



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

JULIANA FLORENTINO MANÉ

Avaliação in situ de FOXP3+ E IL17 em fígado e intestino de camundongos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* e tratados com *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN)

Recife

2022



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

JULIANA FLORENTINO MANÉ

Avaliação *in situ* de FOXP3+ E IL17 em fígado e intestino de camundongos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* e tratados com *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN)

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

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

Co-orientador: Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife

2022

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

M274a	Mané, Juliana Florentino Avaliação <i>in situ</i> de FOXP3+ E IL17 em fígado e intestino de camundongos infectados experimentalmente com <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados com <i>Bacillus clausii</i> (O/C, N/R,T e SIN) / Juliana Florentino Mané. – 2022. 83 f.; il. Orientadora: Vláudia Maria Assis Costa. Coorientador: André de Lima Aires. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2022. Inclui referências e anexo. 1. Probióticos. 2. <i>Bacillus clausii</i>. 3. <i>Schistosoma mansoni</i>. 4. Imunomodulação. I. Costa, Vláudia Maria Assis (orientadora). II. Aires, André de Lima . (coorientadora). III. Título. 616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 239)
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

JULIANA FLORENTINO MANÉ

**AVALIAÇÃO *IN SITU* DE FOXP3+ E IL17 EM FÍGADO E INTESTINO DE
CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *SCHISTOSOMA*
MANSONI E TRATADOS COM *BACILLUS CLAUSII* (O/C, N/R, T E SIN)**

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

Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovada em: 30/03/2022.

BANCA EXAMINADORA:

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

Profa. Dra. Francisca Janaína Soares Rocha (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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

Dedico este trabalho aos que resistem.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela saúde;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa, que dia após dia me fez perceber que fiz a escolha certa. Agradeço pela paciência e pela forma tão tranquila e carinhosa de conduzir as orientações, muito obrigada por tudo, de coração!

Agradeço com muito carinho ao meu co-orientador, Prof. Dr. André de Lima Aires, sempre muito prestativo, foi parte fundamental em todo processo;

Em especial, agradeço a Prof^a. Dr^a. Francisca Janaína Soares Rocha, que desde o nosso primeiro encontro confiou, apostou no meu potencial e abriu seu coração e as portas do seu laboratório para que eu me alfabetizasse na linguagem da imunohistoquímica e da pesquisa. Obrigada por fazer um pequeno sonho se tornar realidade!

Ao Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza, Prof^a. Dr^a. Francisca Janaína Soares Rocha e Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento, por terem aceitado participar desta fase final como membros da banca examinadora.

Aos colaboradores Mestre Clênio Silva, Prof. Dr. André Aires e Prof^a. Dr^a. Vláudia Costa, meu muito obrigada pelo desenvolvimento da parte experimental do trabalho, Prof^a. Dr^a. Virgínia Lorena, por toda ajuda com a citometria de fluxo e Prof. Jacinto Costa, pela ajuda de captura das imagens.

Ao Cristyell, que além de companheiro da bancada se tornou um grande amigo. Aprendi que posso contar com você a qualquer momento. Muito obrigada por tudo, por compartilhar comigo todos os momentos deste trabalho, onde superamos juntos todas as dificuldades com muita determinação e alegria mesmo diante de 200 lâminas da imunohistoquímica.

Às companheiras de casa, Yara e July, e as minhas conterrâneas Cleisa, Aurisia e Natalice, minha Tia Eulália, pelos momentos de alegria e companheirismo que vivemos juntos nestes três anos.

De maneira especial agradeço todos os familiares e ao meu namorado Duman Cris, que sempre participaram de todos os momentos, me apoiando e estimulando, mesmo de longe.

Aos professores do Programa de Mestrado em Medicina Tropical da UFPE, pela contribuição na minha formação.

À agência CAPES, pelo apoio financeiro deste trabalho, através da bolsa a mim concedida.

A todos os que contribuíram de alguma forma, seja direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada caracterizada por uma resposta granulomatosa inflamatória contra o ovo depositado no tecido do hospedeiro, especialmente nos tecidos hepáticos e intestinal. Atualmente o tratamento da esquistossomose é baseado unicamente no uso do praziquantel (PZQ). Os probióticos têm sido usados no tratamento de doenças gastrointestinais entre outras e seu mecanismo atribuído a possível atividade imunomodulatória. O *Bacillus clausii* tem sido usado amplamente como probiótico mais existem poucos estudos que caracterizam seus mecanismos imunomodulatórios. Desta forma este estudo vem avaliar o potencial imunomodulatório do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) e seu potencial como adjuvante no tratamento da esquistossomose mansônica. Camundongos foram distribuídos em cinco grupos experimentais, separados de acordo com exposição cercariana e esquema terapêutico adotado: G1(não infectado) e G2 (não infectado e tratado com *B.clausii*), G3 (infectado), G4 (infectado e tratado profilaticamente) e G5 (infectado e tratado após oviposição). *B. clausii* foi administrado diariamente por gavagem em dose única de (1000000000 UFC/mL) em 300 µL. Após 100 dias, os baços foram excisados e as células esplênicas foram cultivadas com estímulo de Enterogermina® (EG), ConA ou sem estímulo. Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para dosagem de citocinas IL12p70, IL10 e IFN-gama por citometria de fluxo (CBA). Fragmentos de fígado e intestino foram removidos para realizar a avaliação *in situ* de FOXP3 e IL17 por reação de imunohistoquímica utilizando o sistema imunoperoxidase. Nossos resultados demonstraram que animais tratados com *B. clausii* apresentaram produção significativamente mais elevada de IL12 p70 ($p<0,05$), assim como as culturas de células de animais infectados estimulados com Enterogermina® (EG). No estímulo com ConA, o grupo que recebeu o *B. clausii* curativamente (G5) apresentou níveis significativamente maior de IFN-gama ($p<0,05$) que os animais infectados sem tratamento (G3). O tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de citocina IL-10 nos animais do grupo infectado tratado após início da oviposição (G5), quando comparado a todos os demais grupos. Os animais infectados e não tratados (G3) apresentaram níveis mais elevados de FOXP3, no tecido hepático e intestinal em comparação aos grupos que receberam o tratamento com *B. clausii*. Por outro lado, o tratamento com *B. clausii*, na ausência de infecção, elevou significativamente a marcação de IL17A no tecido intestinal. Os camundongos infectados e não tratados com o *B. clausii* apresentaram razão maior de FOXP3+/IL17A que todos os grupos tratados. A marcação de IL17A+ no intestino mostrou uma correlação negativa com a IL10 nos animais do grupo G4. Nos animais G3 a IL17A no intestino apresentou correlação negativa

com IFN-gama e positiva com IL10. Por outro lado, na marcação de Foxp3 no intestino observamos correlação positiva com IL10 no grupo de animais G3. A correlação com IL10 foi negativa nos animais que G4. Em conclusão, nossos resultados demonstram que *B. clausii* tem grande potencial imunomodulatório, induziu a produção de citocinas de perfil Th1, embora também possa induzir citocinas de perfil regulatório.

Palavras chaves: probióticos; *Bacillus clausii*; *Schistosoma mansoni*; imunomodulação.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected parasitic disease characterized by a granulomatous inflammatory response against the egg deposited in the host tissue, especially in the hepatic and intestinal tissues. Currently, the treatment of schistosomiasis is based solely on the use of praziquantel (PZQ). Probiotics have been used in the treatment of gastrointestinal diseases, among others, and their mechanism is attributed to possible immunomodulatory activity. *Bacillus clausii* has been widely used as a probiotic, but there are few studies that characterize its immunomodulatory mechanisms. Thus, this study evaluates the immunomodulatory potential of *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T and SIN) and its potential as an adjuvant in the treatment of *schistosomiasis mansoni*. Mice were divided into five experimental groups, separated according to cercarial exposure and therapeutic regimen adopted: G1 (non-infected) and G2 (non-infected and treated with *B. clausii*), G3 (infected), G4 (infected and prophylactically treated) and G5 (infected and treated after oviposition). *B. clausii* was administered daily by gavage in a single dose of (1000000000 CFU/mL) in 300 μ L. After 100 days, spleens were excised and splenic cells were cultured with Enterogermin® (EG), ConA or without stimulation. Culture supernatants were used for measurement of cytokines IL12p70, IL10 and IFN-gamma by flow cytometry (CBA). Liver and intestine fragments were removed to perform the *in situ* evaluation of FOXP3 and IL17 by immunohistochemistry reaction using the immunoperoxidase system. Our results demonstrated that animals treated with *B. clausii* had significantly higher production of IL12 p70 ($p < 0.05$), as did cell cultures from infected animals stimulated with Enterogermin® (EG). In the stimulus with ConA, the group that received the *B. clausii* curatively (G5) had significantly higher levels of IFN-gamma ($p < 0.05$) than the infected animals without treatment (G3). Treatment with *B. clausii* increased IL-10 cytokine levels in animals in the treated infected group after the onset of oviposition (G5), when compared to all other groups. Infected and untreated animals (G3) had higher levels of FOXP3 in liver and intestinal tissue compared to groups that received treatment with *B. clausii*. On the other hand, treatment with *B. clausii*, in the absence of infection, significantly increased IL17A labeling in intestinal tissue. Mice infected and untreated with *B. clausii* had a higher ratio of FOXP3+/IL17A than all treated groups. The labeling of IL17A+ in the intestine showed a negative correlation with IL10 in the animals of the G4 group. In G3 animals, IL17A in the intestine showed a negative correlation with IFN-gamma and a positive correlation with IL10. On the other hand, when marking Foxp3 in the intestine, we observed a positive correlation

with IL10 in the group of G3 animals. The correlation with IL10 was negative in animals that G4. In conclusion, our results demonstrate that *B. clausii* has great immunomodulatory potential, induced the production of Th1 cytokines, although it can also induce cytokines with a regulatory profile.

Keywords: probiotics; *Bacillus clausii*; *Schistosoma mansoni*; immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição mundial da esquistossomose	19
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil	20
Figura 3 - Distribuição dos municípios segundo classificação de risco de transmissão para esquistossomose, Pernambuco.....	21
Figura 4 - Formas evolutivas do <i>S. mansoni</i>	23
Figura 5 - Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	25
Figura 6 – Resposta imune de <i>S. mansoni</i>	30
Figura 7 – Representação esquemática dos mecanismos de ação exercidos pelos probióticos	32
Figura 8 – Condições de cultivo e obtenção dos esporos de <i>B. clausii</i>	40
Figura 9 – Formação dos grupos experimentais e esquema de tratamento	41

ARTIGO

Figura 1 – Formação dos grupos experimentais e esquema de tratamento	50
Figura 2 - Níveis de citocinas IL-12P70 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C) de cultura de células esplênicas estimulados com esporos de <i>Bacillus clausii</i> ou (EG, ConA e MEIO), de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de <i>Bacillus clausii</i> (G2), camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de <i>B. clausii</i> (G4) ou infectados e tratados com esporos de <i>B. clausii</i> de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. * $p < 0.05$	54
Figura 3 - Efeito de probiótico <i>B. clausii</i> sobre níveis dos marcadores de Foxp3+ no fígado (A) e no intestino (B) e citocina IL17A no fígado (C) e IL17A no intestino (D) em análise de marcação de IHC, de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados com <i>S.</i> <i>mansoni</i> e tratados com esporos de <i>Bacillus clausii</i> (G2), camundongos infectados com <i>S.</i> <i>mansoni</i> não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de <i>B. clausii</i> (G4) ou infectados e tratados com esporos de <i>B. clausii</i> de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. Amostra de 10 campos aleatórios. Valores considerados significativos quando. * $p < 0.05$	55
Figura 4 - Grades de fotos demonstrativas, da expressão IL17 (A) e Foxp3 (B) na análise de marcação por IHC, do Controle (C) e Teste (T) de camundongos não infectados (G1),	

camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). As secções de objetiva (10x) e (40 x), cor castanho na marcação, demonstra a positividade da reação 56

Figura 5 - Razão entre a marcação de células FoxP3+ e IL17+ de camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão da área (µm.). Valores considerados significativos quando. *p<0.05..... 59

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Correlações citocinas esplênicas versus Foxp3 e IL-17 de tecidos hepáticos e intestinais de camundongos não infectados e infectados pelo <i>S. mansoni</i> submetidos ao tratamento com <i>B. clausii</i>	60
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>aaMφ</i>	Macrófagos Alternativamente Ativados
<i>Arg-1</i>	Arginase 1
<i>Anti-Ig</i>	GAnticorpo Secundário
<i>AST</i>	Alanina-Aspartato Transferase
<i>BSA</i>	Albumina de Soro Bovino
<i>CBA</i>	Cytometric Bead Array
<i>CDC</i>	Centro de Controle E Prevenções De Doença
<i>CONA</i>	Concanavalina A
<i>DAB</i>	Diaminobenzidina
<i>DC</i>	Células Dendríticas
<i>EG</i>	Enterogermina
<i>Foxp3</i>	<i>Forkhead Box P3</i>
<i>G-CSF</i>	Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias
<i>HE</i>	Hematoxilina de Harris
<i>H2O2</i>	Peróxido de hidrogênio
<i>ICAM</i>	Molécula de Adesão Intracelular 1
<i>IFN</i>	Interferon
<i>Ig</i>	Imunoglobulina
<i>IL</i>	Interleucina
<i>IHC</i>	Imunohistoquímica
<i>IPM</i>	Impulsos por Minuto
<i>iTreg</i>	Células T Regulatórias Induzidas
<i>LDH</i>	Lactato Desidrogenase
<i>MHC</i>	Complexo de Histocompatibilidade Celular
<i>MEIO</i>	Mitogênicos
<i>NK</i>	Natural Killer
<i>nTreg</i>	Células T Regulatórias Naturais
<i>OMS</i>	Organização Mundial de Saúde
<i>PBS</i>	Solução Tampão Fosfato
<i>PZQ</i>	Prazinquantel
<i>SEA</i>	Soluble Egg Antigen
<i>SII</i>	Síndrome do Intestino Irritável
<i>SFB</i>	Soro Fetal Bovino
<i>SWAP</i>	Soluble Antigen Preparation of Adult Schistosomes
<i>TGF</i>	Fator de Transformação do Crescimento Beta
<i>TNF</i>	Fator de Necrose Tumoral
<i>Treg</i>	Célula T Regulatória
<i>TSB</i>	Tryptic Soy Broth
<i>WHO</i>	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESQUISTOSSOMOSE	19
2.2	BIOLOGIA E MORFOLOGIA	22
2.3	IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	25
2.4	OS PROBIÓTICOS	30
2.4.1	Probiótico e Esquistossomose	32
2.4.2	Enterogermina® (<i>Bacillus clausii</i>)	34
3	JUSTIFICATIVA	37
4	PERGUNTA CONDUTORA	38
5	OBJETIVOS	39
5.1	OBJETIVO GERAL	39
5.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	39
6	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	40
6.1	ISOLAMENTO DE ESPOROS E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE <i>BACILLUS CLAUSII</i>	40
6.2	ANIMAIS, INFECÇÃO PELO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> E ÉTICAS	40
6.3	ANÁLISE <i>IN VIVO</i>	41
6.3.1	Formação dos grupos experimentais	41
6.4	CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO	42
6.5	DOSAGEM DE CITOCINAS	43
6.6	DETECÇÃO DE IL17 E FOXP3 POR IMUNOHISTOQUÍMICA	43
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICAS	45

7	RESULTADOS	46
7.1	ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO PARA A REVISTA <i>THE AMERICAN</i> <i>JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY</i>	46
8	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	83

1 INTRODUÇÃO

Alguns estudos avaliaram o efeito imunomodulador do probiótico Enterogermina® (*Bacillus clausii*) em modelos experimentais e clínicos nas infecções intestinais, doenças inflamatórias e alérgicas. Dar et al. (2018) observaram em Camundongos com osteoporose pós menopausa, que o tratamento com *B. clausii* aumentou células T regulatórias (CD4⁺ Foxp3⁺) e os níveis de IL-10, reduziu a frequência de células Th17 (CD4⁺ RorγT) e a produção de IL-6, IL-17 e TNF-α. Di Caro et al. (2005) avaliaram o padrão de expressão genética em pacientes com esofagite após o tratamento com *B. clausii* e foi visto um aumento na expressão de genes para IL-13, IL-1β e seu receptor e redução na expressão de genes para a citocina IL-6 e receptor de IL-15. Ciprandi et al. (2005) avaliaram em crianças com rinite alérgica, com mesmo tipo de probiótico e foi visto uma diminuição dos níveis citocina IL-4 e um aumento de IFN-γ, IL-12, TGF-β e IL-10).

A resposta regulatória se desenvolve em paralelo às respostas de perfil Th-1 e Th-2 na esquistossomose. Da mesma forma que há participação de células nTreg, a apresentação antígenos do ovo por células dendríticas (DC) induz a expressão de Foxp3⁺ em células T num processo dependente de TGF-β, além de diferenciação de células B regulatórias, ambas produtoras de IL-10 (TAYLOR et al., 2006; TURNER et al., 2011; HAEBERLEIN et al., 2017). Durante a esquistossomose as células Th17 e Treg possuem papéis fundamentais no desenvolvimento da doença. A Th17 tem sido associada a indução de patologias severas (RUTITZKY & STADECKER 2011; SHAINHEIT et al., 2011; LARKIN et al., 2012) enquanto as T regulatórias estão relacionadas no controle da formação do granuloma (SINGH et al., 2004; BAUMGART et al., 2006; TAYLOR et al., 2006).

Na esquistossomose existem estudos demonstrando o potencial terapêutico de outras espécies probióticas. Durante a infecção experimental por *S. mansoni*, Kirte et al., (1996) demonstraram que *Corynebacterium parvum* diminui o dano hepático, carga parasitária e diâmetro dos granulomas hepáticos, assim como aumenta a quimiotaxia de leucócitos. Estes resultados foram semelhantes com outros estudos, Mohamed et al. (2016), demonstrou-se *Lactobacillus sporogenes* reduziu modificação do padrão de ovoposição, além da redução dos diâmetros de granuloma no fígado e intestino e reduziu o dano no DNA provocado pela infecção. Abdel- Salam et al. (2008) apontou que, probiótico Labneh contendo alho e óleo de cebola reduziu número de ovos no fígado e no intestino e aumento no oograma os ovos mortos em camundongos infectados com *S. mansoni*. El-khadragy et al. (2019) outros probióticos e

iogurte contém duas espécies (*Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* DSM 20080) revelaram uma redução, nas contagens de números dos ovos/fígado e dos níveis de transaminases no soro em camundongos infectados com *S. mansoni*.

Em camundongos esquistossomóticos, que receberam iogurte contendo quatro espécies de probióticos (*L. casei* B-444, *L. plantarum* B-531, *L. reuteri* B-14141 e *L. acidophilus*), observou-se um aumento nos níveis de IgM após a estimulação com SWAP in vivo (GHANEM et al., 2005). No entanto, nenhum desses estudos analisam os aspectos imunológicos, fundamental para a compreensão do mecanismo de proteção dos probióticos estudados, sobre a esquistossomose.

Em trabalho de nosso grupo foi demonstrado que *B. clausii* reduziu significativamente a liberação de ovos nas fezes de camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* e tratados profilaticamente ou após início de oviposição. A redução de deposição de ovos na parede do intestino foi de 50,4% nos animais tratados profilaticamente. Neste estudo foi identificado maiores níveis de IL17 em cultura de células esplênicas de camundongos infectados experimentalmente e tratados com *B. clausii* e maior frequência de células CD4+FOXP3+ em animais que receberam apenas o *B. clausii* e em animais tratados profilaticamente e infectados com *S. mansoni*. (CRUZ, C.S 2020).

Estes resultados nos levaram a investigar a modulação destes marcadores nos tecidos dos animais submetidos a estes tratamentos. Desta forma o presente estudo investigou o efeito imunomodulatório da Enterogermina® sobre expressão de citocina do perfil Th17 (IL17A) e níveis do marcador de células T regulatórias (Foxp3+) em cortes de intestino e fígado e concentração de citocinas dos perfis Th1 (IL-12p70, IFN- γ), Th2 (IL-10) em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* cepa BH.

