 2016). Aqui, apesar de não haver alteração nos níveis de IL-10, houve menor produção de TGF- β conhecida pela sua função pan-supressora.

Notavelmente, a amamentação levou a uma diferenciação de macrófagos em direção ao tipo M1. Kalish e colaboradores (2015) relataram que camundongos injetados com macrófagos pré-ativados e polarizados para um fenótipo M1 cursaram com maior produção de NO e aumento na curva de sobrevivência. Buhtoiarov e colaboradores (2011) num protocolo quimioterápico seguido de administração de anti-CD40 e CpG, observaram uma mudança no fenótipo de macrófagos de M2 para M1, seguido de menor crescimento tumoral. Recentemente, Governi e colaboradores (2019) relataram que linhagens de células tumorais infectadas com rvv40L (CD40L-expressing recombinant vaccinia vírus) em co-cultura com macrófagos levaram à uma polarização para perfil M1 e inibição da proliferação das células neoplásicas e sobrenadante com potencial para recrutamento de células TCD8⁺. Estes autores demonstraram, ainda, que camundongos portadores de tumores sob a administração de rvv40L apresentaram regressão do tumor quando receberam M1, mas não M2. Em conjunto estes dados levantam hipóteses de mecanismos efetores de interação celular nos camundongos do grupo SIM: a alta frequência de células CD8⁺CD40L pode induzir diferenciação para M1, que mesmo sem aumento de NO neste sistema, a diminuição na produção de TGF- β reforça este fenótipo. Ao mesmo tempo, torna-se importante avaliar por ensaios *in vitro* de contato celular se linfócitos B e macrófagos M1 estariam promovendo a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺/CD40L⁺.

Por outro lado, a gestação em mães infectadas afetou primordialmente o compartimento dos macrófagos levando à maior população tipo M2, junto com alta produção de IL-10, em resposta aos antígenos tumorais. A produção de IL-10 vem sendo uma marca dos descendentes gerados em mães esquistossomóticas (DE HOLANDA et al., 2019; FERNANDES et al., 2018; SANTOS et al., 2010, 2014). Este fato pode ser devido aos antígenos dos ovos e vermes do *S. mansoni*, indutores de IL-10 (THOMAS; HARN, 2004) e da diferenciação para M2 (ASSUNÇÃO et al., 2017; SICA; MANTOVANI, 2012), amplificarem a condição tolerogênica *in útero* IL-10-dependente (BLOIS et al., 2004; SVENSSON et al., 2011).

Quanto aos animais que foram gerados e amamentados em mães infectadas houve efeitos conjuntos da amamentação (CD8⁺/CD40L⁺/CTLA-4⁺, macrófagos tipo M1 e menor produção de TGF- β) e da gestação (maior produção de IL-10).

Adicionalmente, foram observadas alterações peculiares como menor frequência de linfócitos B/CD86+ e maior produção de IFN- γ . Em conjunto, esse perfil de resposta imune não favoreceu o retardo no desenvolvimento do tumor e nem maior sobrevivência. Santos (SANTOS et al., 2016), em modelo de inflamação granulomatosa, mostraram produção de IFN- γ apenas nos animais MIAI. Estamos cientes que neopterin pode levar a menor expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD86 (MELICHAR et al., 2000), e merece ser avaliada futuramente. Vale à pena mencionar que houve menor frequência de células dendríticas CD11c+/CD86+ atrelada a gestação em mães esquistossomóticas (SANTOS et al., 2014). Estes dados reforçam a necessidade de ótima ativação dos linfócitos B e menor produção de TGF- β e IL-10 para melhor prognóstico nas neoplasias.

É importante mencionar que os dados experimentais aqui observados não descartam a importância da amamentação logo após da gestação em humanos, visto que não houve piora no curso do desenvolvimento do tumor que venha desfavorecer os benefícios da amamentação. Além disso, é preciso avaliar ainda se tempo de amamentação mais extenso reverte o quadro de supressão, bem como se o background de status celular (macrófagos M1 e IFN- γ) no grupo MIAI poderia ser trazido à tona com maior efetividade em contato pós-natal com antígenos parasitários (observado em áreas endêmicas) podendo levar a quebra da tolerância imunológica a certos tumores. Em acordo com essa hipótese tem sido reportado que células tumorais e *S. mansoni* compartilham epítopos glicosilados (DARANI; YOUSEFI, 2012; THORS et al., 2006; ZHANG et al., 1998).

Em conclusão, nós achamos que o leite de mães esquistossomóticas imprimiu um status de ativação celular nos seus descendentes que levou há um retardo no desenvolvimento tumoral, com participação de linfócitos TCD8+ e requerimento de linfócitos B apropriadamente ativados e presença de macrófagos M1. Os nossos achados podem apoiar pesquisas que buscam alimentos com caráter farmacológico, os nutracêuticos, onde componentes parasitários adicionados em leite materno e oferecido em tenra idade possa favorecer melhor resposta imune anti-tumoral ou ainda potencializar os efeitos antitumorais de protocolos quimioterápicos usados atualmente, pulsando as células imunológicas como linfócitos B, TCD8+ e macrófagos.

Agradecimentos

Nós agradecemos ao suporte da veterinária Gerlane Tavares de Souza Chioratto e ao PDTIS/FIOCRUZ, pelo uso de suas instalações. M.C. SILVA recebeu uma bolsa de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Tabela 1 - Análise de sobrevida, peso tumoral e peso corpóreo em descendentes de mães não infectadas e infectadas com *S. mansoni*.

Grupos ^a	P8- P0 ^b	P15-P0 ^b	Curva de sobrevida (%) ^c	Peso tumoral (g) ^d
CONTROLE-CE	5.000± 0.36	9.000 ± 0.60	47	5.405± 0.43
AI	4.500± 0.31 ^e	7.500 ± 0.48	86 ^e	4.952±0.40
MAI	5.000 ± 0.31	8.000 ± 0.77	60	5.661± 0.39
MI	6.000± 0.48	8.000 ± 0.46	53	5.735±0.53

a: Camundongos adultos *Swiss webster* amamentados (AI), nascidos (MI) ou nascidos e amamentados (MAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE), quando submetidos à implantação do Carcinoma de Ehrlich (25×10^6 células/animal). Foram acompanhados por 15 dias depois da implantação tumoral; b: mediana ± desvio padrão (DP) do 8º dia (P8) ou 15º (P15) - peso no dia da implantação (P0); c: curva de sobrevida, a partir de análises da curva de sobrevida, realizadas ao longo dos 15 dias; d: mediana ± DP do peso tumoral, análises realizadas no 15º dia após eutanásia e pesagem do tumor. e: $p < 0.05$ comparado com o grupo CONTROLE-CE.