2 REVISÃO DA LITERATURA

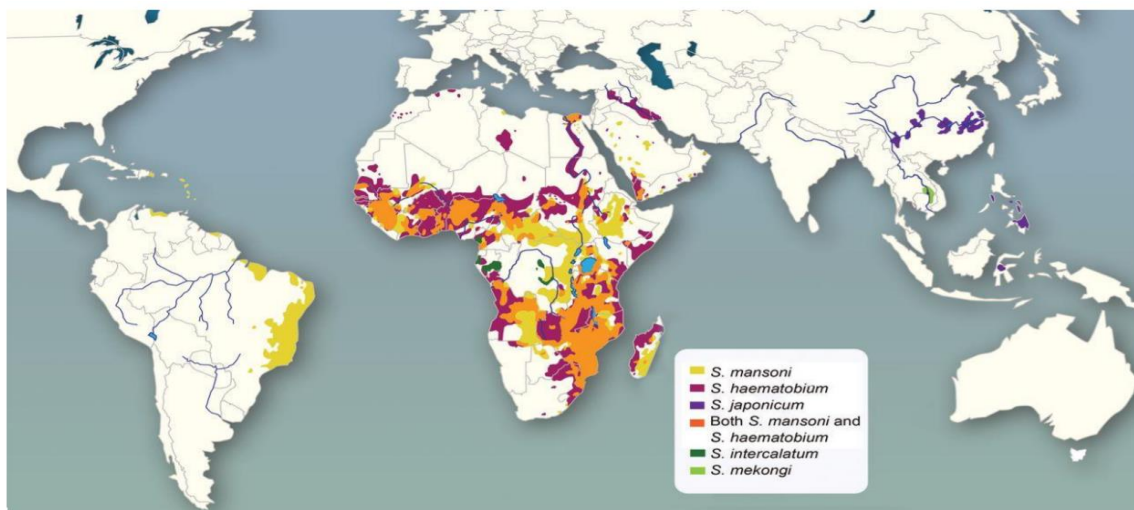
2.1 EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada por espécies de helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*. As espécies *S. mansoni*; *S. haematobium*; *S. japonicum*; *S. intercalatum* e *S. mekongi* apresentam destaque em saúde pública. Essas espécies diferem por apresentar características morfológicas peculiares, hospedeiros intermediários e distribuição geográfica diferentes, além de localização do verme adulto distinta no organismo do hospedeiro definitivo (WHO, 2019; HOTEZ et al., 2014).

A distribuição geográfica das espécies do parasito abrange 78 países, infectando mais de 252 milhões de pessoas, e aproximadamente 800 milhões vivem em áreas de risco (WEERAKOON et al., 2015, WHO, 2019). Tem prevalência em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em áreas pobres e rurais, onde as condições de saneamento e qualidade de vida são precárias (MARTINS et al., 2015).

O *S. mansoni* é a única espécie encontrada na América Latina (WEERAKOON et al., 2015). O parasito está presente em grande parte do continente Africano, desde as margens do Rio Nilo, até as florestas tropicais da República Democrática do Congo, Angola e outras nações africanas, no Oriente Médio, na América Latina (Brasil, Venezuela, Suriname), Caribe, Sudeste Asiático (compreendendo áreas da República Popular da China, Indonésia, Filipinas, Camboja, Laos etc.) a ilha francesa da Córsega e a ilha italiana de Lampedusa (WHO, 2019).

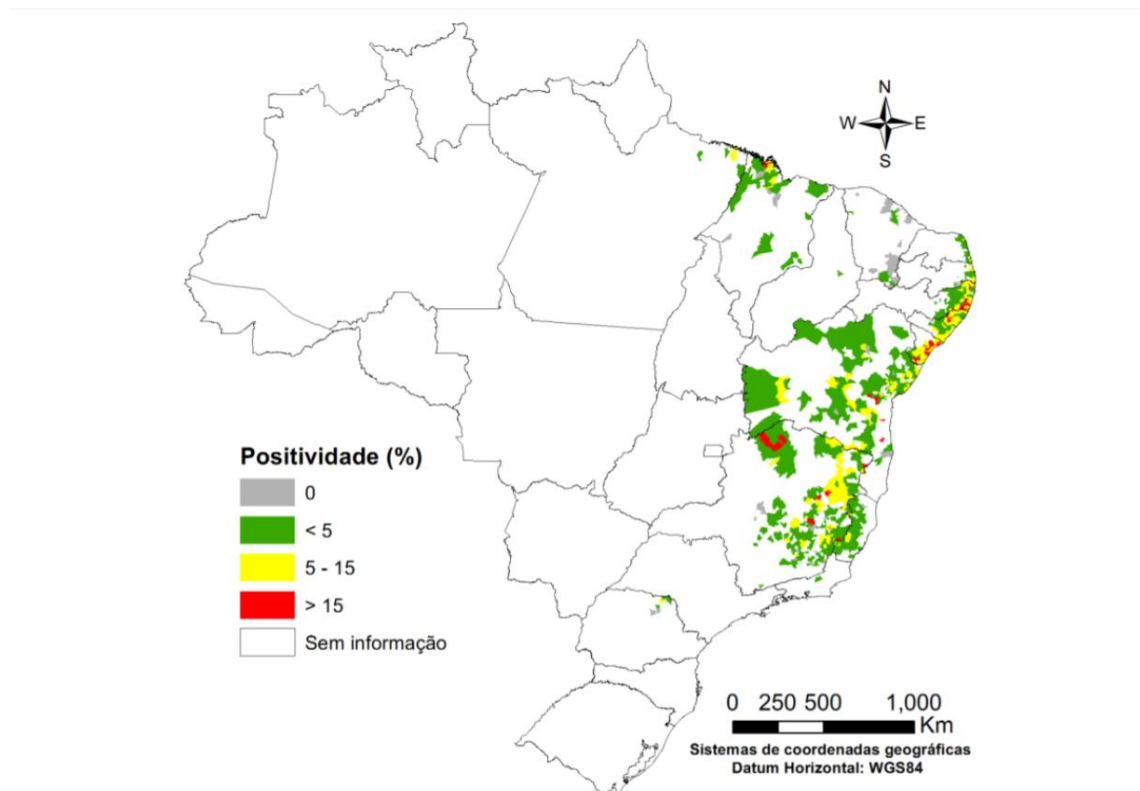
Figura 1- Distribuição Mundial da Esquistossomose



Fonte: JUNG, (2019).

Conhecida popularmente no Brasil como, xistose, barriga d'água ou mal-do-caramujo, acredita-se que o *S. mansoni* foi introduzido neste país no século XVII, com a chegada de tráfico de escravos advindos do continente africano, realizado pelo então Império Português. Aqui encontrou condições favoráveis como clima e hospedeiro intermediário (caramujos do gênero *Biomphalaria*) favoráveis e abundância de córregos, lagoas e outros ambientes aquáticos (SOUZA, 2014). Esses fatores favoreceram a infecção de trabalhadores rurais, principalmente àqueles que laboravam em canaviais. Com a queda da indústria canavieira e o fim do tráfico de escravos, ocorreu uma intensa migração para outras regiões do país, expandindo a área favorável para a infecção por *S. mansoni* (BRASIL, 2018). Atualmente o *S. mansoni* é encontrado em 19 Unidades Federadas, sendo que as áreas endêmicas compreendem os Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). As áreas focais compreendem os Estados do Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil

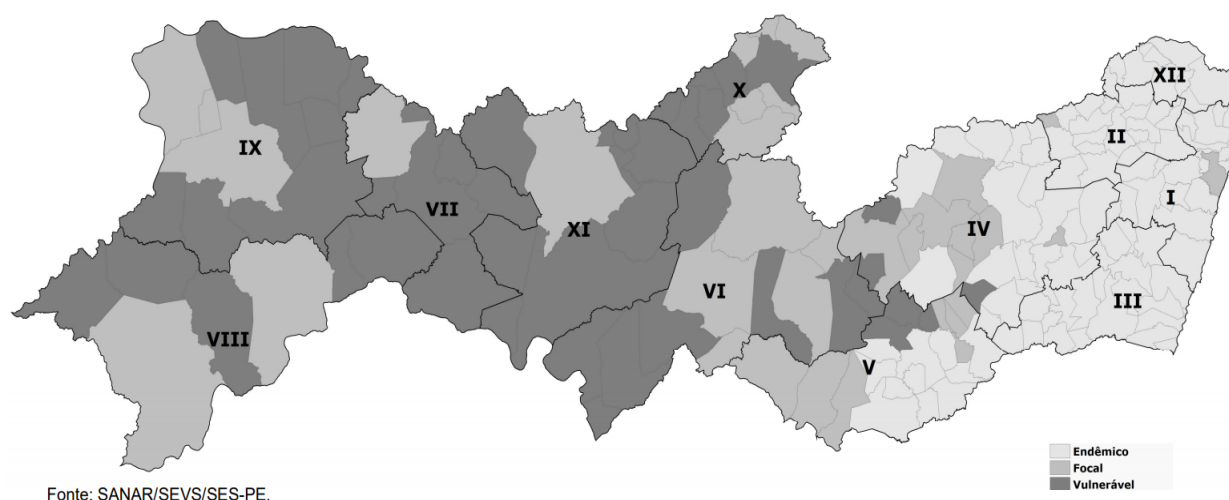


Fonte: Brasil – Ministério da Saúde (2019).

O número de casos no Brasil tem sido estimado entre 6-8 milhões variando as taxas de prevalência e incidência de estado para estado no decorrer do tempo e outras 25 milhões estão sob risco de contrair a doença. A região Nordeste é marcadamente a área mais endêmica entre os anos de 2008-2016 e foram registrados pelo Ministério da Saúde do Brasil 2.275 internações e 4.473 óbitos por esquistossomose (Brasil, 2018). Apesar do número de óbitos registrados, foi visto no mesmo período, redução no número de novos casos e modificação no quadro epidemiológico da esquistossomose no território brasileiro. A taxa de positividade da doença caiu de 5,3% no ano de 2008 para 3,4% no ano de 2016 o que representa uma redução de 35,6%; no mesmo período observou-se também redução da taxa de mortalidade, que passou de 0,29 para 0,23 óbito/1 mil habitantes, redução que corresponde a aproximadamente 19,4% (BRASIL, 2018).

Em Pernambuco, estado com uma das maiores taxas de prevalência e incidência, a área endêmica corresponde a 54,6% do estado, atingindo 101 dos 184 municípios mais o Distrito de Fernando de Noronha, os quais estão distribuídos em 06 Regionais de Saúde (I, II, III, IV, V e XII), os quais correspondem às Mesoregiões Metropolitana, Zona da Mata e parte do Agreste; 49 municípios (24,5%) vulneráveis; 35 municípios (19,0%) focais (Figura 3). Em 2016, Pernambuco registrou 3.766 novos casos de esquistossomose e cerca de 175 óbitos (PERNAMBUCO, 2018).

Figura 3 - Distribuição dos municípios segundo classificação de risco de transmissão para esquistossomose.



Fonte: Pernambuco, (2017).

2.2 BIOLOGIA E MORFOLOGIA

A morfologia e biologia do *S. mansoni* são analisados de acordo com várias fases de desenvolvimento durante o seu ciclo biológico no hospedeiro definitivo e intermediário. O parasito apresenta-se nas seguintes fases evolutivas: ovo, miracídio, esporocisto, cercaria, esquistossômulo e verme adulto.

Ovo

O ovo de *S. mansoni* (Figura 4 – A) tem formato oval e na parte mais larga apresenta um espículo voltado para trás. A presença e a localização dos espículos são cruciais para a diferenciação das espécies de helmintos do gênero *Schistosoma*. Mede aproximadamente 150 micrômetros (μm) de comprimento e 60 μm de largura. Apresentando no seu interior uma larva denominada miracídio, o qual pode ser visto devido a transparência da casca (LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

Miracídio

O miracídio (Figura 4 - B) mede aproximadamente 180 μm de comprimento por 64 μm de largura. É liberado do ovo em ambientes aquáticos e apresenta cílios para se locomover neste ambiente. Estes cílios auxiliam o miracídio na procura do hospedeiro intermediário (*Biomphalaria sp.*). Apresenta, na região anterior, uma estrutura denominada terebratorium, onde estão localizadas as terminações das glândulas adesivas e da glândula de penetração, sendo importante para a penetração no hospedeiro intermediário (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

Esporocisto

O esporocisto (Figura 4 - C) é caracterizado por se apresentar como um tubo enovelado repleto de células germinativas em multiplicação. Esta fase é imóvel. Há três tipos de esporocisto: primário, secundário e terciário (CAVALCANTI, 2008; NEVES, 2016).

Cercária

A cercária (Figura 4 - D) possui o corpo dividido em cabeça e cauda, apresenta 2 ventosas (oral e ventral), com a cauda não apresentando órgãos definidos. Na ventosa oral situam-se as terminações das glândulas de penetração, já a ventosa ventral auxiliará na sua fixação à pele do hospedeiro (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

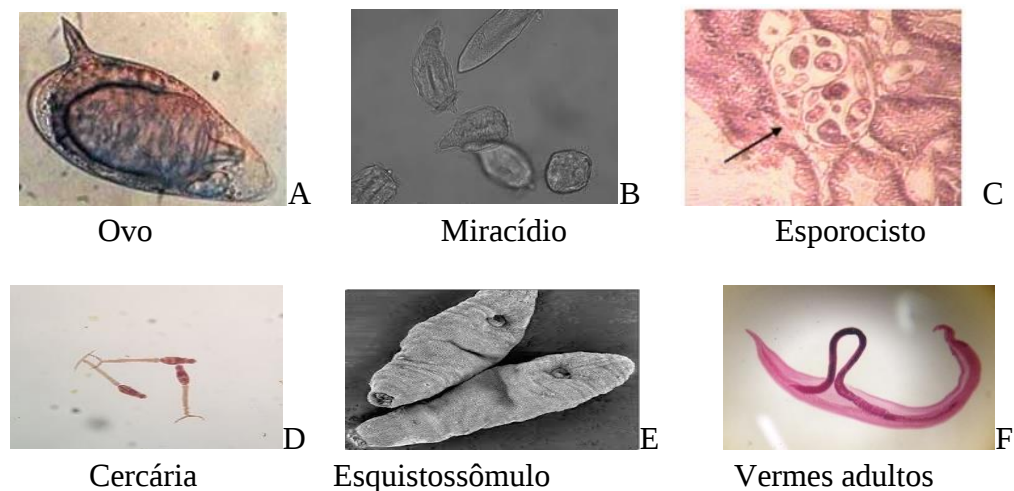
Esquistossômulo

O esquistossômulo (Figura 4 – E) representa a fase de transição de um organismo de vida livre para um organismo de vida parasitária. Algumas características presentes nos esquistossômulos e ausentes nas cercarias são ausência de cauda e glicocálix, e respiração anaeróbia. Devido à ausência de glicocálix, o esquistossômulo é mais permeável à água (LOVERDE, 2019; CAVALCANTI, 2008).

Vermes adultos

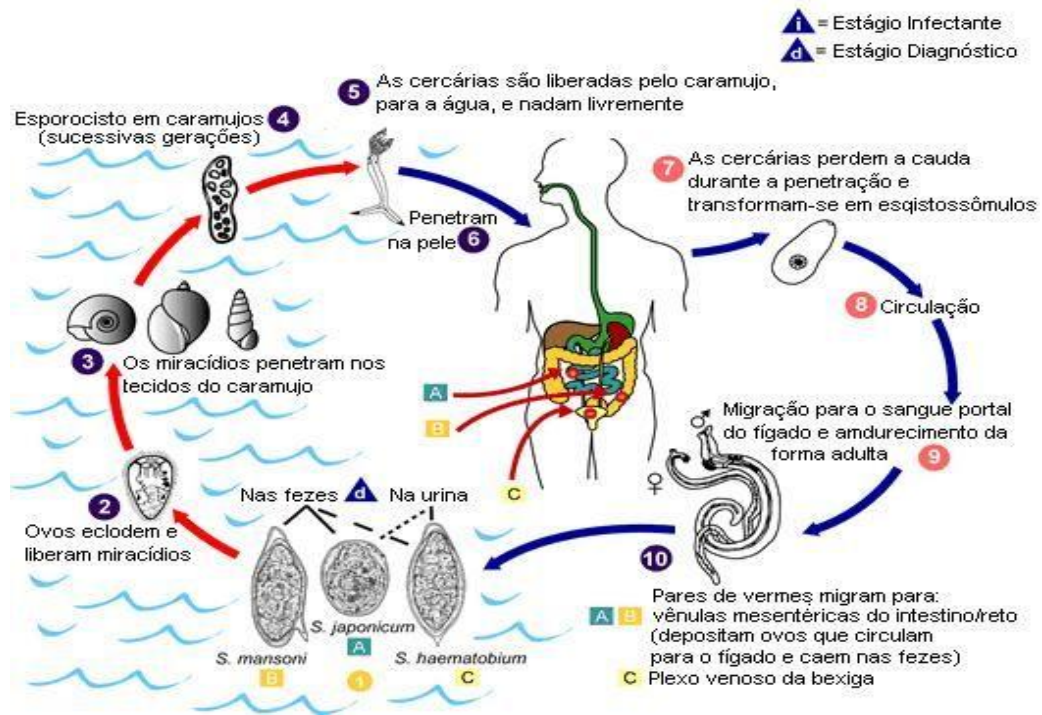
Os vermes adultos (Figura 4 – F) possuem dimorfismo sexual, ou seja, macho e fêmea são morfologicamente distintos. O macho mede cerca de 1cm de comprimento, é esbranquiçado e possui o tegumento recoberto de tubérculos (que são pequenas projeções deste tegumento). Possui 2 ventosas: oral e ventral. Além disso, uma característica marcante no macho é a presença do canal ginecóforo, que é formado quando ele se dobra para albergar a fêmea e posterior fecundação. Isto é importante devido à ausência de órgão copulador no macho, ele libera os espermatozoides dentro do canal ginecóforo, para que estes possam alcançar a fêmea. Já a fêmea mede cerca de 1,5 cm, é mais escura devido a presença de sangue semidigerido e seu tegumento é liso. Também possui 2 ventosas: oral e ventral. Na ventosa ventral estão localizadas estruturas reprodutivas como a vulva, útero e ovário. Possui ainda, na sua metade posterior, glândulas vitelínicas, que serão de crucial importância na manutenção e nutrição dos ovos (NEWMAN, 2019; LOVERDE, 2019; NEVES, 2016).

Figura 4 - Formas evolutivas do *S. mansoni*. A) ovo; B) miracídio; C) esporocisto; D) cercária; E) esquistossômulo; F) vermes adultos macho e fêmea.



Fonte: NEVES, (2016).

No Brasil, existem três espécies de caramujo capazes de serem naturalmente infectados pelo *S. mansoni*, são *B. glabrata*, *B. staminea* e *B. tenagophila* (MCMANUS et al., 2018). O ciclo de vida inicia quando os ovos eliminados junto às fezes de pessoas infectados entram em contato com a água, eclodindo e liberando miracídios, que são guiados por estímulos químicos e luminosos para penetrar no hospedeiro intermediário. Uma vez no hospedeiro intermediário, os miracídios dão origem os esporocistos. Estes sofrem modificações anatômicas, iniciando a proliferação de células germinativas e, então, a formação de cercarias. A formação completa das cercarias ocorre entre 27 a 30 dias após a penetração dos miracídios. As cercárias são liberadas sob ação de estímulos como luminosidade e temperatura e nadam em busca do seu hospedeiro definitivo. Ao encontrá-lo irão penetrar na pele e mucosas (CARVALHO, 2016; ALMEIDA, 2018). Após a penetração a cercária perde sua cauda e, a partir deste evento, passa a ser denominada como esquistossômulo. Este migrará pelo tecido subcutâneo até penetrarem em um vaso sanguíneo. Assim, serão levados aos pulmões, posteriormente ao coração, chegando através da circulação ao sistema porta, onde irão se alimentar e desenvolver, dando origem a vermes adultos machos e fêmeas. Os vermes adultos migrarão para a veia mesentérica inferior, onde acontecerá a oviposição. Os ovos são depositados ainda imaturos, ocorrendo a formação do miracídio e consequente amadurecimento dos ovos. Uma fêmea põe cerca de 400 ovos por dia, onde aproximadamente metade destes alcançam o ambiente exterior. Estes serão eliminados nas fezes, assim reiniciando o ciclo (Figura 5) (COLLEY et al., 2014; ALMEIDA, 2018; MCMANUS et al., 2018).