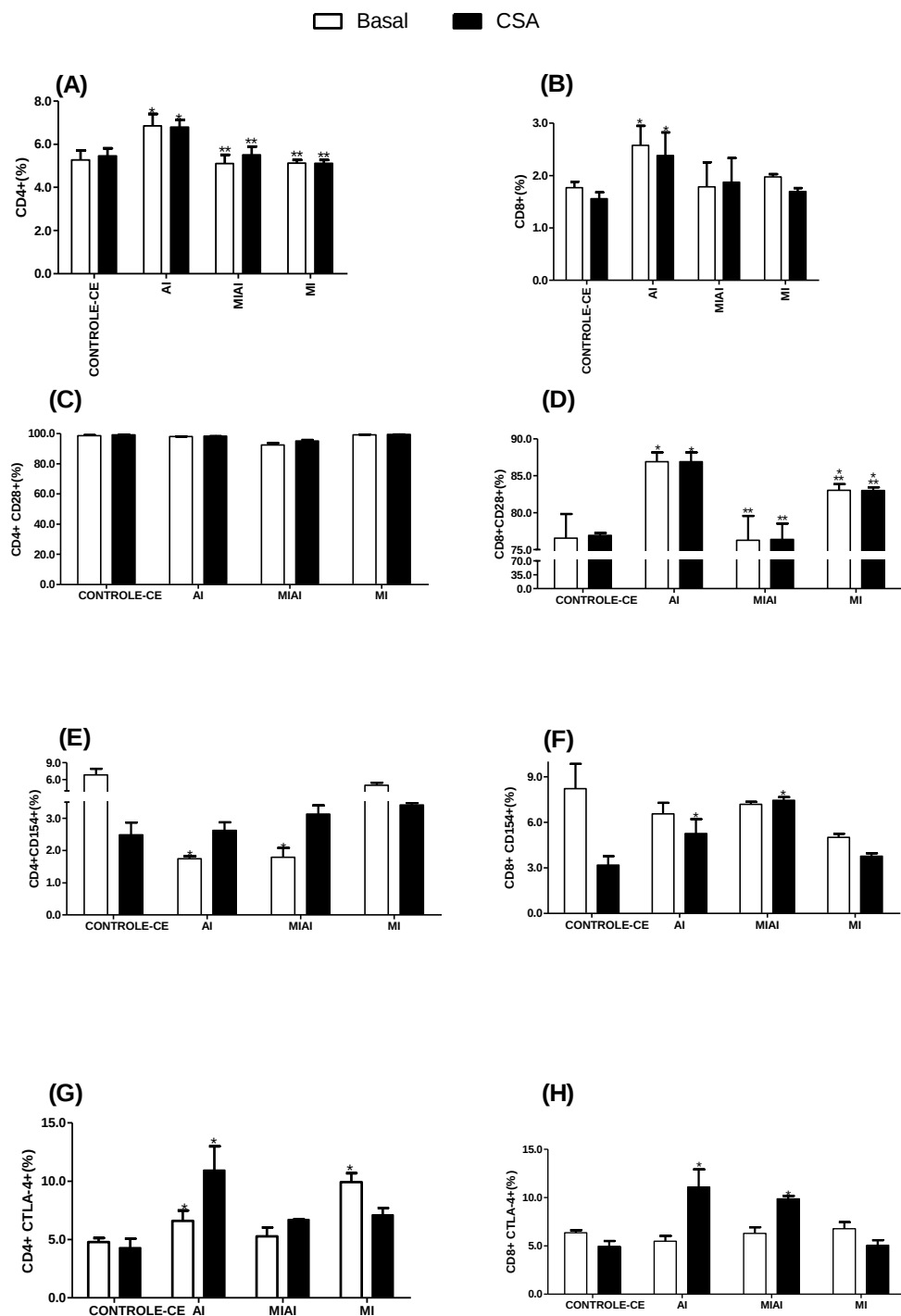


Figura 1 - Frequência de células CD4+ (esquerda A) e CD8+ (direita B) em esplenócitos quando cultivados (24 h) apenas com meio (basal), e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 µg/mL). A frequência da dupla marcação CD4+ ou CD8+ e CD28+ (C; D), CD40L+ (E; F), CTLA-4+ (G; H) foram analisadas em camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE), portadores do carcinoma de Ehrlich. Após a marcação com anticorpos anti-CD4 (FITC) ou anti-CD8a (APC) e anti-CD28 (PE) ou anti-CD40L(PE) ou anti-CTLA-4 (PE). Os resultados representam a mediana da frequência da dupla marcação de células esplênicas ± erro padrão de sete animais/grupo. * p < 0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE. ** p < 0.005 quando comparado ao grupo AI.