Figura 5 - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

Fonte: <https://www.todamateria.com.br/esquistossomose/>

2.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

O principal mecanismo da imunidade inata contra os patógenos extracelulares é a fagocitose. No entanto, organismos como os helmintos são muito grandes para serem fagocitados, sendo a exocitose (liberação do conteúdo dos grânulos para o exterior) realizada pelos fagócitos. A via alternativa do sistema complemento pode ser ativada, levando a opsonização, fagocitose, lise celular do patógeno e amplificação da inflamação (YAOCHITE, 2012).

Durante as etapas do ciclo evolutivo do *S. mansoni* nos diferentes tecidos, o helminto passa por significantes alterações morfológicas e bioquímicas que servem como “escape” contra o sistema imunológico do hospedeiro. Cada etapa desse processo suscita a ativação de complexos mecanismos imunológicos. A partir das primeiras 12 horas após a penetração das cercárias, observa-se importante reação inflamatória dérmica e subdérmica, originando a dermatite cercariana, a qual é capaz de destruir importante quantitativo de cercárias e esquistossômulos ainda na pele. Esta é a primeira “linha de defesa” contra a infecção. Esta reação inflamatória é predominantemente constituída por mononucleares e polimorfonucleares, e apresenta-se clinicamente como um exantema maculopapular pruriginoso, cujo intensidade

depende do número e duração das exposições e o estado imunológico do hospedeiro. Durante a passagem pela epiderme e derme, ocorre reação de hipersensibilidade do tipo imediata com ativação de vários componentes da resposta imune inata (SOUZA, et al., 2011).

A produção *in situ* de citocinas (IL-6, IL-12 e IL-10) e ligantes de quimiocinas (CCL-3, CCL-4 e CCL-11) são essenciais para a regulação da resposta imune inata aos esquistossômulos na pele. Este reconhecimento pelo sistema imune inato culmina na indução de respostas pró e anti-inflamatórias, mediadas tanto pela IL-6 quanto a IL-10, respectivamente (VAN DER KLEIJ et al., 2002; JENKINS et al., 2005; SOUZA, et al., 2011).

O principal elemento patogênico na esquistossomose mansônica é o ovo depositado no tecido do hospedeiro, especialmente nos tecidos hepáticos e intestinal. Nesses tecidos, antígenos secretados pelo ovo (SEA- *Soluble Egg Antigen*) induzem uma sensibilização do hospedeiro e posterior recrutamento de células inflamatória que resultam na formação de um infiltrado inflamatório granulomatoso. Essa inflamação é um processo complexo que envolve múltiplos tipos celulares com a participação de macrófagos, monócitos, fibroblastos, granulócitos e linfócitos; e proteínas denominadas citocinas, as quais são secretadas em resposta aos microrganismos e outros antígenos pelas células do sistema imune (DOS SANTOS et al., 2008).

Os linfócitos são as células da resposta imune celular, com a função de coordenar a formação do granuloma, através da produção e liberação de citocinas e anticorpos. Suas populações se diferenciam classicamente de acordo com sua função em: linfócitos B, linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺ e linfócitos T auxiliares (Th) ou CD4⁺, esses por sua vez quando ativados, subdividem-se em dois padrões principais distintos de acordo com seus fenótipos de secreção de citocinas, denominados Th1 e Th2 (STOCKINGER et al., 2006; ZHANG & BEVAN, 2011; ABBAS et al., 2017).

Os linfócitos Th1 produzem um perfil de citocinas pró-inflamatórias incluem principalmente Interleucina (IL-2), Interferon Gama (IFN- γ), e Fator de Necrose Tumoral (TNF) que induzem um processo inflamatório e ativam macrófagos e células *Natural Killer* (NK). O IFN- γ é a citocina chave deste perfil, e sua função está relacionado com a ativação de macrófagos, aumento da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), troca isotípica de imunoglobulinas nos linfócitos B e inibição da síntese de citocinas pelo perfil Th2. Os linfócitos Th2 secretam citocinas como a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, em resposta a alérgenos e infecções parasitárias. As citocinas IL-4 e IL-5, proliferação e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, enquanto que a IL-10 é conhecida

por sua função anti-inflamatória (STOCKINGER et al., 2006; ZHANG & BEVAN, 2011; ABBAS et al., 2017).

A resposta imune contra o *S. mansoni* inicia-se com a penetração da cercaria na pele e/ou mucosas dos hospedeiros, gerando uma resposta de hipersensibilidade sistêmica, acarretando numa erupção maculopapular, denominada de dermatite cercariana. Em dois dias, tal reação inflamatória constitui-se principalmente por linfócitos e neutrófilos, há produção local de quimiocinas e citocinas como TNF, IL-1 β , IL-12 e IL-6. (MCMANUS, 2018; OLIVEIRA, 2016; SOUZA, et al., 2011).

Durante a infecção por *S. mansoni* tem sido relatado que o perfil da resposta imunológica varia com o desenvolvimento dos vermes dentro do hospedeiro. Em camundongos experimentalmente infectados, a fase pré-postural, quando ocorre a migração e desenvolvimento do parasito é caracterizada por uma resposta predominantemente Th1, marcada pela elevada produção de fator necrose tumoral alfa (TNF- α), IFN- γ , IL-2, IL-6 (DUNNE & COOKE, 2005).

Com o progresso da infecção, os vermes amadurecem sexualmente e iniciam a postura de ovos (5 – 6 semanas pós-infecção), que estimulam uma mudança no perfil de resposta imune, sendo observado aumento de produção de citocinas do tipo Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13, além de ocorrer eosinofilia e produção de IgE, atingindo seu pico de intensidade por volta da oitava e nona semana de infecção (PEARCE et al., 2004; BURKE et al., 2009; HAMS et al., 2013) e consequente diminuição da resposta do tipo Th1. Esse ambiente favorece a ativação alternativa de macrófagos, os quais participam na deposição de colágeno ao redor dos granulomas, além de recrutar e ativar fibroblastos (PEARCE & MACDONALD, 2002; WYNN & BRRON, 2010; HAMS et al., 2013; SCHWARTS & FALLON, 2018). Esse predomínio da resposta Th2 é essencial para o desenvolvimento do granuloma esquistossomótico, reação celular que envolve os ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos do hospedeiro. Esse tipo de resposta é de importância para que os ovos chegam ao lúmen intestinal e alcancem o exterior, mas é a principal causa da patologia da esquistossomose nessa fase por conta de ovos retidos em tecidos (GRYSEELS et al., 2006; HAMS et al., 2013; COLLEY et al., 2014).

Estudos demonstram que a IL-13, é o principal estímulo fibrogênico na esquistossomose, após verificarem que camundongos IL-13 $^{-/-}$, apresentavam aumento na sobrevivência pós-infecção correlacionado com redução do nível de fibrose hepática. O potencial fibrogênico da IL-13 é explicado por sua capacidade de estimular fibroblastos e macrófagos alternativamente ativados

(aaMΦ) a expressar a arginase-1 (Arg-1), enzima responsável por promover a síntese do colágeno (ORIENTE et al., 2000; WILSON et al., 2007).

Por fim, a partir da 11^a/12^a semana, os granulomas periovulares são modulados devido ao aumento da resposta imune reguladora, caracterizando a fase crônica da esquistossomose. Durante essa fase, ocorre o predomínio de citocinas como IL-10 e TGF-β (transforming Growth Factor-β) (HESSE et al., 2004; DUNNE & COOKE, 2005; TURNER et al., 2011; HAMS et al., 2013) (Figura 6).

Quando não controladas, as respostas Th-1 e Th-2, iniciadas durante as duas primeiras fases da infecção, são a principal causa da patologia provocada por *S. mansoni*, podendo levar à morte. O excesso de polarização Th-1 leva à formação de granulomas não fibróticos e hepatotoxicidade exacerbada, enquanto a falta do controle de Th-2 acarreta fibrose exacerbada na fase crônica. O controle dessas respostas é mediado por IL-10, tanto de fonte de células da imunidade inata quanto adaptativa, apresentando um imprescindível no controle da morbidade da esquistossomose durante a fase crônica (HOFFMANN et al., 2000; HESSE et al., 2004).

Os linfócitos T reguladores (Treg) e suas subpopulações celulares contribuem para regulação da resposta imune no intestino. As células regulatórias podem ser divididas em células Treg naturais (nTreg) e células Treg induzíveis (iTreg). As células Treg naturais (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) se desenvolvem no timo e tem capacidade de reconhecer antígenos próprios e não-próprios e desempenhar papel importante na tolerância e estimulação crônica do sistema imune e são importantes na regulação da resposta imune no intestino (LI et al., 2015). O marcador mais específico para as nTreg é o fator de transcrição FoxP3 (*Forkhead Box P3*). As células iTreg são desenvolvidas na periferia e suas funções são relacionadas a secreção de citocinas imunossupressoras. As iTreg podem ser diferenciadas *in vitro* através do estímulo de citocinas e alguns medicamentos. As iTreg são classificadas em diferentes subtipos de células, incluindo células Tr1 (Tr1– CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) produtoras de IL-10 e células (Th3–CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) produtoras de TGF-β (HOEPPLI et al., 2015)

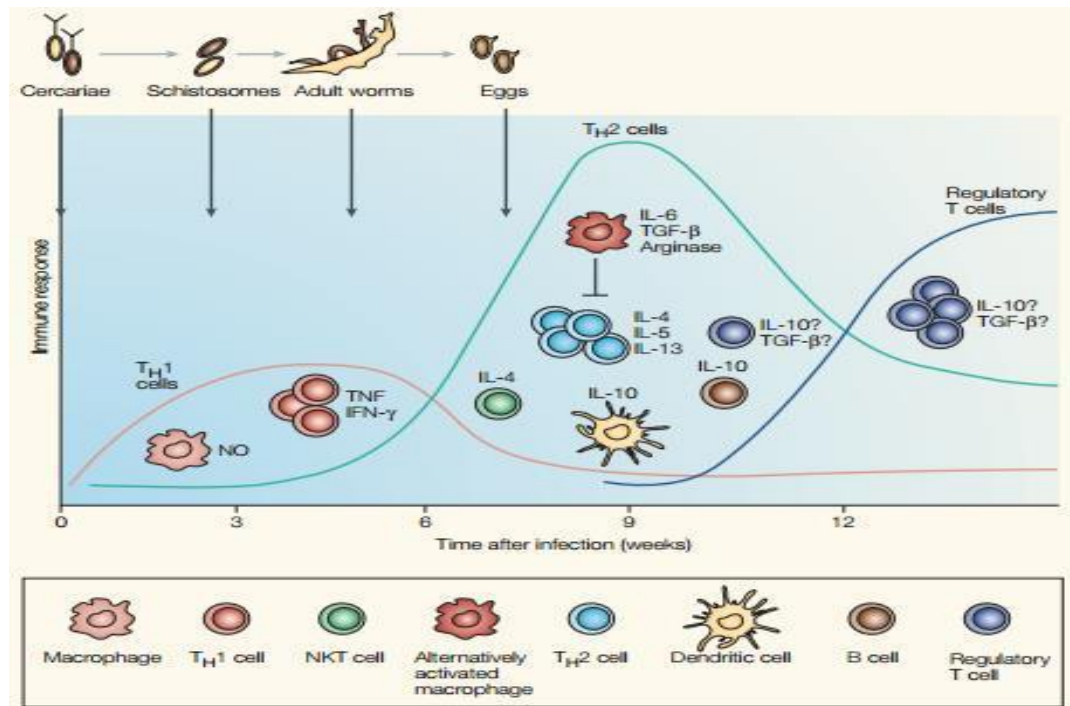
A resposta regulatória se desenvolve em paralelo às respostas de perfil Th-1 e Th-2 na esquistossomose. Da mesma forma que há participação de células nTreg, a apresentação antígenos do ovo por células dendríticas (DC) induz a expressão de Foxp3⁺ em células T num processo dependente de TGF-β, além de diferenciação de células B regulatórias, ambas produtoras de IL-10 (TAYLOR et al., 2006; TURNER et al., 2011; HAEBERLEIN et al., 2017). Estudos com animais deficientes na produção de IL-10 mostram que esta citocina pode regular a patologia por controlar a produção de citocinas Th1 e prevenir o desenvolvimento de uma

resposta tipo 2 excessiva durante a formação do granuloma (HOFFMANN et al., 2000; HESSE et al., 2004; TAYLOR et al., 2006). No estudo realizado por Baumgart et al. (2006) demonstraram que células nTreg são capazes de manter o balanço entre os perfis Th1 e Th2 por mecanismo independente da secreção de IL-10. Hesse et al. (2004) em seu estudo, demonstrou que as células Treg CD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10, estão associadas com a redução da morbidade e aumento da sobrevivência de camundongos infectados com *S. mansoni*. Outro estudo demonstrou que as Treg CD4⁺CD25⁺ possuem capacidade no controle da formação do granuloma, mecanismo crucial para proteção do hospedeiro contra formas graves da doença (SINGH et al., 2005).

O perfil Th17 é produzido a partir de células T CD4⁺ não relacionadas com as células Th1 ou Th2. O papel do perfil Th17 na imunopatologia da esquistossomose mansoni tem sido implicado no desenvolvimento de resposta granulomatosa severa. As células Th17 exercem sua potente função pró-inflamatória secretando IL-17A, interleucina que induz a molécula de adesão intracelular (ICAM 1) e secreção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF, G-CSF e GM-CSF) e quimiocinas (CXCL1, CXCL5, CCL2 e CCL7) que resultam em infiltrados inflamatórios ricos em neutrófilos e contribuem para a gravidade da infecção (IWAKURA et al., 2008; LARKIN et al., 2012).

Estudos *in vivo* demonstraram que a IL-17A está envolvida no desenvolvimento de patologias severas induzidas pelos ovos do *S. mansoni* (RUTITZKY & STADECKER, 2011; SHAINHEIT et al., 2011). Em outro estudo *in vitro*, os autores demonstraram que o bloqueio da IL-17A está implicado com a redução do tamanho de granulomas induzidos pelo o SEA do *S. mansoni* (EZZ et al., 2018).

Com base nas respostas imunes no decorrer da infecção pelo *S. mansoni* e evolução dos granulomas hepáticas, é importante o estudo da mudança do padrão imune, a fim de melhor compreender a imunopatologia.

Figura 6 - Resposta Imune de *S. mansoni*

Fonte: Dunne and Cooke (2005)

2.4 OS PROBIÓTICOS

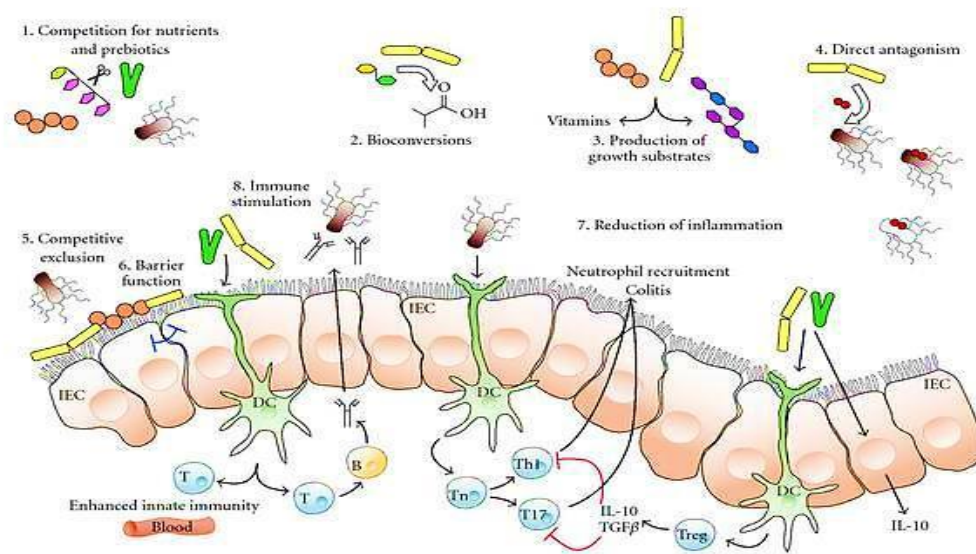
Probióticos podem ser definidos como alimentos suplementos com microrganismos vivos e que, consumidos regularmente em quantidades suficientes, devem produzir efeitos benéficos à saúde e ao bem-estar; além dos efeitos nutricionais habituais que beneficiam o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (HILL et al., 2015).

Os probióticos fazem parte dos chamados alimentos funcionais, cujo principal alvo é a mucosa intestinal e a sua microbiota, estando inclusos neste grupo o iogurte, leites fermentados e alguns biscoitos (BOOBIER; BAKER; DAVIES, 2006). Para serem considerados probióticos, os microrganismos devem obedecer a critérios de biossegurança e evidências científicas quanto ao seu benefício biológico, devem ser levados em consideração. Dentre os microrganismos mais utilizados como suplementos probióticos estão os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, pois eles têm apresentado efeito protetor no trato gastrointestinal humano. Porém leveduras como a *Saccharomyces boulardii* e certas cepas de *Escherichia coli* e espécies de *Bacillus spp*, também são utilizadas na clínica e em estudos experimentais como microrganismos probióticos (HARZALLAH & BELHADJ, 2013).

Os probióticos exercem efeitos sobre a saúde por meios de diferentes mecanismos de ação como: a) manutenção e reparo na barreira intestinal e junções intracelulares (HSIEH et al., 2015); b) modulação da microbiota via competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos (MUSIKASANG et al., 2012; FIJAN et al., 2016); c) aumento da absorção e metabolização de nutrientes como o cálcio, proteínas e ácidos graxos de cadeias curtas; d) modulação do metabolismo microbiano por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática (ALMEIDA et al., 2012; LEBLANC et al., 2017; DUBEY et al., 2018); e) estimulação do sistema imune do hospedeiro a partir do aumento da frequência de linfócitos B e níveis aumentados de imunoglobulinas (principalmente IgA); f) aumento ou diminuição da atividade de macrófagos e células dendríticas, e estimulação de células Th e Treg (DRAKES et al., 2004; FOLIGNE et al., 2007; O'MAHONY et al., 2008; KONIECZNA et al., 2012; KIM et al., 2014) (Figura 7).

Os probióticos vêm sendo pesquisados no tratamento de infecções intestinais diversas, tais como: prevenção de diarreia desencadeada por antibióticos, doença inflamatória intestinal, infecção por *Helicobacter pylori*, encefalopatia hepática, entre outras (MINGUEZ et al., 2003; KAJANDER et al., 2005; TONG et al., 2007; SPILLER et al., 2008). Os *Lactobacilos* e *Bifidobactérias* parecem ter melhores resultados na melhora dos sintomas da síndrome do intestino irritável (SII), principalmente a dor abdominal, diarreia ou constipação, isso porque esses probióticos podem alterar a fermentação colônica, estabilizando a microflora intestinal e tendo efeito imunomodulador no órgão (QUIGLEY et al., 2007; BOIRIVANTA et al., 2007). Muitos ensaios clínicos e experimentais controlados têm demonstrado a ação de probióticos na redução do crescimento, aderência dos trofozoítos e excreção de cistos de *Giardia lamblia* (VENTURA et al., 2017), redução na viabilidade, infectividade de oocistos e tempo de infecção por *Cryptosporidium spp* (FOSTER et al., 2003; GLASS et al., 2004; PICKERD & TUTHILL, 2004), redução do crescimento e aumento da liberação de cistos de *Entamoeba histolytica* (MANSOUR-GHANAIE et al., 2003; DINLEYICI et al., 2009; MOHAMED et al., 2015), redução na viabilidade de larvas de *Toxocara canis* (CHIODO et al., 2010; DE AVILA et al., 2016) e redução da carga parasitária em camundongos infectados com *Strongyloides venezuelensis* e *Trichinella spiralis* (OLIVERIA- SEQUEIRA et al., 2014; BAUTISTA-GARFIAS et al., 2001; DVOROZNAKOVA et al., 2016).

Figura 7- Representação esquemática dos mecanismos de ação exercidos pelos probióticos.



Fonte: O'Toole & Cooney, (2008).

2.4.1 Probiótico e Esquistossomose

Estudos demonstraram que alterar a composição da microbiota intestinal pode ser uma nova forma de tratar e prevenir determinadas enfermidades com impacto na saúde e bem-estar do indivíduo. Uma das formas de alteração da microbiota consiste no uso de microrganismos probióticos. Os probióticos são geralmente microrganismos vivos quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios para a saúde no hospedeiro, e podem desempenhar um papel importante na redução da patogenicidade de muitos parasitas (HILL et al., 2015). Vários estudos investigam se os probióticos poderiam controlar a proliferação de patógenos eucarióticos, seja no intestino ou em um compartimento diferente.

Kirte et al. (1996) demonstraram que camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* e tratados via intraperitoneal com *Corynebacterium parvum* em esquema profilático, apresentavam redução significativa de carga parasitária e com maior influxo de polimorfonucleares nos tecidos, embora não houvesse diferenças significativas quanto ao diâmetro e quantidade dos granulomas hepáticos e intestinais.

Abdel-Salam et al. (2008) apontaram que, probiótico labneh contendo alho e óleo de cebola reduziu número de ovos no fígado e no intestino em camundongos infectados alimentados com dieta basal (controle) e aumento no oograma os ovos mortos em camundongos infectados com *S. mansoni*. Os autores concluíram que o probiótico labneh contendo alho e óleo de cebola pode desempenhar um grande papel como alimento protetor contra doenças infecciosas como a esquistossomose. Além disso, o óleo de alho superou o óleo de cebola em seus efeitos protetores.

Santos et al. (2004) observaram que administrando *Zymomonas mobilis* em camundongos C57B1/10, infectados com *S. mansoni*, em esquemas terapêutico profilático (7 dias antes da infecção) e curativo (após 7 dias de infecção) obtiveram redução de 24 e 61% da carga de vermes. Outros autores, que estudaram o efeito imunoprofilático da administração de iogurte em camundongos *Swiss Webster* antes e após a infecção por *S. mansoni* demonstraram que a suplementação com iogurte contendo quatro espécies probióticas (*L. casei* B-444, *L. plantarum* B-531, *L. reuteri* B-14141 e *L. acidophilus*), reduziu o peso do fígado e baço e a atividade das enzimas AST, LDH e γ GT (Ghanem et al., 2005).

Mohamed et al. (2016), demonstraram que a combinação do *Lactobacillus sporogenes* 415722 com praziquantel reduziu a quantidade de ovos e vermes em camundongos CD-1 infectados com *S. mansoni*. Além disso, padrões de oograma no fígado e intestino mostraram que o tratamento com *L. sporogenes* sozinho aumenta o número de ovos mortos especialmente no intestino. A citometria de fluxo também confirmou o papel dos Lactobacilos na redução significativa dos danos do DNA de acordo com a determinação de apoptose e análise do ciclo celular

O estudo mais recente El-Khadragy et al. (2019) revelaram que a administração *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* DSM 20080 em camundongos CD-1 infectados com *S. mansoni*, reduziu a carga parasitaria e ovos retidos no tecido hepático, redução na densidade e volume do granuloma hepático e modificação no padrão de ovoposição. Também foi observado a diminuição de apoptose no tecido hepático, diminuição nos níveis de marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica, nitratos e nitritos) e aumento nos níveis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase) e glutatona reduzida.

Nosso grupo realizou o primeiro estudo, in vitro e in vivo, que explora a formulação comercial do probiótico Enterogermina® constituída de esporos de *B. clausii* cepas O/C, N/R, T e SIN como nova alternativa contra *S. mansoni* e seu papel na modulação da resposta imune.

Neste estudo não se identificou ação direta do probiótico sobre o parasita, no entanto o tratamento profilático diminuiu os parâmetros parasitológicos. Em cultura de células esplênicas observou-se redução de IL4 e aumento de IL10, bem como aumento da frequência de células CD4+FOXP3+ e TH17. (CRUZ, 2020).

2. 4. 2 Enterogermina® (*Bacillus clausii*)

Bactérias probióticas do gênero *Bacillus* possuem diversos benefícios a saúde humana (CUTTING, 2011; ELSHAGHABEE et al. 2017). Dentro desse gênero destaca-se o *Bacillus clausii* bastonete gram-positivo, aeróbio, móvel e formador de esporos comumente encontrado associado a microbiota do solo. Comercialmente o *Bacillus clausii* é conhecido como Enterogermina® (Sanofi-Aventis SpA), uma suspensão probiótica aquosa que inibe germes e outros agentes agressores do intestino em apenas uma dose. É composto por esporos de quatro cepas de *B. clausii*: O/C, N/R, T e SIM. As designações dessas cepas são derivadas de sua resistência a diversos antibióticos: O/C é resistente ao cloranfenicol, N/R resistente à novobiocina e rifampicina, T resistente à tetraciclina e SIM resistente à neomicina e estreptomicina (SENESI et al., 2001; LOPETUSO et al., 2016).

As bactérias que tem sido mais estudada e empregada como probióticas atualmente são as bactérias do ácido láctico como *Bifidobacterium spp* e *Lactobacillus spp* (LJUNGH et al., 2006; HARZALLAH et al., 2013). Entretanto probióticos do gênero *Bacillus* que são esporos estáveis ao calor têm diversas vantagens sobre outros formadores não esporos, como *Lactobacillus spp*, ou seja, que o produto pode ser armazenado à temperatura ambiente em uma forma dessecada sem qualquer efeito deletério na viabilidade. Além disso, os esporos são capazes de sobreviver à baixa pH da barreira gástrica o que não é o caso de todas as espécies de *Lactocillus* (SPINOSA et al., 2000; BARBOSA et al., 2005; TOUHY et al., 2007) portanto, em princípio, uma dose especificada de esporos pode ser armazenada indefinidamente, sem refrigeração e com toda a dose ingerida bactérias atingirão o intestino intacto (CUTTING, 2011).

Enterogermina® *B. clausii* é eficaz na promoção de uma microbiota intestinal saudável. Várias estirpes têm comprovado a eficácia dos probióticos na prevenção e tratamento da diarreia associada aos antibióticos. Em estudo recente, De Castro et al., (2019) avaliaram a eficácia do *B. clausii* como um complemento à terapia padrão em crianças filipinas com diarreia aguda. Após administração de *B. clausii* os dados mostraram uma diminuição significativa na

duração da diarreia, permanência hospitalar, e a frequência das fezes em comparação com o grupo controle. Nesta situação *B. clausii* pode representar uma opção terapêutica eficaz na diarreia aguda na infância, com um bom perfil de segurança.

Em estudo de Pradhan et al. (2018), verificou-se que o probiótico *B. clausii* conseguiu reduzir a inflamação e melhorar disbiose pelo aumento da diversidade da microbiota intestinal em camundongos BALB/c (com tendência a Th2), na diarreia induzida pela infecção por *Salmonella typhimurium*. Diante destes fatos, o uso de probióticos durante a antibioticoterapia poderia ser uma forma de evitar a ocorrência da diarreia, ou normalmente está relacionada ao desequilíbrio da microbiota intestinal. Nista et al. (2004), em seu estudo verificou-se que *B. clausii* reduziu os efeitos colaterais gastrointestinais secundários, causados pela administração de antibióticos, durante o tratamento da infecção causados por *Helicobacter pylori*.

Outro estudo verificou molécula produzida pelo *B. clausii* é a Clausina, um lantibiótico tipo A (bacteriocina classe I), que exerce efeitos antimicrobianos ao interagir com intermediários lipídicos essenciais para a biossíntese de ácidos lipotécóicos, presentes na parede celular de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium difficile* (URDACI et al., 2004; BOUHSS et al., 2009).

Os benefícios de uso de *B. clausii* são atribuídos ao seu potencial imunomodulatório. Administrando *B. clausii* Enterogermina® em Camundongos BALB/c com osteoporose pós menopausa, Dar et al. (2018) observaram que *B. clausii* aumentou significativamente as células Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) e a produção de IL-10, além de inibir simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4⁺ RorγT) e a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-17 e TNF-α. Autores mostram que após avaliarem o padrão de expressão genética em pacientes com esofagite tratados com *B. clausii*, demonstraram o papel desses probiótico em desencadear uma resposta imune do tipo Th2, com aumento na expressão de genes para IL-13, IL-1β e seu receptor e redução na expressão de genes para a citocina IL-6 e receptor de IL-15 (DI CARO et al., 2005). Outro estudo avaliou o efeito de *B. clausii* em crianças com rinite alérgica, e foi visto que o tratamento com esporos de *B. clausii* induziu uma diminuição significativa dos níveis de IL-4 e a frequência de eosinófilos e aumento significativo de IFN-γ, IL-12, TGF-β e níveis de IL-10 (CIPRANDI et al., 2005).

Um estudo realizado por Lima (2018) avaliou os efeitos do probiótico *B. clausii* sobre a inflamação e as alterações gastrintestinais no curso da mucosite intestinal em Camundongos machos Swiss induzida por 5-Fluorouracil (5-FU). Observou que administração de *B. clausii* atenuou a lesão da mucosa, revertendo à diminuição da relação vilo/cripta e do peso corporal.

Diminuiu a infiltração de neutrófilos, os níveis de malondialdeído (MDA), o consumo de glutathione reduzida (GSH), a retenção gástrica, a hipercontratilidade intestinal e o aumento da permeabilidade intestinal induzida por 5-FU.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente o tratamento da esquistossomose é baseado unicamente no uso do praziquantel (PZQ), antiparasitário que atua na remoção dos vermes adultos, mas não tem ação sobre as lesões granulomatosas, o mesmo não é capaz de diminuir os danos e a fibrose causada pelo processo inflamatório granulomatoso. Assim, faz-se necessária a busca e pesquisa de novas alternativas terapêuticas que possam atuar como adjuvante a terapia convencional no tratamento da esquistossomose a fim de reverter às lesões instaladas (Aires et al., 2012).

O efeito imunomodulador do probiótico Enterogermina® *Bacillus clausii* foi observado em estudos experimentais e clínicos de doenças inflamatórias e alérgicas. Os estudos, mostram que o *B. clausii* é capaz de diminuir citocinas e células com perfil pró-inflamatório e aumentar a frequência de células e citocinas com perfil anti-inflamatório e regulatório (DI CARO et al. 2005; DAR et al. 2018). No entanto não se tem estudos na regulação imune em infecções parasitárias.

Nosso grupo demonstrou que *B. clausii* pode atuar atenuando a infecção pelo *S. mansoni* e modular a resposta imune. O tratamento profilático ou após início de oviposição com *B. clausii* reduziu significativamente a liberação de ovos nas fezes de camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni*, embora não tenhamos identificado ação direta sobre o parasito em estudo in vitro. Neste estudo também foi determinado citocinas e a frequência CD4+FOXP3⁺ e TH17 em cultura de células esplênicas de camundongos infectados experimentalmente e tratados com *B. clausii*. (CRUZ, C.S 2020).

Estes resultados nos levaram a investigar a modulação destes marcadores nos tecidos dos animais submetidos a estes tratamentos. Desta forma o presente estudo investigou o efeito imunomodulatório da Enterogermina® sobre expressão de citocina do perfil Th17 (IL17A) e níveis do marcador de células T regulatórias (Foxp3⁺) em cortes de intestino e fígado e concentração de citocinas dos perfis Th1 (IL-12p70, IFN- γ), Th2 (IL-10) em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* cepa BH.

4 PERGUNTA CONDUTORA:

A administração oral do probiótico Enterogermina®, em esquemas profilático e/ou curativo é capaz de modular a expressão de FOXP3 e IL17A em fígado e intestino durante a esquistossomose mansoni experimental e existe correlação com a produção esplênica de citocinas IL12p70, IFN γ e IL10?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da Enterogermina® (*B. clausii* O/C, N/R, T e SIN) sob a expressão de FOXP3⁺ e IL7A em tecido hepático e intestinal e produção de citocinas esplênicas quando administrado em esquemas profilático e curativo em camundongos submetidos à infecção experimental por *S. mansoni*.

5.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

Em camundongos fêmeas não infectados ou infectados por *S. mansoni* cepa BH, submetidos à intervenção com Enterogermina® em esquemas curativo ou profilático, objetiva-se:

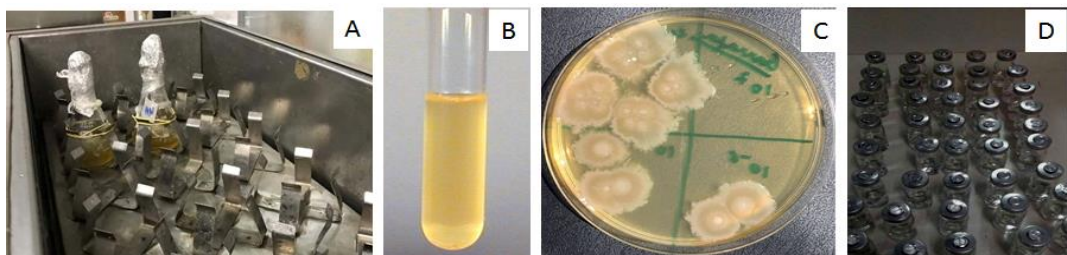
- Analisar a concentração de citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-10 em cultura de células esplênicas;
- Analisar a presença de FOXP3 e IL17A *in situ* em tecido hepático e intestinal;
- Comparar a razão de Foxp3⁺ e IL17A *in situ* em tecido fígado e intestino dos animais tratados com o *B. clausii*;
- Correlacionar a expressão dos marcadores FOXP3 e IL17A nos tecidos a produção de citocinas IL-12p70, IFN- γ e IL-10 nos grupos tratados com *B. clausii* em esquemas profilático e curativo

6 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

6.1 ISOLAMENTO DE ESPOROS E OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE *BACILLUS CLAUSII*

Para a obtenção dos esporos de *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), em um Erlenmeyer com capacidade para 1000mL foi adicionado 450 mL de meio de cultura e adicionada uma ampola do medicamento Enterogermina® (Sanofi-Aventis SpA, Milão, Itália) e posteriormente colocado em agitador automático (IPM: 155, a 35°C durante 48h) (Figura 8A). Após este período, a cultura foi então distribuída em tubos de ensaio e centrifugado para obtenção de pellets contendo esporos, que ao final foram concentrados apenas em um tubo (figura 8B). Em seguida, 0,5mL desta cultura foram diluídas seriadamente e plaqueada em ágar nutritivo (figura 8C) para padronização das Unidades Formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Concomitante a esta enumeração, os esporos também foram contados em câmara de Malassez, assim como densidade ótica da solução com os esporos foram medidas por espectrofotômetro, de forma a obter uma concentração de esporos em 10^9 esporos por mililitro. Em seguida a padronização, os esporos foram suspensos em salina estéril e fracionados em frascos de penicilina (0,5mL/frasco) (figura 8D) fechados hermeticamente e mantidos sob temperatura ambiente até a sua administração.

Figura 8 - Condições de cultivo e obtenção dos esporos de *B. clausii*.



Fonte: CRUZ, C.S (2020).

6.2 ANIMAIS, INFECÇÃO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI* E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

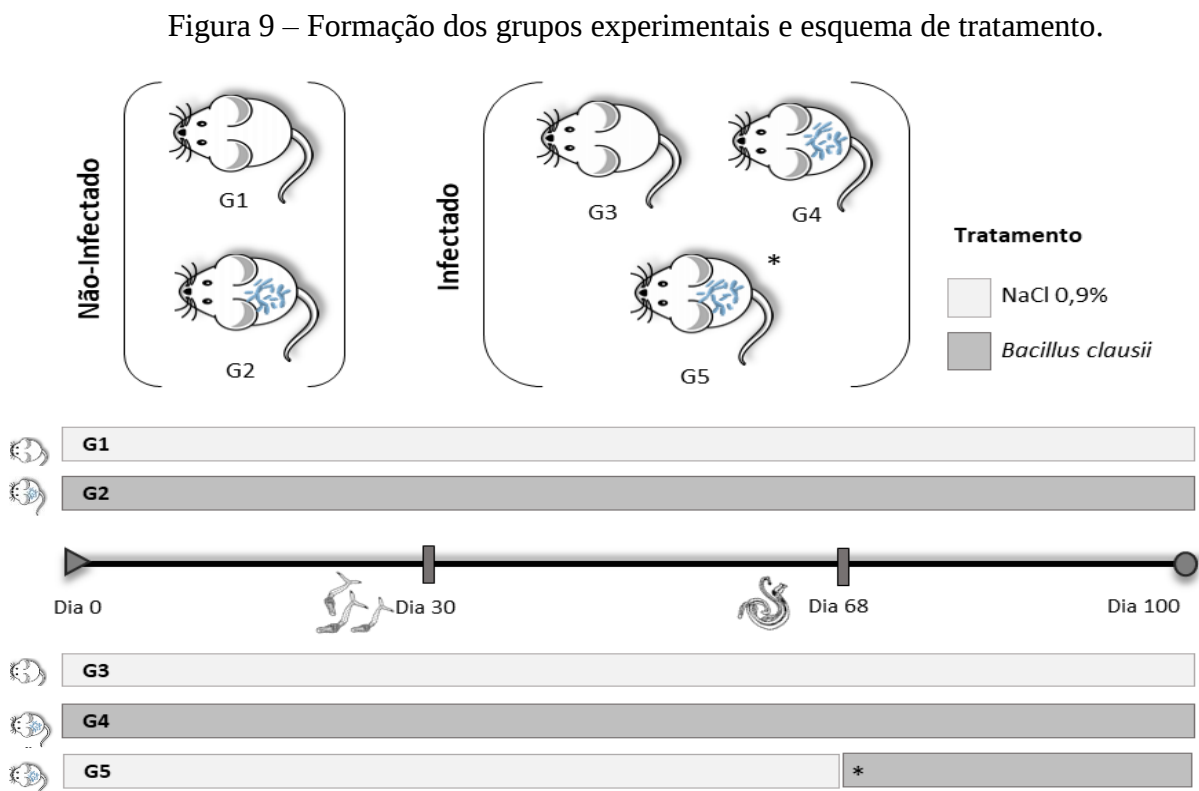
Camundongos fêmeas, *Swiss Webster*, 30 dias de idade, pesando entre 28-30g foram obtidas e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em condições padrões de criação (25°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) com acesso a ração

(Labina®/Purina, São Paulo) e água *ad libitum*. Camundongos foram infectados percutâneamente com *Schistosoma mansoni* cepa BH (Belo Horizonte – MG, Brasil). Essa cepa é mantida no setor de Imunoregulação das Doenças Infecto-parasitárias e dos Fármacos Antiparasitários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, através de passagens sucessivas em *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss Webster*. Para a análise *in vivo* 30 camundongos foram infectados com 50 cercárias e outros 20 camundongos foram mantidos livres da exposição cercariana. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (CEEAA/UFPE) sob processo de nº23076.016405/2016-57.

6.3 ANÁLISE *IN VIVO*

6.3.1 Formação dos grupos experimentais

O ensaio foi realizado durante 100° dias, sendo a exposição dos camundongos as cercarias de *S. mansoni* realizada no 30° dia de experimentação. Camundongos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos experimentais (G1-G5) com 10 animais cada, como se segue abaixo (Figura 6):



Grupos não infectados:

- G1 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1° ao 100° dia.
- G2 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1° ao 100° dia.

Grupos infectados:

- G3 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1° ao 100° dia.
- G4 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1° ao 100° dia.
- G5 – Camundongos que receberam solução salina do 1° até 67° dia, em seguida passaram a serem tratados com esporos de *B. clausii* do 68° dia (38° dia de infecção, início da ovoposição pelo *S. mansoni*) até o 100° dia.