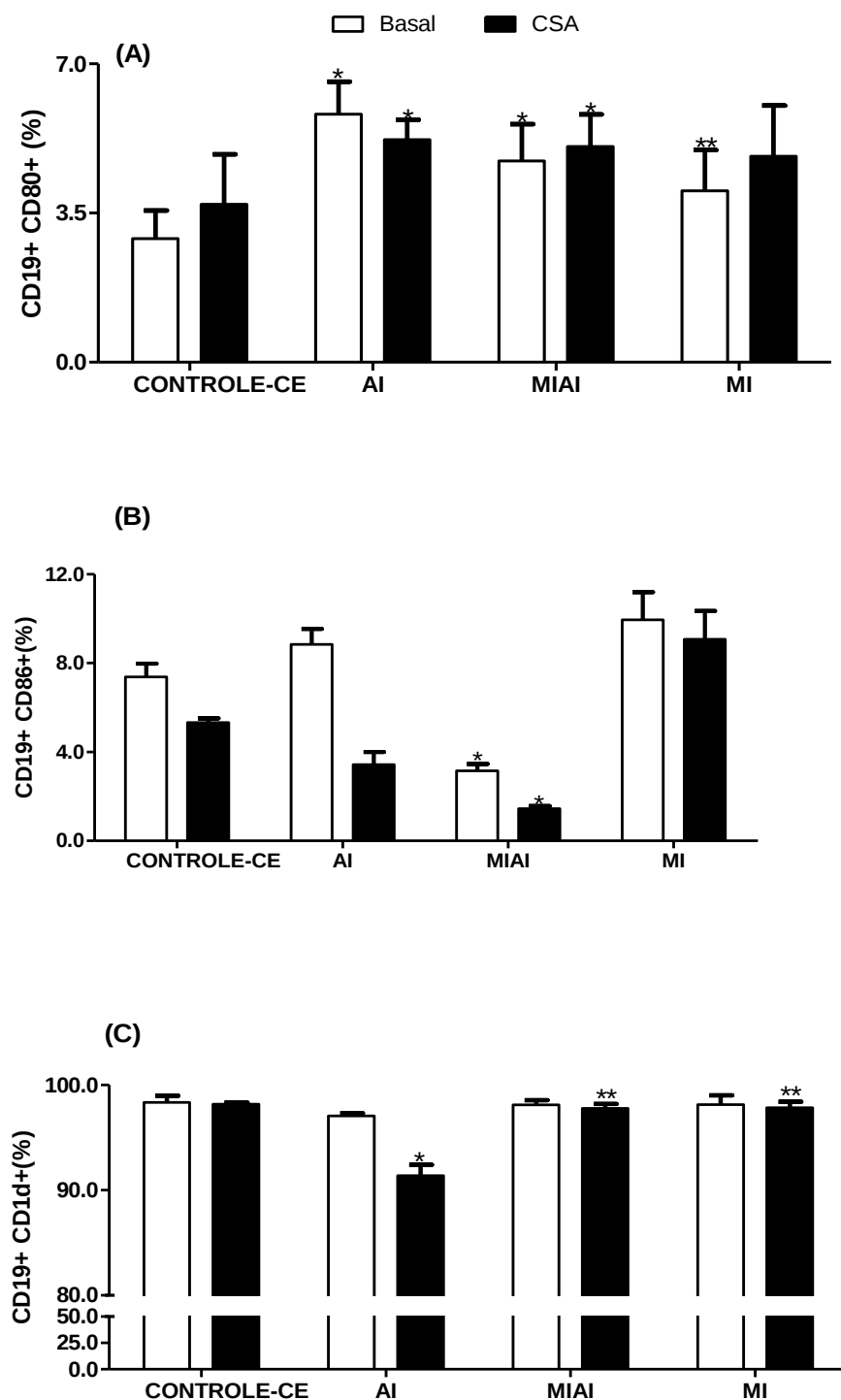


Figura 2 - Frequência de células CD19+ expressando CD86+ (A), CD80+ (B), CD1d+ (C) em esplenócitos quando cultivadas (24h) apenas com meio (basal) e antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 µg/mL) foram analisadas em camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI) ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE), portadores de carcinoma de Ehrlich. Marcadas com anticorpos anti-CD19 (APC) e anti-CD80 (PE) ou anti-CD86 (PE) ou anti-CD1d (PE). Os resultados representam a mediana da frequência da dupla marcação de células esplênicas $\pm$ erro padrão de sete animais/grupo. Os resultados demonstram um representante de três experimentos independentes. *p < 0,005 quando comparado com o grupo CONTROLE-CE.

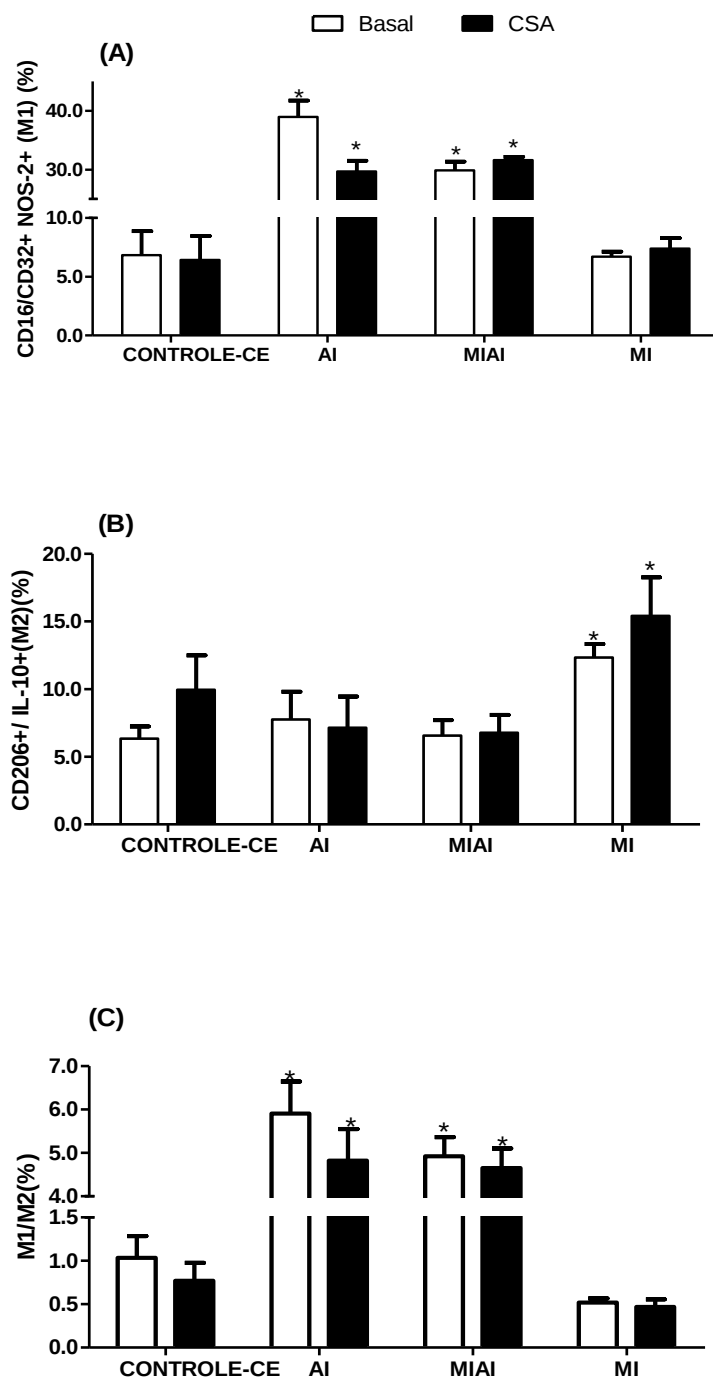


Figura 3 - CD16/CD32+/NOS-2+ células (A) e CD206+/IL-10+ (B) M1/M2 (C) em esplenócitos de camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectados com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich, cultivados (24 h) apenas com meio (basal), antígeno solúvel de carcinoma (CSA) (200 µg/mL), marcado com anticorpos anti-CD16/CD32 (FITC) e anti-NOS-2 (APC) e anti-CD206 (APC) e anti-IL-10 (PE). Os resultados representam a média da frequência da dupla marcação de células esplênicas $\pm$ erro padrão de sete animais/grupo. Os resultados demonstram um representante de 3 experimentos independentes. *p < 0.005 quando comparado ao grupo CONTROLE-CE.