B. clausii foi administrado diariamente por gavagem em dose única de 10^9 UFC/mL em 300 μ L. Esta dose foi determinada com base na concentração da formulação Enterogermina®. A intervenção com solução salina foi por gavagem em volume de 300 μ L.

6.4 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Após 100 dias, os baços foram excisados em condições estéreis e macerados individualmente com auxílio de um êmbolo em placas de vidro contendo 2 mL de meio de lavagem (meio RPMI 1640) para obtenção da suspensão de células esplênicas. As suspensões de células esplênicas, foram lavadas em meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 g por 10 min e 4°C. Hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, por 20 segundos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF) acrescido de 1% de penicilina e estreptomicina, 0,5mM de L-glutamina (1%). A contagem de células e o teste de viabilidade celular foram determinados com auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%.

Os esplenócitos, foram então cultivados em tubos de polipropileno na concentração final de 5×10^6 células/mL e incubados em estufa por 48h a 37°C com CO₂ a 5%. As culturas foram mantidas sob ausência de estímulos mitogênicos, estimuladas com Concanavalina A (5 μ g/mL)

ou com *Bacillus clausii* (5×10^6 esporos/mL). Após 48h os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para dosagem dos níveis de citocinas.

6.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Para determinação da concentração das citocinas IL-10, IL-12p70, IFN- γ , os sobrenadantes das diferentes culturas foram submetidos a dosagem por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur. O procedimento para dosagem das citocinas, foi realizado de acordo com as especificações do fabricante para o kit Cytometric Bead Arrayn(CBA) Mouse Inflammation. O Software BD CellQuest™ foi utilizado para aquisição das amostras e as análises foram realizadas através das análises foram realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson).

Após 24 horas de cultivo foram adicionados a cada tubo, contendo as suspensões de células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos, 5 μL de Golgi Stop (para cada 5×10^6 células), agitados em vórtex e devolvidas a estufa de CO_2 a 37°C por um intervalo de quatro horas. Passado este período de incubação, as células foram lavadas com 6,0 mL de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado, em seguida agitadas em vórtex e centrifugadas a 400 g por 10 minutos sob a temperatura de 4°C . A marcação das células foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (Citômetro BD FACSCalibur). A aquisição e análise das amostras foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães -CPqAM/FIOCRUZ. As análises serão realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson)

6.6 DETECÇÃO DE IL-17 e FOXP3 POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Para detecção imunohistoquímica (IHC) de antígenos nos tecidos, foi feita a IHC indireta que abrange um anticorpo primário não-conjugado e um anticorpo secundário. Quanto aos anticorpos primários, para detecção de IL-17A, foi usado o anti-*IL17A polyclonal antibody* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), para detecção de FOXP3, foi usado o anti-*FOXP3 recombinant rabbit monoclonal antibody* (Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

O anticorpo secundário empregado foi o **kit Histotain®-SP Broad Spectrum (HRP) Invitrogen™ (Novex by Life Technologies, USA)** e HRP – Streptavidin foi o kit Histostain® - SP, Broad Spectrum – (HRP) Invitrogen™. Foi utilizado cromógeno DAB (3, 3-diaminobenzidina tetracloridrato) e o substrato DAB novolink™ novocastro (Leica, Biosystems). Foi utilizado fragmentos de tecidos hepáticos e intestinais de camundongos de grupos não infectados e infectados. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura das amostras parafinizadas e colocados em lâminas para posterior análise.

As amostras submetidas a IHC, inicialmente foram submetidas a desparafinizações com Xilol, 5 minutos cada. Seguido da hidratação com álcool etílico decrescente absoluto à 70%, cinco minutos cada. E por fim, submersos em água destilada, três vezes;

Após esse processo, para recuperação antigênica as amostras foram colocadas em tampão citrato a 10mµ, pH 6, três ciclos de três minutos cada em microondas com potência mínima. Após esse tempo, as lâminas foram silanizadas amostras foram lavadas três vezes em PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20, durante 5 minutos cada lavagem; após isso, 100 µl de PBS BSA a 1% (Solução Tampão Fosfato/Albumina de Soro Bovino) foi colocado sobre as lâminas para o Bloqueio de sítios inespecíficos; incubado durante 30 minutos em câmara úmida. Seguida de três lavagens com PBS Tween; Foi colocado o anticorpo primário (anti-IL-17A) diluição de 1µg/mL (anti-FOXP3) diluição de 1:20 em solução tamponada de PBS-BSA 1% e dessa solução, foram adicionados 100 µl nas amostras teste e nas amostras controle, incubadas em câmara úmida na geladeira por 14 – 16 horas (overnight) a 4°C. Seguida de três lavagens com PBS Tween; Após a lavagem, o consumo de peroxidase endógena foi realizado por meio da incubação com 100 µl de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 5% em metanol por 45 minutos. Seguida de três lavagens com PBS Tween; Em seguida adicionado o anticorpo secundário (Anti-IgG), diluição de 1:100, durante 30 minutos seguido do HRP – Streptavidin por 30 minutos. Seguida de três lavagens com PBS Tween. A reação foi revelada com cromógeno DAB, 5 minutos e nesse tempo as lâminas foram incubadas protegidas da luz. Após esse procedimento as lâminas foram contracorados com hematoxilina de Harris (HE) 2 minutos.

Em seguida as lâminas foram desidratadas com álcool etílico crescente 70% à absoluto 5 minutos cada. Seguida da diafanização em xilol durante 5 minutos cada. E por fim a montagem usando Entellan®, e todas as imagens foram capturadas através de câmera (Moticam 2300) acoplada a microscópio óptico (Nikon), utilizando-se a objetiva de 40x, as imagens foram processadas em ImageJ (NIH) para quantificar a área marcada. O valor médio expressado em µm da área marcada nos 10 campos, a calibração utilizada foi 15,38 pxl/µm. Esses valores

foram obtidos através da segmentação automática (RenyiEntropy) como método de pré-processamento e logo após foram delimitadas as regiões de interesse a partir da segmentação.

Toda metodologia foi realizada de acordo com as normas dos fabricantes e protocolo da unicamp (Rocha et al., 2018). Os ensaios foram realizados no setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) e no Laboratório de Parasitologia/Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCM-UFPE).

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados através da comparação entre os diferentes grupos de animais utilizando-se o teste para dados não paramétricos Kruskal-Wallis seguida pela Correlação de Spearman e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp) e foram considerados significativos valores de (* $p < 0.05$).

7 RESULTADOS

7.1 ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO PARA A REVISTA *THE AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*

Avaliação *in situ* de FOXP3+ E IL17 em fígado e intestino de camundongos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* e tratados com *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN)

Resumo

Os probióticos têm sido usados no tratamento de doenças gastrointestinais entre outras e seu mecanismo atribuído a possível atividade imunomodulatória. O *Bacillus clausii* tem sido usado amplamente como probiótico mais existem poucos estudos que caracterizam seus mecanismos imunomodulatórios. Desta forma este estudo vem avaliar o potencial imunomodulatório do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) e seu potencial como adjuvante no tratamento da esquistossomose mansônica. Camundongos foram distribuídos em cinco grupos experimentais, separados de acordo com exposição cercariana e esquema terapêutico adotado: G1(não infectado) e G2 (tratado), G3 (infectado), G4 (infectado e tratado profilaticamente) e G5 (infectado e tratado após oviposição). Foram dosadas as citocinas IL12p70, IL10 e IFN γ em sobrenadante de cultura esplênica com estímulo de Enterogermina® (EG), ConA ou sem estímulo por citometria de fluxo. Nos animais dos grupos experimentais foi realizada a avaliação *in situ* de FOXP3+ E IL17 em fígado e intestino por reação de imunohistoquímica utilizado o sistema imunoperoxidase. Nossos resultados demonstraram que animais tratados com *B. clausii* apresentaram produção significativamente mais elevada de IL12 p70 ($p<0,05$), assim como as culturas de células de animais infectados estimulados com Enterogermina® (EG). No estímulo com ConA, o grupo que recebeu o *B. clausii* curativamente (G5) apresentou níveis significativamente maior de IFN γ ($p<0,05$) que os animais infectados sem tratamento (G3). O tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de citocina IL-10 nos animais do grupo infectado tratado após início da oviposição (G5), quando comparado a todos os demais grupos. Os animais infectados e não tratados (G3) apresentaram níveis mais elevados de FOXP3, no tecido hepático e intestinal em comparação aos grupos que receberam o tratamento com *B. clausii*. Por outro lado, o tratamento com *B. clausii*, na ausência de infecção, elevou significativamente a marcação de IL17A no tecido intestinal. Os camundongos infectados e não tratados com o *B. clausii* apresentaram razão maior de FOXP3+/IL17A que todos os grupos tratados. Em conclusão, nossos resultados demonstram que *B. clausii* tem grande potencial

imunomodulatório, induziu a produção de citocinas de perfil Th1, embora também possa induzir citocinas de perfil regulatório.

Palavras chaves: Probióticos; *Bacillus clausii*; *Schistosoma mansoni*; Imunomodulação.

1.Introdução

Os probióticos podem ser definidos como alimentos suplementos com microrganismos vivos e que, consumidos regularmente em quantidades suficientes, devem produzir efeitos benéficos à saúde e ao bem-estar; além dos efeitos nutricionais habituais que beneficiam o hospedeiro por meio da melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal (HILL et al., 2015).

Os probióticos exercem efeitos sobre a saúde por meios de diferentes mecanismos de ação como: a) manutenção e reparo na barreira intestinal e junções intracelulares (HSIEH et al., 2015); b) modulação da microbiota via competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos (MUSIKASANG et al., 2012; FIJAN et al., 2016); c) aumento da absorção e metabolização de nutrientes como o cálcio, proteínas e ácidos graxos de cadeias curtas; d) modulação do metabolismo microbiano por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática (ALMEIDA et al., 2012; LEBLANC et al., 2017; DUBEY et al., 2018); e) estimulação do sistema imune do hospedeiro a partir do aumento da frequência de linfócitos B e níveis aumentados de imunoglobulinas (principalmente IgA); f) aumento ou diminuição da atividade de macrófagos e células dendríticas, e estimulação de células Th e Treg (DRAKES et al., 2004; FOLIGNE et al., 2007; O'MAHONY et al., 2008; KONIECZNA et al., 2012; KIM et al., 2014).

Bactérias probióticas do gênero *Bacillus* possuem diversos benefícios a saúde humana (CUTTING, 2011; ELSHAGHABEE et al. 2017). Dentro desse gênero destaca-se o *Bacillus clausii* bastonete gram-positivo, aeróbio, móvel e formador de esporos comumente encontrado associado a microbiota do solo.

Os benefícios de uso de *B. clausii* são atribuídos a sua atividade antimicrobiana (Urdaci et al. 2004), prevenção da diarreia associada ao uso de antibióticos (Nista et al. 2004) e na melhora da disbiose intestinal (Pradhan et al. 2018). Os benefícios de uso de *B. clausii* também são atribuídos ao seu potencial imunomodulatório. Pacientes com esofagite tratados com *B. clausii*, demonstraram o aumento na expressão de genes para IL-13, IL-1 β e seu receptor e

redução na expressão de genes para a citocina IL-6 e receptor de IL-15 (DI CARO et al., 2005). Outro estudo demonstrou em crianças com rinite alérgica, que o tratamento com *B. clausii* diminui os níveis de IL-4 e a frequência de eosinófilos e aumentou a produção de IFN- γ , IL-12, TGF- β e IL-10 (CIPRANDI et al., 2005). Também foi visto em Camundongos BALB/c com osteoporose pós menopausa, queo tratamento com *B. clausii* aumentou frequência de células Treg (CD4+ Foxp3+) e a produção de IL-10, além de inibir simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4+ Ror γ T) e a produção de citocinas IL-6, IL-17 e TNF- α (DAR et al., 2018).

Na esquistossomose existem estudos demonstrando o potencial terapêutico de outras espécies probióticas. Durante a infecção experimental por *S. mansoni*, Kirte et al., (1996) demonstraram que *Corynebacterium parvum* diminui o dano hepático, carga parasitária e diâmetro dos granulomas hepáticos, assim como aumenta a quimiotaxia de leucócitos. Estes resultados foram semelhantes com outros estudos, Mohamed et al. (2016), demonstrou-se *Lactobacillus sporogenes* reduziu modificação do padrão de ovoposição, além da redução dos diâmetros de granuloma no fígado e intestino e reduziu o dano no DNA provocado pela infecção.

Em camundongos esquistossomóticos, que receberam iogurte contendo quatro espécies de probióticos (*L. casei* B-444, *L. plantarum* B-531, *L. reuteri* B-14141 e *L. acidophilus*), observou-se um aumento nos níveis de IgM após a estimulação com SWAP in vivo (GHANEM et al., 2005). No entanto, nenhum desses estudos analisam os aspectos imunológicos, fundamental para a compreensão do mecanismo de proteção dos probióticos estudados, sobre a esquistossomose.

Em trabalho de nosso grupo foi demonstrado que *B. clausii* reduziu significativamente a liberação de ovos nas fezes de camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* e tratados profilaticamente ou após início de oviposição. A redução de deposição de ovos na parede do intestino foi de 50,4% nos animais tratados profilaticamente. Neste estudo foi identificado maiores níveis de IL17 em cultura de células esplênicas de camundongos infectados experimentalmente e tratados com *B. clausii* e maior frequência de células CD4+FOXP3+ em animais que receberam apenas o *B. clausii* e em animais tratados profilaticamente e infectados com *S. mansoni*. (CRUZ, C.S 2020).

Estes resultados nos levaram a investigar a modulação destes marcadores nos tecidos dos animais submetidos a estes tratamentos. Desta forma o presente estudo investigou o efeito imunomodulatório da Enterogermina® sobre expressão de citocina do perfil Th17 (IL17A) e níveis do marcador de células T regulatórias (Foxp3+) em cortes de intestino e fígado e

concentração de citocinas dos perfis Th1 (IL-12p70, IFN- γ), Th2 (IL-10) em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* cepa BH.

2. Matérias e Métodos

2.1 Isolamento de esporos e obtenção do sobrenadante de *Bacillus clausii*

Esporos de *B. clausii* (cepas O/C, N/R, T e SIN), foram obtidos do Enterogermina[®] (Sanofi-Aventis SpA, Milão, Itália). Resumidamente, a solução de uma ampola de Enterogermina[®] (5mL/10⁹ esporos) foi adicionada à 450 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB – Hemocult I) e incubada em agitador automático (150 IPM) a 35°C por 72h. Em seguida a cultura foi centrifugada (4000g por 30 min) e os esporos ressuspensos em solução salina estéril e plaqueados em ágar nutritivo para padronização das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), de forma a obter concentração final de 10⁹ esporos/mL. As soluções de esporos foram mantidas em frascos individuais de 5 mL hermeticamente fechados, em temperatura ambiente até administração.

2.2 Animais, infecção pelo *Schistosoma mansoni* e considerações éticas

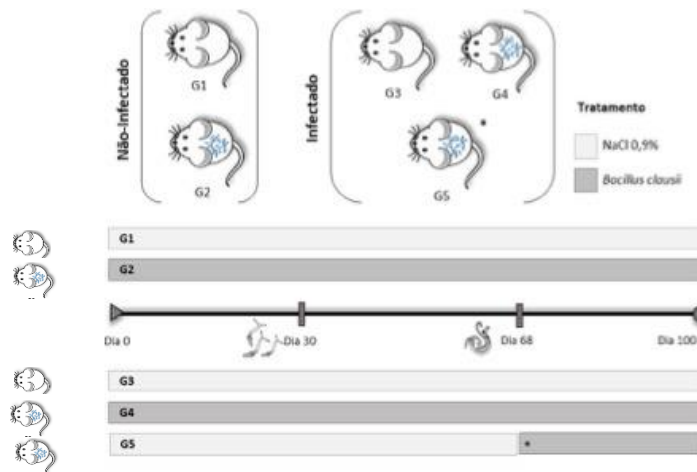
Camundongos fêmeas, Swiss Webster, 30 dias de idade, pesando entre 28-30g foram obtidas e mantidas no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami em condições padrões de criação (25°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro) com acesso a ração (Labina[®]/Purina, São Paulo) e água *ad libitum*. Camundongos foram infectados percutaneamente com *Schistosoma mansoni* cepa BH (Belo Horizonte – MG, Brasil). Essa cepa é mantida no setor de Imunoregulação das Doenças Infecto-parasitárias e dos Fármacos Antiparasitários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, através de passagens sucessivas em *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss Webster. Para a análise, 30 camundongos foram infectados com 50 cercárias e outros 20 camundongos foram mantidos livres da exposição cercariana. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (CEEA/UFPE) sob processo de nº23076.016405/2016-57.

2.3 Formação dos grupos experimentais

O ensaio foi realizado durante 100° dias, sendo a exposição dos camundongos as cercarias de *S. mansoni* realizada no 30° dia de experimentação. Camundongos foram distribuídos

aleatoriamente em cinco grupos experimentais (G1-G5) com 10 animais cada, como se segue abaixo:

Figura 1-formação dos grupos experimentais e esquema de tratamento



Fonte: CRUZ, C.S (2020).

Grupos não infectados:

- G1 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1° ao 100° dia.
- G2 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1° ao 100° dia.

Grupos infectados:

- G3 – Camundongos que receberam solução salina (NaCl, 0,9% w/v) do 1° ao 100° dia.
- G4 – Camundongos tratados com esporos do *B. clausii* do 1° ao 100° dia.
- G5 – Camundongos que receberam solução salina do 1° até 67° dia, em seguida passaram a serem tratados com esporos de *B. clausii* do 68° dia (38° dia de infecção, início da ovoposição pelo *S. mansoni*) até o 100° dia.

B. clausii foi administrado diariamente por gavagem em dose única de 10^9 UFC/mL em 300 μ L. Esta dose foi determinada com base na concentração da formulação Enterogermina®. A intervenção com solução salina foi por gavagem em volume de 300 μ L.

2.4 Cultura de células esplênicas para ensaios de citometria de fluxo

Após 100 dias, os baços foram excisados em condições estéreis e macerados individualmente com auxílio de um êmbolo em placas de vidro contendo 2 mL de meio de lavagem (meio RPMI 1640) para obtenção da suspensão de células esplênicas. As suspensões de células esplênicas, foram lavadas em meio RPMI 1640 e centrifugadas a 400 g por 10 min e 4°C. Hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, por 20 segundos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF) acrescido de 1% de penicilina e estreptomicina, 0,5mM de L-glutamina (1%). A contagem de células e o teste de viabilidade celular foram determinados com auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%.

Os esplenócitos, foram então cultivados em tubos de polipropileno na concentração final de 5×10^6 células/mL e incubados em estufa por 48h a 37°C com CO₂ a 5%. As culturas foram mantidas sob ausência de estímulos, estimuladas com Concanavalina A (5 µg/mL) ou com *Bacillus clausii* (EG) (5×10^6 esporos/mL). Após 48h os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C para dosagem dos níveis de citocinas.

2.5 Dosagem de citocinas

Para determinação da concentração das citocinas IL-10, IL-12p70, IFN- γ , os sobrenadantes das diferentes culturas foram submetidos a dosagem por Cytometric Bead Array (CBA) utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur. O procedimento para dosagem das citocinas, foi realizado de acordo com as especificações do fabricante para o kit Cytometric Bead Arrayn (CBA) Mouse Inflammation. O Software BD CellQuest™ foi utilizado para aquisição das amostras e as análises foram realizadas através do As análises foram realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson)

2.6 Detecção de IL17 e Foxp3 por imunohistoquímica

Para detecção imunohistoquímica (IHC) foi utilizado fragmentos de tecidos hepáticos e intestinais de camundongos de grupos não infectados e infectados. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura das amostras parafinizadas e colocados em lâminas para posterior análise. As amostras foram submetidas a desparafinizações com Xilol, 5 minutos cada. Seguido da hidratação com álcool etílico decrescente absoluto à 70%, cinco minutos cada. E por fim, submersos em água destilada, três vezes; para recuperação antigênica foram colocadas em tampão citrato a 10mµ, pH 6, três ciclos de três minutos cada em microondas com potência mínima. Após esse tempo, as lâminas foram sinalizadas e amostras foram lavadas três vezes

em PBS 0,05 M +0,2% TWEEN 20, durante 5 minutos cada lavagem; para o Bloqueio de sítios inespecíficos foi colocado 100 µl de PBS BSA a 1% (Solução Tampão Fosfato/Soro Bovino) sobre as lâminas; incubado durante 30 minutos em câmara úmida. Seguida de três lavagens com PBS Tween; foi colocado o anticorpo primário (anti-IL-17A) diluição de 1 µg/mL (anti-FOXP3) diluição de 1:20 em solução tamponada de PBS-BSA 1% e incubadas em câmara úmida na geladeira por 14 – 16 horas (overnight) a 4°C. Seguida de três lavagens com PBS Tween; Após a lavagem, o consumo de peroxidase endógena foi realizado por meio da incubação com 100 µl de H₂O₂ 5% em metanol por 45 minutos. Seguida de três lavagens com PBS Tween; Em seguida adicionado o anticorpo secundário (Anti-IgG), diluição de 1:100, durante 30 minutos seguido do HRP – Streptavidin por 30 minutos. Seguida de três lavagens com PBS Tween. A reação foi revelada com cromógeno DAB (diaminobenzidina), 5 minutos e nesse tempo as lâminas foram incubadas protegidas da luz. Após esse procedimento as lâminas foram contracorados com hematoxilina de Harris (HE) 2 minutos.

Em seguida as lâminas foram desidratadas com álcool etílico crescente 70% à absoluto 5 minutos cada. Seguida da diafanização em xilol durante 5 minutos cada. E por fim a montagem usando Entellan®, e todas as imagens foram capturadas através de câmera (Moticam 2300) acoplada a microscópio óptico (Nikon), utilizando-se a objetiva de 40x, as imagens foram processadas em ImageJ (NIH) para quantificar a área marcada (µm).

Toda metodologia foi realizada de acordo com as normas dos fabricantes e protocolo da Unicamp (Rocha et al., 2018). Os ensaios foram realizados no setor de Imunologia do Instituto de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) e no Laboratório de Parasitologia/Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCM-UFPE).

2.7 Análise estatísticas

Os resultados foram analisados através da comparação entre os diferentes grupos de animais utilizando-se o teste para dados não paramétricos Kruskal-Wallis seguida pela Correlação de Spearman e foram expressos como média ± desvio padrão (DP). O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp) e foram considerados significativos valores de (*p< 0.05).

3. Resultados

3.1 Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células esplênicas

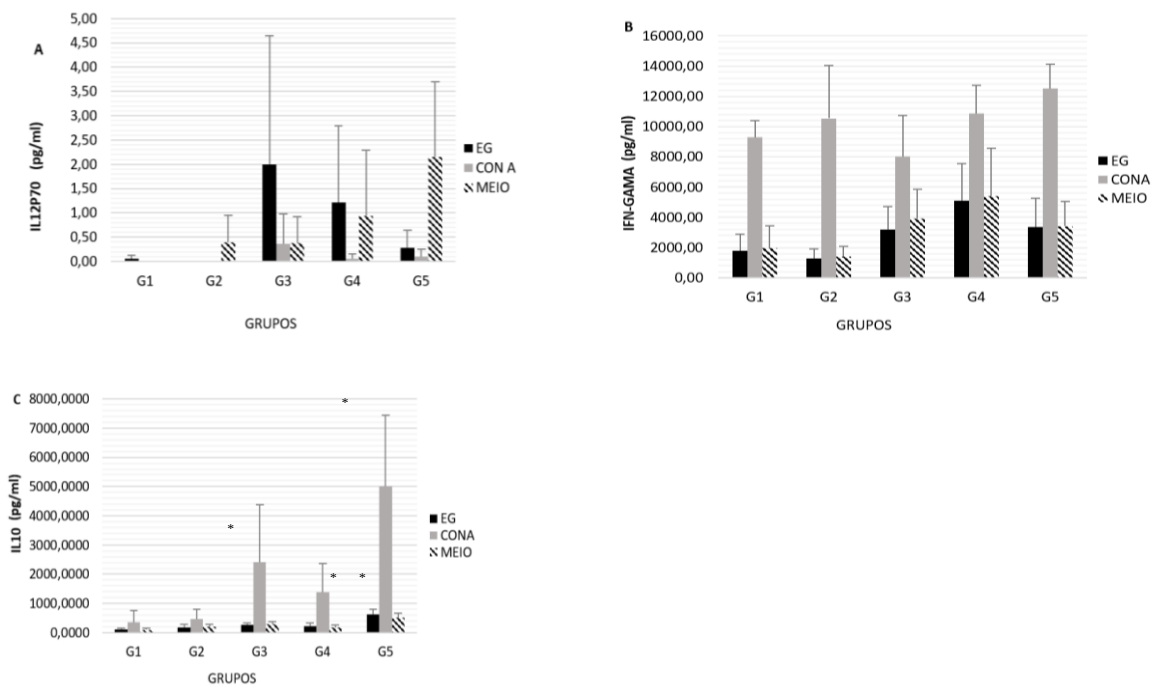
Nas culturas não estimulada a produção de IL12p70 foi significativamente maior nos animais infectados que receberam o tratamento com *B. clausii* no esquema curativo (G5) em comparação todos os demais grupos. Nas culturas estimuladas com EG a IL12p70 estava significativamente aumentada nos grupos infectados (G3) e tratados profilaticamente (G4) em comparação com os animais sem infecção (* $p < 0.05$) (Figura 2 A). Não houve diferenças significativas entre os grupos nas culturas estimuladas com o mitógeno ConA.

Nas culturas estimuladas com EG, foi visto que os animais dos grupos infectados tratados com *B. clausii* (G4 e G5) e animais infectados e não tratados produziram níveis significativamente maior de IFN- γ em comparação aos animais não infectados que receberam apenas o *B. clausii* (G2).

Os animais sem infecção ou tratamento (G1) apresentaram níveis inferiores de IFN- γ , porém é apenas estatisticamente significante quando comparado ao grupo G4 (* $p < 0.05$). Nas culturas estimuladas com ConA, foi visto que os animais dos grupos (G2, G4 e G5), apresentaram níveis elevados de IFN- γ , porém é estatisticamente significativo nos animais do grupo G5 quando comparado com os grupos G1 e G3 (* $p < 0.05$). Nas culturas sem estímulos o IFN γ foi significativamente maior nos animais infectados e tratados (G4, G5) ou no grupo infectado e sem tratamento (G3) (* $p < 0.05$). (Figura 2B).

Com relação a produção de IL10 observou-se nas culturas estimuladas com EG, o tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de citocina IL-10 nos animais do grupo infectado tratado após início da oviposição (G5), quando comparado a todos os demais grupos (* $p < 0.05$). Os animais do grupo controle infectado (G3) tiveram níveis mais elevados de IL-10, quando comparado com grupo controle não infectado G1 (* $p < 0.05$). Nas culturas estimuladas com ConA, o grupo G5 também apresentou níveis significativamente maior. O grupo G3 apresentou níveis de IL10 superior ao grupo não infectado (G1) (* $p < 0.05$). Nas culturas sem estímulos o grupo G5 produziu níveis de IL10 significativamente maior que os grupos G1, G2, G4 e superior ao grupo G3. (* $p < 0.05$) (Figura 2C).

Figura 2 - Níveis de citocinas IL-12P70 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C) de cultura de células esplênicas estimulados com esporos de *Bacillus clausii* ou (EG, ConA e MEIO), de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. (* $p < 0.05$).



3.2 Detecção de IL17 e Foxp3 por Imunohistoquímica

Na análise marcação por IHC em tecido hepático, foi visto aumento da frequência de células Foxp3⁺ nos animais infectados e não tratados (G3) quando comparados com os grupos G2, G4 e G5, respectivamente, porém os valores só foram significantes para grupo G3, quando comparado com animais do grupo G4 (* $p < 0.05$). No intestino, também foi visto aumento da frequência de células Foxp3⁺ nos animais do grupo G3, quando comparados com os animais dos grupos infectados tratados com *B. clausii* G4 e G5, os valores foram significativos (* $p < 0.05$) (Figura 3A e B).

Por outro lado, a intervenção terapêutica com o *B. clausii* aumentou a presença de citocina IL-17A no tecido hepático em animais dos grupos G4 quando comparado com os animais dos grupos G3 e G5, porém não significativo (Figura 3C). No tecido intestinal, os animais que receberam apenas o tratamento com *B. clausii* (G2) apresentaram níveis significativamente mais elevados que os animais tratados e infectados (G4) (* $p < 0.05$). Por outro lado, o tratamento com *B. clausii* aumentou a frequência de IL-17A nos animais do grupo G4, quando comparado com o grupo G3 e G5, mas não significativo. (Figura 3D). Nos grupos de animais infectados com ou sem tratamento determinamos a razão entre as células foxp3+ e células IL17A+. Os camundongos infectados e não tratados com o *B. clausii* apresentaram razão maior de FOXP3+/IL17A que todos os grupos tratados no intestino, sendo esta diferença significativa entre o grupo G3 e G5 (Figura 4).

Figura 3- Efeito de probiótico *B. clausii* sobre níveis dos marcadores de Foxp3+ no fígado (A) e no intestino (B) em análise de marcação de IHC, de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados com *S. mansoni* e tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. Amostra de 10 campos aleatórios expressos como áreas (pxl/ μ m). Valores considerados significativos quando (* $p < 0.05$).

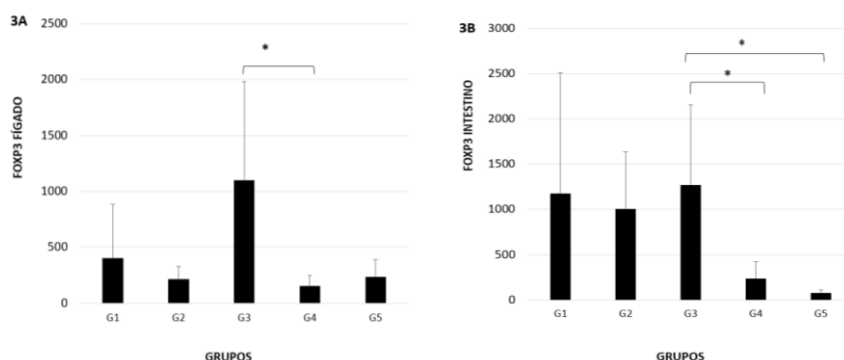


Figura 3: Efeito de probiótico *B. clausii* sobre níveis dos marcadores IL17A no fígado (C) e IL17A no intestino (D) em análise de marcação de IHC, de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados com *S. mansoni* e tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão. Amostra de 10 campos aleatórios (pxl/ μ m). Valores considerados significativos quando (* $p < 0.05$).

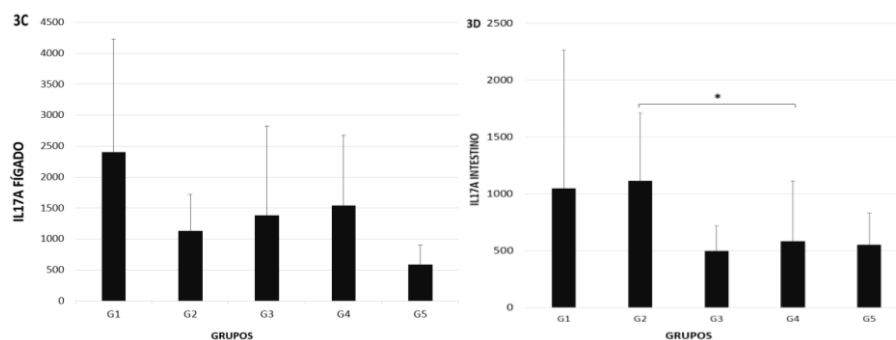
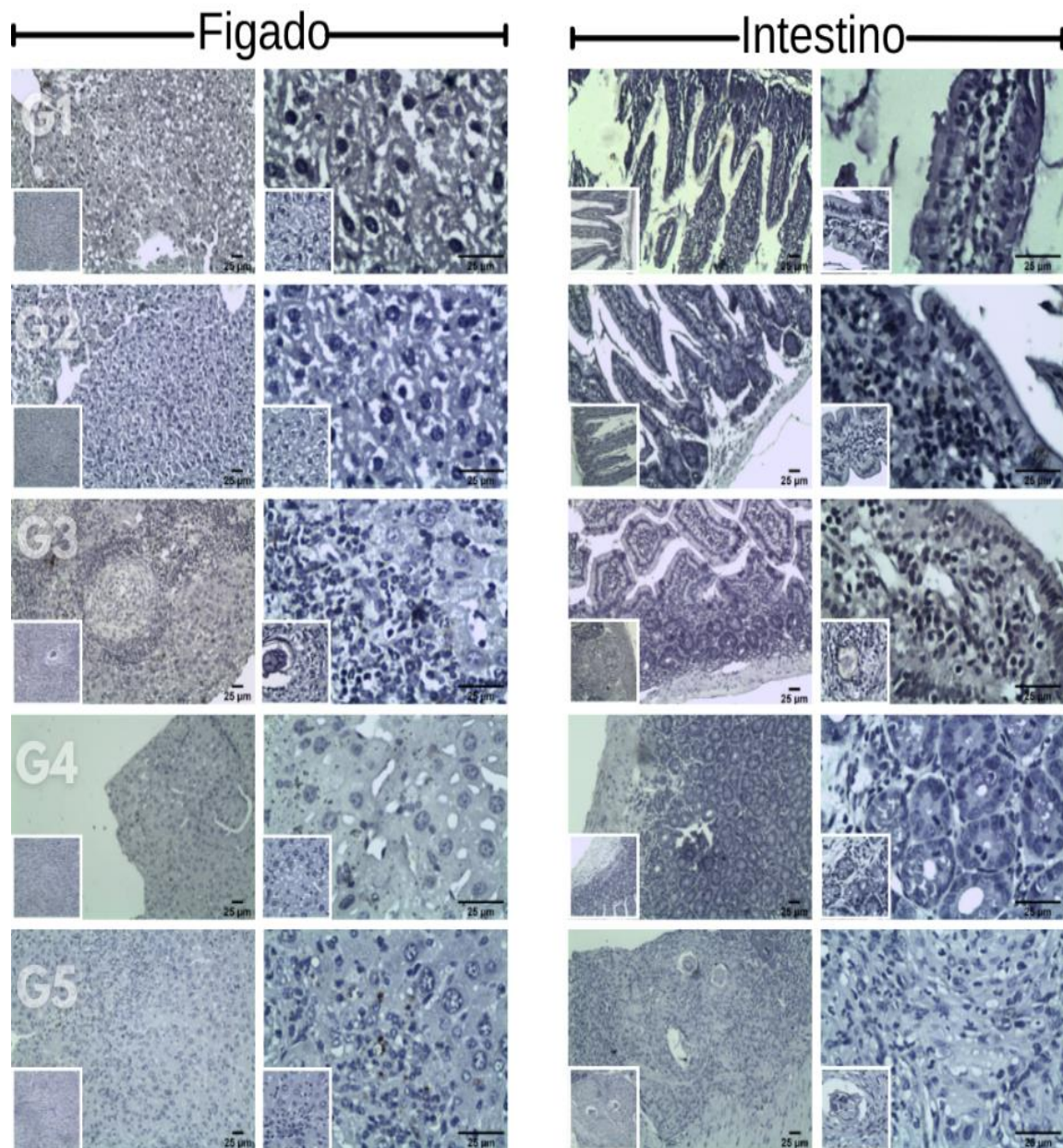


Imagem representa corte de tecido do fígado e intestino analisados pela marcação de IHC (Figura 4).

Figura 4: Grades de fotos demonstrativas, da expressão IL17 (A) na análise de marcação por IHC, do Controle (C) e Teste (T) de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). As secções de objetiva (10x) e (40 x), cor castanho na marcação, demonstra a positividade da reação.

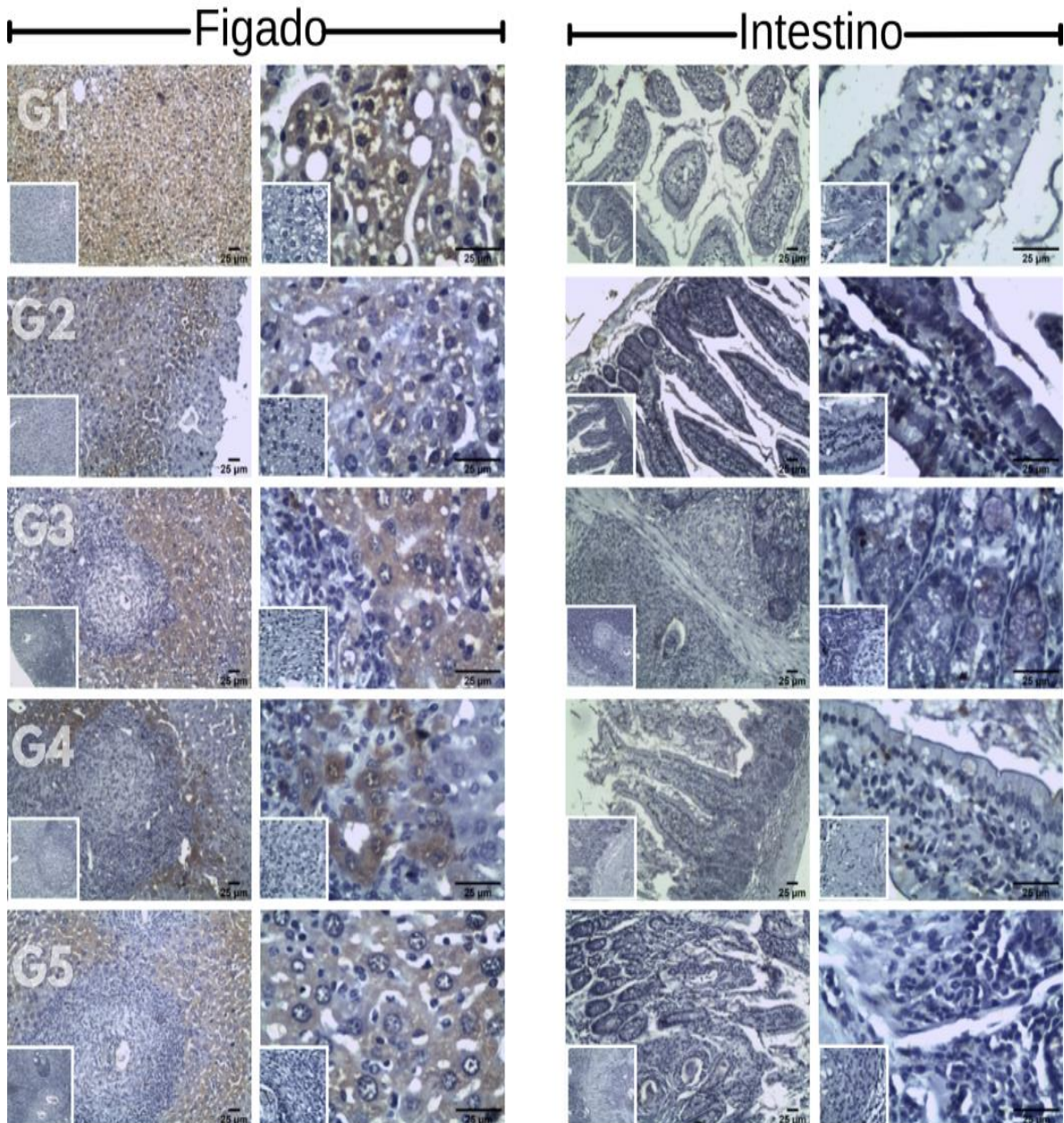


Gn **T**
C

Gn= Grupo Experimental; C= Controle; T= Teste

A
IL-17

Figura 4: Grades de fotos demonstrativas, da expressão Foxp3 (B) na análise de marcação por IHC, do Controle (C) e Teste (T) de camundongos não infectados (G1), camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* de após início da oviposição (G5). As secções de objetiva (10x) e (40 x), cor castanho na marcação, demonstra a positividade da reação.