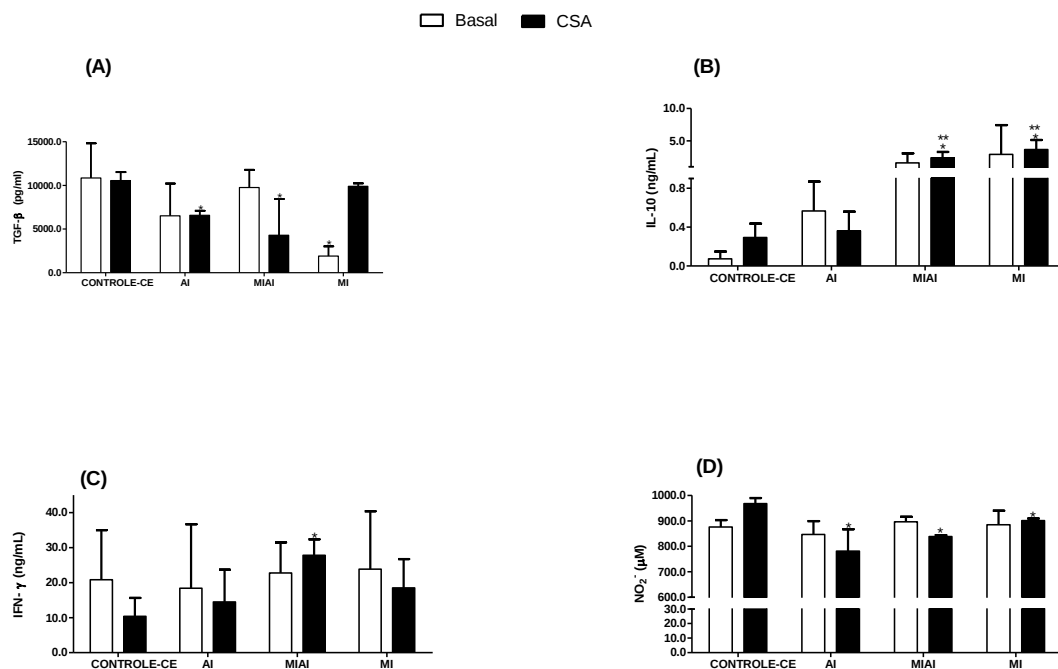


Figura 4 -Níveis das citocinas fator de crescimento tumoral TGF-β (A) interleucina (IL)-10; (B) óxido nítrico (C) interferon (IFN)-γ; (D) produzidas por células esplênicas de camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich. 12×10^6 (72 h) células foram cultivadas apenas com meio (basal) e antígeno solúvel do carcinoma (CSA) (200 μg/mL). Os resultados representam a mediana $\pm$ erro padrão. *p < 0.005 quando comparado com o grupo CONTROLE-CE. **p < 0.005 quando comparado ao grupo AI.

REFERÊNCIAS

- ASSUNÇÃO, L. S. et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine triggers M2 polarization of macrophages through PPAR γ dependent mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 2, p. 246–254, 2017.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- BLOIS, S. M. et al. Lineage, Maturity, and Phenotype of Uterine Murine Dendritic Cells Throughout Gestation Indicate a Protective Role in Maintaining Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1018–1023, 2004.
- BUHTOIAROV, I. N. et al. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. **Immunology**, v. 132, n. 2, p. 226–239, 2011.
- CHEN, Z. et al. Role of regulatory B cells in the progression of cervical cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.
- DA PAZ, V. R. F.; SEQUEIRA, D.; PYRRHO, A. Infection by *Schistosoma mansoni* during pregnancy: Effects on offspring immunity. **Life Sciences**, v. 185, n. July, p. 46–52, 2017.
- DARANI, H. Y.; YOUSEFI, M. Parasites and cancers: Parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. **Future Oncology**, v. 8, n. 12, p. 1529–1535, 2012.
- DE 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.
- DE 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.
- DILILLO, D.J., YANABA, K., TEDDER, T.F. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumour immunity: Therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. **J Immunol**. v. 184, p.4006–4016. 2010
- EISSA, M. M. et al. Immuno-therapeutic potential of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* antigens in a murine model of colon cancer. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 1, p. 47–56, 2019.
- EL-TONSY, M.M. et al. *Schistosoma mansoni* infection: Is it a risk factor for development of hepatocellular carcinoma? **Acta Tropica**. 128. 542-547.2013.
- 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.

FIELDS, P. E. et al. B7.1 Is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8⁺ TCR-transgenic T cells. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 10, p. 5268–5275, 1998.

FORTE, G. et al. Inhibition of CD73 Improves B Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity in a Mouse Model of Melanoma. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2226–2233, 2012.

GOVERNA, V. et al. A replication-incompetent CD40L/40L recombinant vaccinia virus induces direct and macrophage-mediated antitumor effects in vitro and in vivo. **OncoImmunology**, v. 8, n. 5, p. 1–16, 2019.

HÄNIG, J.; LUTZ, M. B. Suppression of Mature Dendritic Cell Function by Regulatory T Cells In Vivo Is Abrogated by CD40 Licensing. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 3, p. 1405–1413, 2008.

HONEYCUTT, J., HAMMAM, O., HSIEH, M.H. *Schistosoma haematobium* egg-induced bladder urothelial abnormalities dependent on p53 are modulated by host sex. **Exp Parasitol**. v.158, p.55–60.2015.

HOSEA BLEWETT, H. J. et al. **The Immunological Components of Human Milk**. [s.l.] Elsevier Masson SAS, 2008. v. 54

KALISH, S. V. et al. Macrophages Reprogrammed In Vitro Towards the M1 Phenotype and Activated with LPS Extend Lifespan of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. **Medical science monitor basic research**, v. 21, p. 226–234, 2015.

KUMAR, V. et al. The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. **Trends Immunol**. v.37, p. 208–220. 2016.

LAPOINTE, R. et al. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 11, p. 2836–2843, 2003.

LARGEOT, A. et al. The B-Side of Cancer Immunity: The Underrated Tune. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 449, 2019.

LI, Q. et al. In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy, **J. Immunol**. v.1, p.195-3203. 2009.

LI, Q. et al. Adoptive transfer of tumor reactive B cells confers host T-cell immunity and tumor regression. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 15, p. 4987–4995, 2011.

MELICHAR, B. et al. Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3⁺ tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 119, n. 1, p. 19–27, 2000.

MISHRA, S. et al. Subcutaneous Ehrlich Ascites Carcinoma mice model for studying

cancer-induced cardiomyopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

PALERMO-NETO, J.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 43–54, 2003.

PEREIRA, F. E.; RASO, P.; COELHO, P. M. Evolution of sarcoma 180 (ascitic tumor) in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 1, p. 39–42, 1986.

RITCHIE, D. S. et al. B-lymphocytes activated by CD40 ligand induce an antigen-specific anti-tumour immune response by direct and indirect activation of CD8⁺ T-cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, n. 6, p. 543–551, 2004.

SANTOS, P. D. A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomotic 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.

SANTOS, P. D. E. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 95–102, 2010.

SANTOS, P. D. 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.

SERRA, P. et al. CD40 Ligation Releases Immature Dendritic Cells from the Control of Regulatory CD4⁺CD25⁺ T Cells. **Immunity**, v. 19, n. 6, p. 877–889, 2003.

SHEN, M. et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55828–55839, 2016.

SICA, A., MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas **The J. Clin. Invest.** v. 122, p.787–795. 2012

SILVA, G. C. DA S. et al. Evaluation of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* Linn for antitumor activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 66–72, 2016.

STRAUBINGER, K. et al. Maternal immune response to helminth infection during pregnancy determines offspring susceptibility to allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 134, n. 6, p. 1271- 1279.e10, 2014.

SVENSSON, J. et al. Macrophages at the Fetal–Maternal Interface Express Markers of Alternative Activation and Are Induced by M-CSF and IL-10. **The Journal of**

THORS, C. et al. Thomsen-Friedenreich oncofetal antigen in *Schistosoma mansoni*: Localization and immunogenicity in experimental mouse infection. **Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 73–81, 2006.

VAN-TONG, H. et al Parasite Infection, Carcinogenesis and human malignancy.

Ebiomedicine. 15. 12-23. 2017.

WALKER, L. S. K.; SANSOM, D. M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 852–863, 2011.

WANG, Z. Y. et al. Original Article Materials and Methods Tumor cell line and mice Peptide synthesis vaccine. p. 295–305, [s.d.].

XIE, Y. et al. A novel T cell-based vaccine capable of stimulating long-term functional CTL memory against B16 melanoma via CD40L signaling. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 10, n. 1, p. 72–77, 2013.

YOSHIDA, A. et al. Enhanced UV $\square$ 1 tumor growth in CBF1 mice infected with *Schistosoma mansoni* due to modulation of Th1-like responses. **Parasitology International**, v. 51, n. 2, p. 177–186, 2002.

ZHANG, S. et al. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 2, p. 295–302, 1998.

6 CONCLUSÕES

- A infecção pelo *S. mansoni*, assim como a amamentação em mães esquistossomóticas levaram há um melhor prognóstico, com maior taxa de sobrevivência e menor ganho de peso tumoral, nos camundongos no hospedeiro ou no descendente quando portadores o carcinoma de Ehrlich.
- A infecção pelo *S. mansoni* ou prévia amamentação em mães esquistossomóticas favoreceram o aumento da frequência dos linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺, no hospedeiro ou no descendente quando portadores o carcinoma de Ehrlich.
- O favorecimento da ativação dos linfócitos pode ocorrer no hospedeiro infectado e portador do tumor, visto que houve uma redução muito mais acentuada na expressão de CTLA-4 do que a expressão das moléculas CD28 e CD40L.
- O favorecimento da ativação dos linfócitos pode ocorrer no descendente e portador do tumor, previamente amamentado por mães esquistossomóticas (AI e MIAI), visto que houve maior expressão das moléculas CD40L e CD28⁺, apesar da maior frequência de linfócitos TCD8⁺/CTLA-4⁺.
- Para o hospedeiro infectado e portador do tumor, houve aumento na frequência dos linfócitos B expressando CD80 e CD86, acompanhado do aumento de anticorpos totais e com desvio para produção isótipo IgG1. Enquanto nos descendentes com tumor, que foram amamentados em mães esquistossomóticas houve incremento do status de ativação dos linfócitos B levando à expressão de CD80⁺. Em ambas as situações houve menor frequência de linfócitos B regulatórios (CD19⁺/CD1d⁺).
- A infecção esquistossomótica, assim como a amamentação em mães infectadas favoreceu o bom prognóstico ao demonstrar uma menor proporção de macrófagos alternativamente ativados (M2), no hospedeiro ou no descendente quando portadores o carcinoma de Ehrlich.

- A gestação em mães esquistossomóticas levou há um ambiente imunossupressor e que favorece crescimento/manutenção do tumor, com alta produção de IL-10 e maior frequência de macrófagos M2.
- A gestação seguida da amamentação em mães infectadas reduz a frequência de linfócitos B CD19+/CD86+, enquanto aumenta a produção de IFN- γ .
- A infecção esquistossomótica, assim como a amamentação em mães infectadas levou à menor produção de TGF- β .
- O contato seja via infecção ou leite materno modulou positivamente a resposta imune sistêmica anti-tumoral, ativando linfócitos TCD8+, linfócitos B e direcionando macrófagos para via clássica de ativação. Desta forma, é possível que haja uma liberação do ambiente imunossupressor ocasionado pelo processo de carcinogênese.

REFERÊNCIAS

- AMU S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **J Allergy Clin Immunol.** v. 125, n. 5, p.1114-1124, 2010.
- ARAÚJO, M. I. et al. Inverse Association between Skin Response to Aeroallergens and *Schistosoma mansoni* Infection. **International archives of allergy and immunology**, v. 123, n. 1, p. 145–148, 2000.
- ASSUNÇÃO, L. S. et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine triggers M2 polarization of macrophages through PPAR γ dependent mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 2, p. 246–254, 2017.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, 2010.
- BARBOSA, C.S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 101, n.I, p. 55–62, 2006.
- BURNET, F. M. Immunological surveillance. **Pergamon Press.** 1970.
- CHEN, Z. et al. Role of regulatory B cells in the progression of cervical cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, 2019.
- CAMARGO, M. R. et al. Modulation of macrophage cytokine profiles during solid tumor progression: susceptibility to *Candida albicans* infection. **BMC Infectious Diseases.** v. 9, p. 1-8, 2009.
- CARDOSO, L. S. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate allergic response in vitro in cells of asthmatic individuals. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 538–548, 20 set. 2011.
- CHEN, L., WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature**, v. 225, n. 5234, p. 734, 1970.
- CHEN, T.; STONER, G.D. Inducible nitric oxide synthase expression in Nnitrosomethylbenzylamine (NMBA). **Mol Carcinog.** v.40, n.4, p.232-40.2004.
- CHENG, M. et al. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. **Cell Mol. Immunol.** v. 10, p.230–52, 2013.
- CHIARAMONTE, M.G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology.** 2001
- CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Cell press.** v. 30, n.3, p. 141-150, 2014.

CLEENEWERK, L.; GARSSSEN, J.; HOGENKAMP, A. Clinical Use of *Schistosoma mansoni* Antigens as Novel Immunotherapies for Autoimmune Disorders. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, p. 1–16, 2020.

CONWAY, E.M. et al. Macrophages, inflammation, and lung cancer. **All AJRCCM issues**. v. 193, n. 2, p. 116-130, 2016.

CORTHAY, A. et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4⁺ T cells. **Immunity**. v. 22, n.3. p.371-83.2005.

DA PAZ, V. R. F.; SEQUEIRA, D.; PYRRHO, A. Infection by *Schistosoma mansoni* during pregnancy: Effects on offspring immunity. **Life Sciences**, v. 185, n. July, p. 46–52, 2017.

DARANI, H. Y.; YOUSEFI, M. Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. *Future oncology*. v.8, n.12, p. 1529-1535, 2012.

DE HOLANDA, G. C. R. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomotic 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.

DE 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.

DENARDO, D. G. et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell**.; v.16: p. 91–102, 2009.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.v. 3, n.11, p. 991-998, 2002.

EBERLE, C. et al. Maternal immunization affects in utero programming of insulin resistance and type 2 diabetes. **PLos one**. v. 7, n.9, p. 1-12, e4536. 2012.

EISSA, M. M. et al. Immuno-therapeutic potential of *Schistosoma mansoni* and *Trichinella spiralis* antigens in a murine model of colon cancer. **Investigational New Drugs**, v. 37, n. 1, p. 47–56, 2019.

EMERSON, R. W. Disponível em : https://www.pensador.com/ralph_waldo_emerson_sucesso/.

FRAJACOMO, F. T. T. et al. Solid Ehrlich carcinoma reproduces functional and biological characteristics of cancer cachexia. **Life Sciences**. v.162, p. 47–53. 2016.

FEITOSA, I.B. et al. What are the immune responses during the growth of Ehrlich's tumor in ascitic and solid form? **Life Sciences**. v. 264, p. 118578. 2021.

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.