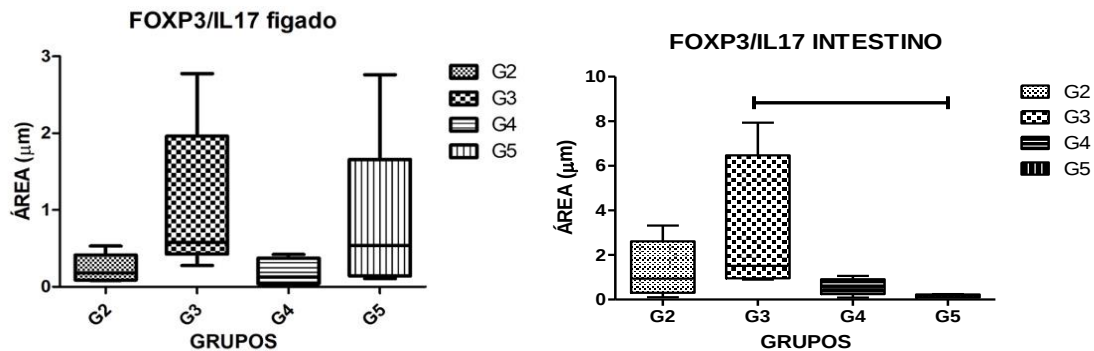


Gn
C T

Gn= Grupo Experimental; C= Controle; T= Teste

Foxp3

Figura 5 - Razão entre a marcação de células FoxP3+ e IL17+ de camundongos não infectados tratados com esporos de *Bacillus clausii* (G2), camundongos infectados com *S. mansoni* não tratados (G3), camundongos infectados e tratados antes da exposição cercariana com esporos de *B. clausii* (G4) ou infectados e tratados com esporos de *B. clausii* após início da oviposição (G5). Valores representam média e desvio padrão da área (μm). Valores considerados significativos quando (* $p < 0.05$).



No presente estudo foi avaliado a correlação entre a marcação de FOXP3+ e IL17+ no fígado e intestino com a produção de citocinas IL12p70, IFN γ e IL10 em culturas esplenicas sob diferentes estímulos. A marcação de IL17A+ no intestino mostrou uma correlação negativa com a Foxp3 no fígado em animais que receberam apenas o tratamento (G2) e negativa também com a IL10 nos animais tratados e infectados profilaticamente (G4). Por outro lado, os animais infectados e não tratados (G3) apresentaram correlação negativa com IFN γ e positiva com IL10. A marcação de Foxp3 no intestino mostrou correlação positiva com IL10 no grupo de animais infectados e não tratados (G3), no entanto a correlação com IL10 foi negativa nos animais que receberam o tratamento profilático (G4) (Tabela 1).

Tabela 1- Correlações citocinas esplênicas versus Foxp3 e IL-17 de tecidos hepáticos e intestinais de camundongos não infectados e infectados pelo *S. mansoni* submetidos ao tratamento com *B. clausii*

IL17 FÍGADO	IL12P7 0 EG	IL12P7 0 CONA	IL12P7 0 MEIO	IFN γ EG	IFN γ CONA	IFN γ MEIO	IL10 EG	IL10 CONA	IL10 MEIO	FOXP3 FÍGADO	IL17 INTES TINO	FOXP3 INTES TINO
G 2	ND	ND	0,354	0,500	0,000	0,700	0,900*	0,100	0,500	0,100	0,000	-0,100
G 3	-0,667	0,707	-0,335	-0,100	0,000	0,200	0,564	0,300	0,700	0,300	-0,100	0,616
G 4	0,671	0,354	-0,447	-0,100	0,527	-0,100	-0,300	-0,600	-0,100	-0,200	0,400	0,100
G5	0,544	0,000	-0,763	-0,359	-0,564	-0,103	0,051	-0,667	-0,616	-0,103	0,368	0,564

IL17 INTES TINO	IL12P7 0EG	IL12P7 0 CONA	IL12P7 0 MEIO	IFN γ EG	IFN γ CONA	IFN γ MEIO	IL10 EG	IL10 CONA	IL10 MEIO	FOXP3 FÍGADO	FOXP FÍGADO	FOXP3 INTES TINO
G 2			0,707	0,500	0,500	-0,300	0,400	0,600	-0,500	0,000	-,900*	-0,600
G 3	0,103	-0,354	-0,112	-0,700	-0,300	-,900*	0,205	0,900*	-0,600	-0,100	-0,500	-0,667
G 4	-0,112	0,707	-0,112	0,000	-0,158	0,000	-,900*	-0,300	-0,500	0,400	-0,100	0,700
G5	0,181	-0,363	-0,132	0,462	0,359	0,308	0,667	-0,051	-0,821	0,368	0,308	0,359

FOXP3 FÍGADO	IL12P7 0 EG	IL12P7 0 CONA	IL12P7 0 MEIO	IFN γ EG	IFN γ CONA	IFN γ MEIO	IL10 EG	IL10 CONA	IL10 MEIO	IL17 FÍGADO	IL17 INTES TINO	FOXP3 INTES TINO
G 2			-0,354	-0,200	-0,300	0,400	-0,200	-0,700	0,300	0,100	-,900*	0,800
G 3	0,205	0,707	0,335	0,600	,900*	0,700	-0,359	-0,200	0,300	0,300	-0,500	0,462
G 4	0,224	-0,707	0,112	,900*	0,632	,900*	-0,200	0,100	0,400	-0,200	-0,100	0,600
G5	0,707	-0,354	-0,051	-0,300	0,600	-0,600	-0,100	0,100	-0,600	-0,103	0,308	0,500

FOXP3 INTES TINO	IL12P7 0 EG	IL12P7 0 CONA	IL12P7 0 MEIO	IFN γ EG	IFN γ CONA	IFN γ MEIO	IL10 EG	IL10 CONA	IL10 MEIO	IL17 FÍGADO	FOXP3 IHCFÍ GADO	IL17I INTES TINO
G 2			0,000	-0,300	0,300	-0,100	-0,200	-0,300	0,200	-0,100	0,800	-0,600
G 3	-0,711	0,363	0,287	0,667	0,308	0,821	0,500	-0,359	,975**	0,616	0,462	-0,667
G 4	0,112	0,000	0,224	0,700	0,264	0,700	-,900*	-0,300	-0,300	0,100	0,600	0,700
G5	0,707	0,354	-0,872	-0,600	-0,300	-0,700	0,300	-0,800	-0,700	0,564	0,500	0,359

Os valores mostrados são coeficientes de correlação de Spearman. Os resultados estatisticamente significativos são indicados com um (P <0,01 a 0,05) ou dois asteriscos sobrescritos (P <0,001 a 0,01).

Discussão

Os resultados deste estudo demonstraram que animais tratados com *B. clausii* apresentaram produção significativamente mais elevada de IL12 p70. No estímulo com ConA, o grupo que recebeu o *B. clausii* curativamente (G5) apresentou níveis significativamente maior de IFN γ que os animais infectados sem tratamento (G3). O tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de citocina IL-10 nos animais do grupo infectado tratado após início da oviposição (G5), quando comparado a todos os demais grupos. Os animais infectados e não tratados (G3) apresentaram níveis mais elevados de FOXP3, no tecido hepático e intestinal em comparação aos grupos que receberam o tratamento com *B. clausii*. O nosso estudo evidenciou que *B. clausii* tem grande potencial imunomodulatório, é capaz de induzir uma produção de citocinas de perfil Th1, embora também possa induzir citocinas de perfil regulatório. A utilização de probióticos para melhorar a saúde é uma estratégia que vem sendo utilizada a vários anos. Os probióticos têm sido usados no tratamento de doenças gastrointestinais entre outras. Os benefícios clínicos têm sido atribuídos a substâncias antimicrobianas produzidas pelas linhagens de probióticos bem como suas propriedades imunomodulatórias (URDACI et. al. 2004). Apesar deste conhecimento, existem poucos estudos que caracterizam os mecanismos imunomodulatórios dos *Bacillus*. Desta forma este estudo vem avaliar o potencial imunomodulatório do *Bacillus clausii* e seu potencial como adjuvante no tratamento da esquistossomose mansônica. A esquistossomose é uma doença parasitária negligenciada caracterizada por uma resposta granulomatosa inflamatória contra o ovo depositado no tecido do hospedeiro, especialmente nos tecidos hepáticos e intestinal. Estudos demonstraram a capacidade de probióticos do gênero *Bacillus* de induzir resposta imune celular (CUTTING, 2011).

IL12p70 é um heterodímero composto de duas subunidades funcionais p35 e p40, atua como citocina pró-inflamatória que estimula o perfil Th1, aumenta atividade de células NK, aumenta a produção de IFN γ e aumenta expressão de CD25 em células CD4+Th1. Por esta propriedade, foi importante avaliar se esta citocina poderia ser modulada pelo *B. clausii*. (VERMA ND et. al. 2014). Nossos resultados demonstraram que nas culturas não estimuladas de células esplênicas de animais infectados e tratados curativamente (G5) houve produção significativamente maior de IL12p70. Por outro lado, as culturas de células de animais infectados e sem tratamento com o *B. clausii* (G3) mas que foram estimuladas com o a enterogermina (EG) induziram maior produção de IL12p70 em comparação com os demais grupos sendo significativo em relação ao grupo tratado profilaticamente (G4). Este resultado sugere que o *B. clausii* tem potencial imunomodulatório de estimular a IL12p70 quando

utilizado no tratamento da esquistossomose experimental. Nenhum outro trabalho demonstrou o efeito deste probiótico sobre esta citocina.

Ciprandi e colaboradores (2005) em um estudo com crianças alérgicas e com infecção respiratória, após tratamento com *Bacillus clausii* (Enterogermina®), mostrou um aumento de IFN γ , IL12, TGF- β e IL10 na secreção nasal. Estes resultados corroboram nossos achados.

Nas culturas estimuladas com Enterogermina® (EG), foi visto que os animais dos grupos infectados tratados com *B. clausii* (G4 e G5) e animais infectados e não tratados (G3) produziram níveis significativamente maior de IFN- γ em comparação aos animais não infectados que receberam apenas o *B. clausii* (G2). No estímulo com o mitógeno ConA, apenas o grupo que recebeu o *B. clausii* curativamente (G5) apresentou níveis significativamente maior que os animais infectados sem tratamento (G3). Estes resultados sugerem que o tratamento com o *B. clausii* potencializa a estimulação de IFN γ .

Nossos resultados são semelhantes ao estudo Ciprandi et al. (2005), que observou que o *B. clausii* aumentou os níveis da produção de IFN- γ nas crianças com alergia e infecção respiratória. No estudo realizado por Urdaci et al. (2004), também demonstraram em ensaio *in vitro* utilizando células T CD4⁺ isoladas de baço de camundongos C57Bl/6 que as cepas de *B. clausii* isoladas do Enterogermina® induziram resposta T proliferativa e aumento da produção de IFN- γ e expressão de NOS II com consequente aumento de produção de nitritos.

Em contrapartida, Dar et al., 2018 demonstraram, que administração de *B. clausii* reduziu os níveis de citocina pró-inflamatória (IFN- γ) em camundongos BALB/c com osteoporose pós-menopausa. Neste estudo os autores utilizaram fêmeas ovariectomizadas.

Estudos sobre o mecanismo de modulação da IL-10 durante esquistossomose, demonstraram que essa citocina pode regular a patologia por controlar a produção de citocinas Th1 e prevenir o desenvolvimento de Th2 excessiva durante a formação do granuloma (HOFFMANN et al., 2000; HESSE et al., 2004; TAYLOR et al., 2006). Em nosso estudo, com relação a produção de IL10 observou-se que nas culturas estimuladas com EG, o tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de citocina IL-10 nos animais do grupo infectado tratado após início da oviposição (G5), quando comparado a todos os demais grupos. O mesmo foi observado nas culturas sem estímulo ou estimuladas com ConA. Importante ressaltar que o tratamento dos animais com *B. clausii* sem infecção não induziu significativamente a produção desta citocina, porém potencializou a produção induzida pela própria infecção do *S. mansoni*.

As células Th17 e as células T regulatória são frequentemente encontradas em superfícies de barreira, particularmente na mucosa intestinal, onde elas funcionam para proteger o hospedeiro de microrganismos patogênicos e para restringir as respostas excessivas de células T efectoras, respectivamente, sendo reguladas na maior parte pelos microrganismos entéricos (OMENETTI et al., 2015). Durante a esquistossomose as células Th17 e Treg possuem papéis fundamentais no desenvolvimento da doença. A Th17 tem sido associada a indução de patologias severas (RUTITZKY & STADECKER 2011; SHAINHEIT et al., 2011; LARKIN et al., 2012) enquanto as T regulatórias estão relacionadas no controle da formação do granuloma (SINGH et al., 2004; BAUMGART et al., 2006; TAYLOR et al., 2006). Além disso foi visto que a infecção por *Schistosoma* pode comprometer o balanço Treg/Th17 (CHEN et al., 2017).

Nosso grupo é o primeiro a demonstrar o potencial efeito imunomodulatório do *Bacillus clausii* na infecção experimental pelo *S. mansoni* (Cruz, 2020). No primeiro estudo foi demonstrado que culturas estimuladas com ConA os grupos de animais tratados com a Enterogermina® induziram menor produção de IL2, e maior produção de IL4 e IL10. O grupo G4 também induziu maior produção de IL17 em comparação com os animais infectados e não tratados. Os resultados demonstraram que existe diferença nos mecanismos envolvidos na regulação da imunidade pelo *B. clausii* quando utilizado profilaticamente ou quando a infecção já está estabelecida. Embora a IL17 esteja criticamente envolvida na imunopatologia da esquistossomose, é possível que tenha um balanço na resposta imune TH1/TH2/TH17 que não leva a uma polarização de resposta e nem a exacerbação da patologia (Cruz, 2020).

No presente estudo avaliamos *in situ* no tecido hepático e intestinal quanto a presença dos marcadores FOXP3+ e IL17A nos grupos dos animais com os diferentes esquemas de tratamentos. Observamos que os animais infectados e não tratados (G3) apresentaram níveis mais elevados de FOXP3, no tecido hepático e intestinal em comparação aos grupos que receberam o tratamento com *B. clausii*. Surpreendentemente, o tratamento com *B. clausii*, na ausência de infecção, elevou significativamente a marcação de IL17A no tecido intestinal. Embora os animais infectados com *S. mansoni* e tratados com *B. clausii*, tenha menor marcação de FoxP3 no intestino, não refletiu em maior presença significativa de IL17A no intestino em comparação com o infectado sem tratamento. Porém quando avaliamos a razão entre FOXP3 e IL17A no intestino, os camundongos infectados e não tratados com o *B. clausii* apresentaram razão maior de FOXP3+/IL17A que todos os grupos tratados sendo significativa esta diferença em comparação com os animais infectados tratados após oviposição (G5).

Dar et al. (2018) observaram em Camundongos BALB/c com osteoporose pós-menopausa, que o tratamento com *B. clausii* (Enterogermina®) aumentou significativamente as células Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) além de inibir simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4⁺ RorγT) e a produção de citocinas IL-6, IL-17 e TNF-α.

Avaliamos também se havia alguma correlação entre a marcação da FOXP3 e IL17A nos tecidos e a produção das citocinas esplênicas. A marcação de IL17A⁺ no intestino mostrou uma correlação negativa com a IL10 nos animais tratados e infectados profilaticamente (G4). Nos animais infectados e não tratados (G3) a IL17A no intestino apresentou correlação negativa com IFNγ e positiva com IL10. Por outro lado, na marcação de Foxp3 no intestino observamos correlação positiva com IL10 no grupo de animais infectados e não tratados (G3). A correlação com IL10 foi negativa nos animais que receberam o tratamento profilático (G4). Estes resultados podem indicar como esperado, mecanismos distintos envolvidos na modulação da resposta entre estes diferentes órgãos.

Na infecção experimental por *S. mansoni* a resposta imune no início da infecção é predominantemente Th1, marcada pela elevada produção TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6 (Dunne & Cooke, 2005). Com o progresso da infecção, os vermes amadurecem sexualmente e iniciam a postura de ovos, que estimulam uma mudança no perfil de resposta imune, sendo observado aumento de produção de citocinas do tipo Th2. Após deposição dos ovos nos tecidos outras populações de células também tem grande importância na evolução da infecção como as células T regulatórias, que estão associadas ao melhor controle da patologia, enquanto as células Th17 que estão associadas a exacerbação desta patologia.

No presente estudo, embora o tratamento com *B. clausii* tenha induzido um perfil mais pró-inflamatório, esta resposta no início da infecção pode contribuir para uma maior resistência a infecção. Bourke e cols (2015) demonstraram que o tratamento com praziquantel induz um fenótipo mais pró-inflamatório pós tratamento com aumento dos níveis de TNF-α, IL-6, IL-8, IFN-γ, IL-12p70, e IL-23.

O *B. clausii* pode induzir respostas pró e anti-inflamatórias, na dependência do modelo. Alguns autores têm proposto que este probiótico estimula uma resposta Th2 (Di Caro et al, 2005), outros demonstraram um direcionamento para uma resposta Th1 (Ciprandi et al. 2005, Udarci, 2004) e outros uma indução de resposta Treg e diminuição de Th17 (Dar, et. al, 2018). Desta forma, reforça a importância de melhor caracterizar os efeitos imunomodulatórios dos probióticos.

5. Conclusões

Em conclusão, nossos resultados demonstram que *B. clausii* tem grande potencial imunomodulatório, induziu a produção de citocinas de perfil Th1, embora também possa induzir citocinas de perfil regulatório. Em perspectiva futura o probiótico pode ser testado com adjuvante no tratamento da esquistossomose.

6. Referências

- Hill, C.; Guarner, F, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature*, v. 11, p. 506–514, 2015.
- Hesse, M.; Piccirillo, C. A, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal Immunology*, v. 172, p. 3157-3166, 2004.
- Musikasang, H.; Sohsomboon, N, et al. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens. *Czech Journal. Animal Science*, v. 57, n 3, p. 137–149, 2012.
- Fijan, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal Environmental Research Public Health*, v. 11, n 5, p. 4745-4767, 2014.
- Almeida, C. C.; Lorena, S. L. S, et al. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. *Clinical Research*. 2012. v. 27, n 2, p. 247-251
- Leblanc, J. G.; Chain, F, et al. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n 79, 2017.
- Dubey, M. R.; Patel, V. P. Probiotics: a promising tool for calcium absorption. *The Open Nutrition Journal*, v. 12, p. 59-69, 2018.
- Drakes, M.; Blanchard, T, et al. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and Immunity*, v. 72, n 6, p. 3299–3309, 2004.
- Foligne, B.; Zoumpopoulou, G, et al. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PlosOne*, v. 3, p. 1-12, 2007.
- O'mahony, C.; Scully, P., et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kb activation. *Plos Pathogens*, v. 4, n 8, 2018.
- Konieczna, P.; Groeger, D, et al. *Bifidobacterium infantis* 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Gut Microbiota*, v. 61, p. 354-366, 2012.

- Kim, H. J.; Kim, Y. J, et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs. *Clinical Immunology*, v. 153, p. 178–186, 2014.
- Cutting, S. M. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, v. 28, p. 214-220, 2011.
- Rocha, F. J. S. Pereira, C. L. D, et al. Expressão do fator 1 α induzível por hipóxia na *leishmaniose tegumentar* humana causada por *Leishmania braziliensis*. *Annals of parasitology*, v. 64, n. 1, 2018.
- Elshagabee, F. M. F.; Rokana, N, et al. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n 1490, 2017.
- Senesi, S. et al. Molecular Characterization and Identification of *Bacillus clausii* Strains Marketed for Use in Oral Bacteriotherapy. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, n. 2, p. 834-839, 2001.
- Lopetuso, L. R.; Scaldaferri, F, et al. *Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 10, n 8, p. 943-948, 2016.
- Urdaci, M. C.; Bressolier, P, et al. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol*, v. 38, p. 86-90, 2004.
- Nista, E. C.; Candelli, M. et al. *Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of *anti-Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 20, p. 1181-11-88, 2004.
- Pradhan, B.; Guha, D, et al. Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* modulate gut microbiota in Th1- and Th2-biased mice to ameliorate *Salmonella typhimurium*-induced diarrhea. *Probiotics and Antimicrobial proteins*, v. 11, n 3, p. 887-904, 2019.
- Di caro, S.; Tao, H. et al. *Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 17, p. 951-960, 2005.
- Ciprandi, G.; Tosca, M. A. et al. Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study. *Pediatric Allergy Immunology*, v. 15, p. 148–151, 2005.
- DAR, H. Y.; PAL, S, et al. *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice. *Nutrition*, v. 54, p. 118-128, 2018.
- Hoffmann, K.F.; Cheever, A.W, et al. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal Immunology*, v. 164, n 12, p. 6406-6416, 2000.
- Hsieh, C. Y.; Osaka, T, et al. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiological Reports*, v. 3, n 3, 2015.
- Taylor, J. J.; Mohrs, M, et al. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the th effector population. *Journal Immunology*, v. 176, p. 5839-5847, 2006.
- OMENETTI, S.; PIZARRO, T.T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. *Frontier in Immunology*, v. 6, p. 1–8, 2015.