FLOUDAS, A. et al. *Schistosoma mansoni* worm infection regulates the intestinal microbiota and susceptibility to colitis. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 8, p. 1–11, 2019.

FORTE, G. et al. Inhibition of CD73 Improves B Cell-Mediated Anti-Tumor Immunity in a Mouse Model of Melanoma. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2226–2233, 2012.

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

GIL, J. et al. Inhibition of *in vivo* tumor growth by a monoclonal IgM antibody recognizing tumor cell surface carbohydrates. **Cancer Res.** v. 50, p. 7301–7306. 1990.

HAABETH, O.A.W. et al. CD4+ T-cell killing of multiple myeloma cells is mediated by resident bone marrow macrophages. **Blood Adv.** v. 23, n.12, p. 2595-2605. 2020.

HAGERLING, C.; CASBON, A-J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. **Trends Cell Biol.** v.25, n.4, p. 214–220, 2015.

HEMDAN, N. Y. A. Anti-cancer *versus* cancer promoting effects of the interleukin-17-producing T helper cells. **Immunology letters.** v.149, p. 123-133, 2013.

HERBERT, D. B. R. et al. Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. v. 20, p. 623–635, 2004.

HIRAHARA, N. et al. Inoculation of human interleukin-17 gene transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell- dependent tumor-specificity immunity in mice. **Oncology.** v. 61, p.79-89, 2001.

HUNG, K. et al. The Central Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response. **J. Exp. Med.** v. 188, n. 12, p.2357–2368, 1998.

INCA Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> Acessado em 22 de março de 2017.

INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao#:~:text=A%20mais%20recente%20estimativa%20mundial,c%C3%A2nceres%20de%20pele%20n%C3%A3o%20melanoma>). Acessado em 22 de novembro de 2020.

ITO, D. et al. Induction of CTL Responses by Simultaneous Administration of Liposomal Peptide Vaccine with Anti-CD40 and Anti-CTLA-4 mAb. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1230–1235, 2000.

- JIN, F. et al. The anti-tumor role of NK cells in vivo pre-activated and re-stimulated by interleukins in acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**. v.7, n. 48, p.79187-202, 2016.
- JONES, H. P. et al. Lung and splenic B cells facilitate diverse effects on in vitro measures of antitumor immune responses. **Cancer Immunity**, v. 8, n. December 2007, p. 1–9, 2008.
- KALLINIKOVA, V.D. et al. Antibodies against Trypanosoma cruzi in intact mice and their oncoprotective effect. **Med Parazitol** . v. 1, p. 11-5. 2008.
- KALISH, S.V. et al. Macrophages Reprogrammed *In Vitro* Towards the M1 Phenotype and Activated with LPS Extend Lifespan of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. **Med Sci Monit Basic Res**. v. 21, p. 226-234, 2015.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 14, p. 397-400. 1972.
- KIRAZ, Y. et al. T cells in tumor microenvironment. **Tumor Biol**. v.37, p.39-45, 2016.
- KRYCZEC, I. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environment. **Blood**. v. 114, p.123-133, 2009.
- LANGERS et al. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. **Biologics: Target and therapy**. v. p. 73-82, 2012.
- LEÓN-CABRERA, S. et al. Extraintestinal Helminth Infection Reduces the Development of Colitis-Associated Tumorigenesis. **International Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 9, p.948-956, 2014.
- LI, Q et al. In vivo sensitized and in vitro activated B cells mediate tumor regression in cancer adoptive immunotherapy, **J. Immunol**. v. 1, p. 3195-3203, 2009.
- LI, Q. et al. Adoptive Transfer of Tumor Reactive B Cells Confers Host T- Cell Immunity and Tumor Regression. **Clin Cancer Res**. v.17, n.15, p. 4987–95, 2011.
- LI, Y. et al. Irradiated tumor cells of lipopolysaccharide stimulation elicit an enhanced anti-tumor immunity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 11, p. 1815–1823, 2014.
- MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHSH, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature**, v. 3; p.733-744, 2003.
- MALHOTRA I. et al. Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis. **J. immunol**. v.162, p. 6843–48, 1999.

MANDAL, D. et al. Black Tea Protects Thymocytes in Tumor-Bearing Animals by Differential Regulation of Intracellular ROS in Tumor Cells and Thymocytes. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. v. 24, n. 2, p.91–104. 2005.

MANDAL, D et al. Tumor-induced thymic involution via inhibition of IL-7Ra and its JAK-STAT signaling pathway: Protection by black tea. **International Immunopharmacology**. v.6, p.433– 444, 2006.

MANTOVANI, A. et al. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. **Cancer Metastasis**. v. 25, n. 3, p. 315-22, 2006.

MARKOV, O. V. Molecular and cellular mechanisms of antitumor immune response activation by dendritic cells. **Acta Naturae**. v.8, n. 3, p. 17-30, 2016.

MARTIN-FONTECHA A. et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. **Nat. Immunol.** v.5, p.1260–65, 2004.

MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. immunol** v. 173, p. 1224-1231, 2004.

MEDEIROS, M. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, n. 5, p. 947–951, maio 2003.

NARENDRA, B.L. et al. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflamm. Res.** 2013.

NASCIMENTO, W.R.C et al. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. **Parasitol Res.** v.113, p. 3309–3317. 2014.

NASSEF, N.E. et al. *Schistosoma mansoni* infection or soluble egg antigen immunization can reduce allergic airway diseases. **Menoutia Medical Journal**. p.642649, 2015.

NOURELDIN M.S.; SHALTOUT AA. Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. **J Egypt Soc Parasitol**; v. 28, p.539-550, 1998.

OIKONOMOPOULOU, K. et al. Infection and Cancer: Revaluation of the Hygiene Hypothesis. **Clin Cancer Res.** v.19, n.11, p. 2834–41, 2013.

OLIVEIRA, S. M. DE et al. Association between allergic responses and *Schistosoma mansoni* infection in residents in a low-endemic setting in Brazil. **revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 770–774, 2014.

OSADA Y, et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. **Int J Parasitol**, v.39, p.457-464, 2009.

- OSTRAND-ROSENBERG, S. CD4⁺ T Lymphocytes: A Critical Component of Antitumor Immunity. **Cancer Investigation**, v. 23, p. 413–419, 2005.
- OTHMAN, A.A. et al. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiology** v. 215, .101–112, 2010.
- OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **Afr J Biotechnol.** v. 10, n. 13, p. 2375–2378, 2011.
- PACÍFICO, L.G.G. et al. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent of Interleukin-10. **Infec. immune.** v. 77, n. 1, p. 98–107, 2009.
- PALUCKA, K. et al. Dendritic cells and immunity against cancer. **J Intern Med.** v. 269, n.1, p. 64–73, 2011.
- PARDOL, D.M. and TOPALIAN, S. L. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. **Current Opinion in Immunology.** v.10, p.588–594, 1998.
- PEARCE, E.J., MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. rev. immunol.** v.2, p.499–511, 2002.
- PEREIRA, F.E.L et al. Evaluation of Sarcoma 180(Ascitic tumor) in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v.19, n.1, p.39–42, 1986.
- PEREZ-DIEZ, A. et al. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. **Blood.** v.109, n.12, p. 5346–5354. 2007.
- PROTTI, M.P.; DE MONTE, L.; D LULLO, G. Tumor antigen-specific CD4⁺ T cells in cancer immunity: from antigen identification to tumor prognosis and development of therapeutic strategies. **Tissue Antigens.** v. 83, n. 4, p. 237–46, 2014.
- PYO, K. H. et al. Immune adjuvant effect of a *Toxoplasma gondii* profilin-like protein in autologous whole-tumor-cell vaccination in mice. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, p. 74107–74119, 2016.
- QUIAN et al. Interleukin-17 acts as double-edged sword in antitumor immunity and tumorigenesis. **Cytokine.** 2015 Article in press.
- RIBATTI, D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 7175–7180, 2017.
- ROCHA, B.; TANCHOT, C. CD8 T cell memory. **Semin. Immunol.**, v.16, n. 5, p. 305–314, 2004.
- RUTITZKY, L.I.; LOPES DA ROSA, J.R.; STADECKER, M.J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **J. immunol.** v. 175, p. 3920–3926, 2005.

RUTITZKY, L.I.; STADECKER, M.J. CD4 T cells producing proinflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Mem. inst. oswaldo cruz**.v.101, p.327–330, 2006.

RUYSSERS, NE, et al. *Schistosoma mansoni* proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. **World J Gastroenterol**; v.16, p.703-712, 2010.

SALAWU, O.T.; ODAIBO, A.B. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. **Int. j. gynaecol. obstet.** v.122, p.1-4, 2013.

SALES, IANA RAFAELA FERNANDES. Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. 140 folhas. Orientador: Dr^a Valdenia Maria Oliveira de Souza. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Pernambuco. CCS Medicina Tropical, 2015.

SANTOS, P.A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **Parasitol. res.** v. 107, n. 1, p. 95-102, 2010.

SANTOS, P.A. et al Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression. In antigen-presenting cells from adult offspring mice. **Exp. parasitol.** v 141, p 62-67, 2014.

SANTOS, P. D. A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomotic 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.

SARVARIA, A.; MADRIGAL, J. A.; SAUDEMONT, A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 14, n. 8, p. 662–674, 2017.

SEGURA, J.A. et al. Ehrlich ascites tumour unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immunology Letters* v.74, p. 111–115. 2000.

SEGURA, J.A. BARBERO, L.G. MARQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **FEBS Lett.** v.414, p. 1–6.1997.

SEYDEL, L. S. et al. Association of In Utero sensitization to *Schistosoma haematobium* with enhanced cord blood IgE and increased frequencies of CD5-B cells in African newborns. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 613–619, 2012.

SHEN, M. et al. Positive and negative functions of B lymphocytes in tumor. **Oncotarget.** p.1-12, 2016.

SILVA, G. C. DA S. et al. Evaluation of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* Linn for antitumor activity. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 5, p. 66–72, 2016.

SILVA I. L. S. et al. Qa-2 expression levels is related with tumor-infiltrating lymphocytes profile during solid Ehrlich tumor development. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 92, p. 750–756, 2017.

SILVA, F. L. 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. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**. v.54, p. e0744-2020, 2021.

SMITS, H.H. et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. **J Allergy Clin Immunol** v.120. p, 932-940, 2007.

SOUZA, F.P.C., VITORINO, R.R.; COSTA, A.P. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clin. Med.**. São Paulo, v. 9, p.300-7, 2011.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS. G. CD4 T-cell memory. **Semin. Immunol.**, v. 16, n. 5, p. 295-303, 2004.

STRAUBINGER, K. et al. Maternal immune response to helminth infection during pregnancy determines offspring susceptibility to allergic airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol** v. 134, n. 6, p. 1271-1279e10, 2014.

TEL. J. Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends in Immunology*. v.35, n.1, p. 38-46. 2014.

THOMAS, P.G.; HARN, D.A. Jr. Immune biasing by helminth glycans. **Cell. microbiol.**v. 6, n. 1, p. 13-22, 2005.

THOMSEN, L.L. WILES, D.W. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours.

TODA, K. S. et al. Hepatocellular carcinoma related to schistosoma mansoni infection: Case series and literature review. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 3, n. 4, p. 260–264, 2015.

UBILLOS, L. et al. *Trypanosoma cruzi* extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers. **International Journal of Cancer**. v. 138, p. 1719-1731, 2016.

VESELY, M. D. et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annu. Rev. Immunol.** v. 29, p. 235–71, 2011.

WANG, Z. Y. et al. Original Article Materials and Methods Tumor cell line and mice Peptide synthesis vaccine. p. 295–305, 2012.

WHO (World Health Organization). Schistosomiasis, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/>>. Acesso em: 10 fev 2016

WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol.** v. 85, p. 148154, 2007.

YOSHIDA, A. et al. Enhanced UV γ 1 tumor growth in CBF1 mice infected with *Schistosoma mansoni* due to modulation of Th1-like responses. **Parasitology International**, v. 51, n. 2, p. 177–186, 2002.

ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **Eur. J. Immunol.** v. 33, p.1439–1449, 2003.

ZIZKA, J. et al. Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. **Ped. All. and Immunol.** v.18, p. 486 – 494. 2007.

ZONG, J. et al. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. **Cancer Immunol Immunother**, 2016.

APÊNDICE A- TÍTULOS DE ANTICORPO IGG TOTAL EM DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS SOB IMPLANTAÇÃO TUMORAL.

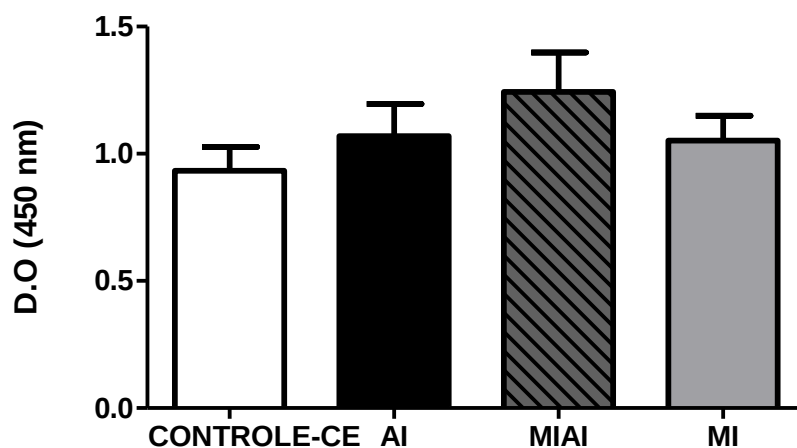


Figura 1- . IgG total anticorpos produzidos por camundongos adultos amamentados (AI), nascidos (MI), ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas com *S. mansoni*, nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE-CE) portadores de Carcinoma de Ehrlich. Os níveis dos isótipos foram dosados por ELISA direto nas diluições 1:50 (IgG total) 15 dias pós implantação tumoral. Os resultados expressam a mediana da absorbância (D.O) $\pm$ desvio padrão de 7 a 10 animais/grupo.

ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA IAM/FIOCRUZ PE)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS LINFÓCITOS B E FATORES EPIGENÉTICOS, EM CAMUNDONGOS ADULTOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS, EM RESPOSTA A ANTÍGENOS TUMORAIS E PROTÉICOS” protocolado sob nº 113/2017 pelo (a) pesquisador (a) **Virginia 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) em reunião 22/11/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 01 de dezembro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogênico (Swiss)	70 (25-30gr/ 4 semanas/ machos) e 140 (25-45gr/ 4 semanas/fêmeas)
Camundongo heterogênico (Swiss) - Descendentes dos animais acima citados	448 (peso variados/0-120 dias/machos) e 672 (peso variados/0-120 dias/fêmeas)
Total	1.332

Recife (PE, Brasil), 01 de dezembro de 2017

Dr Lindomar José Pena
Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Mat. SIAPE: 1971435
e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
IAM / FIOCRUZ

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br

ANEXO B-COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

Editorial Manager®

editorialmanager.com/imbio/default.aspx

Apps Currículo do Sistem... PCI Concursos PORTUGUÊS PARA... Association Between... Curso Maquiagem... Editorial Manager® Apostila DNA Reco... Outros favoritos

Immunobiology

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Author Username: valdenia.souza@gmail.com

Submissions Being Processed for Author Valdenia Souza

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	IMBIO_2020_412	Schistosoma mansoni-infected mice showed reduced growth of Ehrlich carcinoma, improved immunity in CD8+ T cells and B cells, but not in M2 macrophages.	Aug 10, 2020	Jan 11, 2021	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

IMBIO_2020_412_Original_V1.pdf - Adobe Acrobat Reader DC

Arquivo Editar Visualizar Assinar Janela Ajuda

Início Ferramentas IMBIO_2020_412_...

Localizar texto (Ctrl+F)

Manuscript Details

Manuscript number IMBIO_2020_412

Title Schistosoma mansoni-infected mice showed reduced growth of Ehrlich carcinoma, improved immunity in CD8+ T cells and B cells, but not in M2 macrophages.

Article type Research Paper

Abstract

Infections and parasitic products are known to induce anti-tumour immune responses that impair tumoural development; however, for Schistosoma mansoni infections, studies conflict and the mechanisms of action are unclear. In this study, we evaluated the activation of CD4+ and CD8+ T cells, and of B cells, as well as the participation of M1 and M2 macrophages, against tumour antigens in mice with schistosomal infections. Mice were divided into uninfected and S. mansoni-infected tumour-bearing Ehrlich carcinoma groups (CONTROL-EC and INFECTED-EC, respectively). We measured survival, tumour weight, and serum antibody levels (total IgG and specific IgG1/IgG2a). We measured cytokine production as well as double-labelled CD4+ or CD8+ T lymphocytes (CD28, CTLA-4 or CD154), CD19+ B lymphocytes (CD80, CD86, and CD1d), and macrophages (M1-CD16/CD32+ and M2-CD206+) in spleen cell cultures in response to stimulation with carcinoma soluble antigen (CSA). There were higher survival rates and lower tumour weights in the INFECTED-EC group than in the CONTROL-EC group, as well as higher frequency of CD8+ T cells. There was a lower frequency of double-labelled CD8+ or CD4+ and CD28+/CD154+/CTLA-4+ cells, but a much lower frequency of CD8+/CTLA-4+ cells. The INFECTED-EC group had a high frequency of CD19+CD86+ and CD80+ cells, and high levels total IgG and anti-CSA IgG1, as opposed to IgG2a, and very low frequency of CD206+ macrophages. In response to CSA, the INFECTED-EC group produced less IFN-γ, IL-10, TGF-β, and NO. Therefore, it is possible that S. mansoni infection led to regression of Ehrlich carcinoma, characterized by improved anti-tumour CD8+ and humoral responses together with classically activated macrophage responses.

Keywords Schistosomiasis; Ehrlich carcinoma; B cells; CD8+; Macrophage.

Manuscript region of origin South America

Corresponding Author Valdenia Souza

Corresponding Author's Institution Universidade Federal de Pernambuco-LIKA

Order of Authors Maria da Conceição Silva, Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda, Raul Penaforte Correia da Silva, Cassia Giselle de Oliveira Nóbrega, Virginia Maria Barros de Lorena, Ivone Souza, André Aires, Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque, Vláudia Costa, Valdenia Souza

ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

Editorial Manager®

editorialmanager.com/cimid/default.aspx

Apps Currículo do Sistem... PCI PCI Concursos PORTUGUÊS PARA... Association Between... Curso Maquiagem... Apostila DNA Reco... Outros favoritos

COMPARATIVE IMMUNOLOGY, MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES

em Editorial Manager

Role: Author Username: Valdênia

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Submissions Being Processed for Author Valdênia Maria Oliveira de Souza

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Breastfeeding of mice by schistosomic mothers alters the activation status of B lymphocytes, polarizes M1 macrophages, and delays the development of Ehrlich solid tumor	Dec 23, 2020	Dec 23, 2020	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

CIMID-S-20-00863 (1).pdf - Adobe Acrobat Reader DC

Arquivo Editar Visualizar Assinar Janela Ajuda

Início Ferramentas CIMID-S-20-0086... x

Fazer login

1 / 31 75%

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases
Breastfeeding of mice by schistosomic mothers alters the activation status of B lymphocytes, polarizes M1 macrophages, and delays the development of Ehrlich solid tumor
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Schistosomiasis; Breastfeeding; Gestation; Ehrlich carcinoma; Macrophages; B cells
Corresponding Author:	Valdênia Maria Oliveira de Souza Universidade Federal de Pernambuco BRASIL
First Author:	Maria da Conceição Silva
Order of Authors:	Maria da Conceição Silva Gabriela Holanda Raul Silva Thaís dos Santos Virginia de Lorena Ivone de Souza André Aires Mônica Albuquerque Vivaudia Costa Valdênia Maria Oliveira de Souza
Abstract:	Maternal schistosomiasis modulates immunity in offspring. We compared immunity to tumor antigens in adult offspring of mothers that had been infected with <i>Schistosoma mansoni</i> with those who had not. The experimental groups were born (BM), suckled (SIM), or born/suckled (BSIM) to schistosomic mothers; the control group was mice born and suckled by non-infected mothers (CONTROL-EC). All mice were implanted with Ehrlich carcinoma. We measured survival, body and tumor weights; cytokine production, double-labelled CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T lymphocytes (CD28, CTLA-4 or CD134), CD19 ⁺ B lymphocytes (CD80, CD86, or CD136), and macrophages (M1-CD11c/CD301b/2 and M2-CD301b/10) in spleen cell cultures under stimulation by carcinoma soluble antigen. Suckled mice had higher survival rates, lower tumor weights, higher activation status of TCD8 ⁺ lymphocytes, M1 phenotype, and inhibited

POR PTB2 17:56 13/01/2021