Rutitzky, L. I.; Stadecker, M. J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *European Journal of Immunology*, v. 41, p. 2677–2687, 2011.

Shainheit, M. G.; Lasocki, K. W, et al. The pathogenic Th17 cell response to *major schistosome* egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1b. *Journal Immunology*, v. 187, p. 5328-5335, 2011.

Larkin, B. M.; Smith, P. M et al. Induction and regulation of pathogenic Th17 cell responses in schistosomiasis. *Seminars Immunopathology*, v. 34, n 6, p. 873–888, 2012.

Baumgart, M; Tompkins, F, et al. Naturally occurring CD4+FOXP3+ regulatory T cells are na essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *Journal Immunology*, v. 176, p. 5374-5387, 2006.

Chen, S.; Gao, Y. et al. Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg promoting schistosome egg granuloma formation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, v. 10, n 10, p. 1-11, 2017.

Verma ND, Hall BM, Plain KM, et al. Interleukin-12 (IL-12p70) Promotes Induction of Highly Potent Th1-Like CD4(+) CD25(+) T Regulatory Cells That Inhibit Allograft Rejection in Unmodified Recipients. *Front Immunol.*;5:190. 2014

Bourke CD, Nausch N, Rujeni N, et al. Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis. *J Infect Dis.*;208(1):159-169. 2013

8 CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos resultados demonstram que *B. clausii* é capaz de modular a produção de citocinas dos perfis Th1 e Th2 durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Os animais tratados com *B. clausii* apresentaram produção significativamente mais elevada de IL12 p70 e potencializaram a produção de IFN γ nos animais infectados. O tratamento com *B. clausii* aumentou os níveis de citocina IL-10 nos animais do grupo infectado tratado após início da oviposição.

Os animais infectados e não tratados apresentaram níveis mais elevados de FOXP3, no tecido hepático e intestinal em comparação aos grupos que receberam o tratamento com *B. clausii*.

O tratamento com *B. clausii*, na ausência de infecção, elevou significativamente a marcação de IL17A no tecido intestinal.

Os camundongos infectados e não tratados com o *B. clausii* apresentaram razão maior de FOXP3+/IL17A que todos os grupos tratados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Hipersensibilidade imediata. Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Trad. Claudia Reali e outros. Rio de Janeiro: Elsevier, p.441-461, 2017.
- ABDEL-SALAM, A. M.; AMMAR, N; ABDEL-HAMID, A. Z. **Effectiveness of probiotic Labneh supplemented with garlic or onion oil against *Schistosoma mansoni* in infected mice**. Int J Dairy Sci, v. 3, n. 2, p. 97-104, 2008.
- ADEEGBE, D. O.; NISHIKAWA, H. **Natural and induced T regulatory cells**. Frontiers in Immunology, v. 4, n 190, p 1-14, 2013.
- ALMEIDA, C. C.; LORENA, S. L. S.; PAVAN, C. R.; AKASADA, H. M. I.; MESQUISTA, M. A. **Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients**. Clinical Research, v. 27, n 2, p. 247-251, 2012.
- ALMEIDA, M.R. **Esquistossomose Mansoní no município de Santa Inês/Ba: políticas públicas e fatores associados à prevalência endêmica**. 2018. 168 p. Tese (Doutorado em Planejamento Territorial e Desenvolvimento Social) – Universidade Católica do Salvador - UCSAL, Salvador, 2018.
- AMU, S.; SAUNDERS, S. P.; KRONENBERG, M.; MANGAM, N. E.; ATZBERGER, A.; FALLON, P. G. **Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model**. Journal Allergy and Clinic Immunology, v. 125, n 5, p. 1114-1124, 2010.
- ARAÚJO, H. D. A.; AIRES, A. SOARES, L.; C. L. R.; BRITO, T. G. S.; NASCIMENTO, W. M.; MARTINS, M. C. B.; SILVA, T. G.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; SILVA, N. H.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; LIMA, V. L. M. **Usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Lichen): Synthesis, cytotoxicity and in vitro anthelmintic activity and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni***. ActaTropica, v. 192, p. 1-19, 2019.
- ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E.; LE PASLIER, D. YAMADA, T.; et al. **Enterotypes of the human gut microbiome**. Nature, v. 473, n 12, p. 174-180, 2011.
- BAUMGART, M; TOMPKINS, F; LENG, J.; HESSE, M. **Naturally occurring CD4+FOXP3+ regulatory T cells are na essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation**. Journal Immunology, v. 176, p. 5374-5387, 2006.
- BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA-RODRIGUES, O.; MARTINEZ-GOMEZ, F.; LOPEZ, M. G.; AGUILAR-FIGUEROA, B. R. **Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *trichinella spiralis* infection**. Parasite, v. 8, p. 226-228, 2001.
- BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. **Homeostatic immunity and the microbiota**. Immunity, v. 46, n 4, p. 562-576, 2017.

BERGSTROM, A.; SKOV, T. H.; BAHL, M. I.; ROAGER, H. M.; CHRISTENSEN, L. B.; EJLSKOV, K. T.; MOLGAARD, C.; MICHAELSEN, K. F.; LICHT, T. R. **Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of danish infants.** Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n 9, p. 2889-2900, 2014.

BOIRIVANT, M; STROBER, W. **The mechanism of action of probiotics.** Current opinion in gastroenterology, v. 23, n. 6, p. 679-692, 2007.

BOOBIER, W. J.; BAKER, J. S.; DAVIES, B. **Development of a healthy biscuit: an alternative approach to biscuit manufacture.** Nutrition journal, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2006.

BOUHSS, A.; AL-DABBAGH, B.; VINCENT, M.; ODAERT, B.; AUMONT-NICAISE, M.; BRESSOLIER, P.; DESMADRILL, M.; et al. **Specific interactions of Clausin, a new lantibiotic, with lipid precursors of the bacterial cell wall.** Biophysical Journal, v. 97, p. 1390–1397, 2009.

BOURKE CD, NAUSCH N, RUJENIN N, et al. **Integrated analysis of innate, Th1, Th2, Th17, and regulatory cytokines identifies changes in immune polarisation following treatment of human schistosomiasis.** J Infect Dis.;208(1):159-169. 2013

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de Vigilância em Saúde: volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços.** – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016.** Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, 2018.

BRUNET, L. R.; FINKELMAN, F. D.; CHEEVER, A. W.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. **IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis.** Journal Immunology, v. 159, p.777-785, 1997.

BRUUN, B.; AAGAARD-HANSEN, J. **The social context of schistosomiasis and its control.** WHO Library Cataloguing, v. 3, p. 1-67, 2008.

CARDOSO, L. S.; OLIVEIRA, S. C.; GOES, A. M.; OLIVEIRA, R. R.; PACIFICO, L. G.; MARINHO, F. V.; FONSECA, C. T.; CARDOSO, F. C., CARVALHO, E. M.; ARAUJO, M. I. **Schistosoma mansoni antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation.** Clinical and Experimental Immunology, v. 160, p. 266–274, 2010.

CARVALHO, G.B.F. et al. **Novos antígenos de Schistosoma mansoni para o diagnóstico sorológico da infecção ativa e controle de cura.** 2016. Tese de Doutorado.

CAVALCANTI, M. G. S. **Caracterização citoquímica ultraestrutural da cercária de *Schistosoma mansoni***. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

CHEN, S.; GAO, Y.; LIANG, Y.; HU, L.; LIU, J.; PENG, L.; FENG, A.; XIAO, J. **Imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg promoting schistosome egg granuloma formation**. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, v. 10, n 10, p. 1-11, 2017.

CHIODO, P. G.; SPARO, M. D.; PEZZANI, B. C.; MINVIELLE, M. C.; BASUALDO, J. A. **In vitro and in vivo effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis***. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, n. 5, p. 615-620, 2010.

CIPRANDI, G.; TOSCA, M.A.; MILANESE, M.; CALIGO, G.; RICCA, V. **Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *Bacillus clausii* administration: a pilot study**. Pediatric Allergy Immunology, v. 15, p. 148–151, 2005.

COLLADO, M. C.; RAUTAVA, S. AAKKO, J.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. **Human gut colonization may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid**. Scientific Reports, v. 6, p. 1-13, 2016.

COLLEY, D. G. et al. **Human schistosomiasis**. Lancet, London, v. 383, n. 9936, p.: 2253–2264, 2014.

CRUZ, CLENIO DA SILVA. **Estudo do potencial imunomodulatório do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) sobre a esquistossomose mansoni experimental**. Orientador: Vláudia Maria Assis Costa. 2020. 91 f. Dissertação (MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, RECIFE, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/37848/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O%20Cl%C3%AAnio%20Silva%20Cruz.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2022.

CUTTING, S. M. ***Bacillus* probiotics**. Food Microbiology, v. 28, p. 214-220, 2011.

DAR, H. Y.; PAL, S.; SHUKLA, P. MISHRA, P. K.; TOMAR, G. B.; CHATTOPADHYAY, N.; SRIVASTAVA, R. K. ***Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice**. Nutrition, v. 54, p. 118-128, 2018.

DE AVILA, L. F. D. C.; DE LEON, P. M. M.; DE MOURA, M. Q.; BERNE, M. E. A.; SCAINI, C. J.; LEIVAS LEITE, F. P. **Modulation of IL-12 and IFN- γ by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice**. Parasite Immunology, v. 38, p. 326–330, 2016.

DE CASTRO, J.A; GUNO, M. J.V.R; P. M.O. ***Bacillus clausii* as adjunctive treatment for acute communityacquired diarrhea among Filipino children: a large-scale, multicenter, open-label study (CIDDLE)**. Tropical diseases, travel medicine and vaccines, v. 5, n. 1, p. 14, 2019.

DI CARO, S.; TAO, H.; GRILLO, A.; FRANCESCHI, F.; CHIARA, E.; ZOCCO, M. A.; GASBARRINI, G.; SEPULVEDA, A. R.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis**. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, v. 17, p. 951-960, 2005.

- DINLEYICI, E. C.; EREN, M.; YARGIC, Z. A.; DOGAN, N.; VANDENPLAS, Y. **Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* and metronidazole compared to metronidazole alone in children with acute bloody diarrhea caused by amebiasis: a prospective, randomized, open label study.** American Journal Tropical Medicine Hygiene, v. 80, n. 6, p. 953-955, 2009.
- DOS SANTOS. C, O; COELHO, P. M. Z; LENZI, H. L (Ed.). ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** SciELO-Editora FIOCRUZ, 2008.
- DRAKES, M.; BLANCHARD, T.; CZINN, S. **Bacterial probiotic modulation of dendritic cells.** Infection and Immunity, v. 72, n 6, p. 3299–3309, 2004.
- DUBEY, M. R.; PATEL, V. P. **Probiotics: a promising tool for calcium absorption.** The Open Nutrition Journal, v. 12, p. 59-69, 2018.
- DUNNE DW; COOKE, A. **A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease.** Nature Rev 5: 420-426, 2005.
- DVOROZNAKOVA, E.; BUCKOVA, B.; HURNIKOVA, Z.; REVAJOVA, V.; LAUKOVA, A. **Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis*.** Veterinary Parasitology, v. 15, n 231, p. 69-76, 2016.
- EL-KHADRAGY, M. F.; AL-OLAYAN, E. M.; ELMALLAH, M. I. Y.; ALHARBI, A. M.; YEHA, H. M.; MONEIM, A. E. A. **Probiotics and yogurt modulate oxidative stress and fibrosis in livers of *Schistosoma mansoni*-infected mice.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 19, n 3, p. 1-19, 2019.
- ELSHAGHABEE, F. M. F.; ROKANA, N.; GULHANE, R. D.; SHARMA, C.; PANWAR, H. ***Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives.** Frontiers in Microbiology, v. 8, n 1490, 2017.
- EZZ, A.; GMAIL, I. S.; SALEM, F. E. H.; SALAMA, R.; NADY, S. **Anti-IL-17 markedly inhibited the *in vitro* granuloma induced by *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen.** International Journal of Medicine in Developing Countries, v. 2, n 1, p. 38-46, 2018.
- FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; MCKENZIE, G.; MCKENZIE, A. N. J. **Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent.** The Journal of Immunology, v. 164, p. 2585–2591, 2000.
- FIJAN, S. **Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature.** International Journal Environmental Research Public Health, v. 11, n 5, p. 4745-4767, 2014.
- FLORES-VILLANUEVA, P. O.; CHIKUNGUWO, S. M.; HARRIS, T. S.; STADECKER, J. **Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*.** Journal Immunology, v. 151, n 6, p. 3192-3198.

FLOUDAS, A.; AVIELLO, G.; SCHWARTZ, C.; JEFFERY, I. B.; O'TOOLE, P. W.; FALLON, P. G. ***Schistosoma mansoni* worm infection regulates the intestinal microbiota and susceptibility to colitis.** Infection and Immunity, v. 87, n 8, p. 1-11, 2019.

FOLIGNE, B.; ZOUMPOPOULOU, G.; DEWULF, J.; YOUNES, A. B.; CHAREYNE, F.; SIRAND, J. C.; POT, B.; GRANGETTE, C. **A key role of dendritic cells in probiotic functionality.** PlosOne, v. 3, p. 1-12, 2007.

FOSTER, J. C.; GLASS, M. D.; COURTNEY, P. D.; WARD, L. A. **Effect of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability.** Food Microbiology, v. 20, p. 351–357, 2003.

GHANEM, K. Z.; ABDEL-SALAM, A. M.; MAGHARBY, A. S. **Immunoprophylactic effect of probiotic yoghurt feeding on *Schistosoma mansoni*-infected mice.** Polish journal of food and nutrition sciences, v. 14, n. 2, p. 123–126, 2005.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SAVETTI, S.; GUEYE, S. A.; LUPETTI, A.; SENESI, S. **Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation.** Journal Applied Microbiology, v. 119, n 2, p. 552-559, 2015.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I.; RELMAN, D. A.; FRASER-LIGGETT, C. M.; NELSON, K. E. **Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome.** Science, v. 312, n 2, p. 1355–1359, 2006.

GLASS, M. D.; COURTNEY, P. D.; LEJEUNE, J. T.; WARD, L. A. **Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on *Cryptosporidium* viability and infectivity *in vitro*.** Food Microbiology, v. 21, p. 423– 429, 2004.

GODIN, B. R.; GORBACH, S. L. **Clinical indications for probiotics: an overview.** Clinical Infectious Diseases, v. 46, p. 96–100, 2008.

GOMES, E.C.S.; MESQUITA, M.C.S.; REHN, V.N.C.; NASCIMENTO, W.R.C.; LOYO, R.; BARBOSA, C.S. **Transmissão urbana da esquistossomose: novo cenário epidemiológico na Zona da Mata de Pernambuco.** Revista Brasileira de Epidemiologia; 19(4): 822-834, 2016.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. **Human schistosomiasis.** Lancet, v. 368, p. 1106–1118, 2006.

HAEBERLEIN, S; OBIEGLO, K; OZIR-FAZALALIKHAN, A; CHAYE A. M; VENINGA H; VAN DER V. L; VOSKAMP, A; BOON, L.; DEN HAAN, J. M. M; WESTERHOF, L. B; WILBERS, R. H. P; SCHOTS, A; SCHRAMM, G; HOOKE, C. H; SMITS, H. H; **Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells.** PLoS Pathog 13: e1006539, 2017.

HAMS, E; AVIELLO, G; FALLON, P. G. **The *Schistosoma* granuloma: friend or foe?** Front Immunol 4: 89-97, 2013.

HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. **Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GU mucosal barrier.** Intech, p. 198-213, 2013.

HESSE, M.; PICCIRILLO, C. A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A. W.; SHEVACH, E. M.; WYNN, T. A. **The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells.** Journal Immunology, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. **The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.** Nature, v. 11, p. 506–514, 2015.

HOEPPLI, ROMY E. et al. **The environment of regulatory T cell biology: cytokines, metabolites, and the microbiome.** Frontiers in immunology, v. 6, p. 61, 2015.

HOFFMANN, K.F.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T. A. **IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis.** Journal Immunology, v. 164, n 12, p. 6406-6416, 2000.

HOLZSCHEITER, M.; LAYLAND, L. E.; LOFFREDO-VERDE, E.; MAIR, K.; VOGELMANN, R.; LANGER, R.; WAGNER, H.; PRAZERES DA COSTA, C. **Lack of host gut microbiota alters immune responses and intestinal granuloma formation during schistosomiasis.** Clinical and Experimental Immunology, v. 175, p. 246–257, 2013.

HOOKS, K. B.; O'MALLEY, M. A. **Dysbiosis and its discontents.** MBio, v. 8, n 5, p.1492-1517, 2017.

HOTEZ, P. J. et al. **The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases.** PLoS neglected tropical diseases, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014.

HSIEH, C. Y.; OSAKA, T.; MORIYAMA, E.; DATE, Y.; KIKUCHI, J.; TSUNEDA, S. **Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*.** Physiological Reports, v. 3, n 3, 2015.

HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R. et al. **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome.** Nature, v. 486, p. 207–214, 2012

IANIRO, G.; RIZZATTI, G.; PLOMER, M.; LOPETUSO, L.; SCALDAFERRI, F.; FRANCESCHI, F.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* for the treatment of acute diarrhea in children: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** Nutrients, v. 10, n, 1074, 2018.

IRVINE, S. L.; HUMMELEN, R.; HEKMAT, S. **Probiotic yogurt consumption may improve gastrointestinal symptoms, productivity, and nutritional intake of people living**

with human immunodeficiency virus in Mwanza, Tanzania. Nutrition Research, v. 31, p. 875-881, 2011.

IWAKURA, Y.; NAKAE, S.; SAJO, S.; ISHIGAME, H. **The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens.** Immunological Reviews, v. 226, p. 57–79, 2008.

JANDHYALA, S. M.; TALUKDAR, R.; SUBRAMANYAM, C.; VUYYURU, H.; SASIKALA, M.; REDDY, D. N. **Role of the normal gut microbiota.** World Journal Gastroenterology, v. 21, n 29, p. 8787-8803, 2015.

JENKINS, S. J.; HEWITSON, J. P.; JENKINS, G. R.; MOUNTFORD, A. P. **Modulation of the host's immune response by schistosome larvae.** Parasite Immunology, v. 27, n 10, p. 385–393, 2005.

JENKINS, T. P.; PEACHEY, L. E.; AJAMI, N. J. MACDONALD, A. S.; HSIEH, M. H.; BRINDLEY, P. J.; CANTACESSI, C.; RINALDI, G. **Schistosoma mansoni infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota.** Scientific Reports, v. 8, n, 12072, 2018.

JUNG, B.K.; CHAI, J.Y. **Epidemiology of Trematode Infections: An Update.** Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicine and Biology, 1154, 2019.

KAJANDER, K. et al. **A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention.** Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 22, n. 5, p. 387-394, 2005.

KALANTARI, P.; BRUNELL, S. C.; STADECKER, M. J. **The C-type lectin receptor-driven, Th17 cell-mediated severe pathology in schistosomiasis: not all immune responses to helminth parasites are Th2 dominated.** Frontiers in Immunology, v. 10, n 26, p. 1-7, 2019.

KARUNAMOORTHY, K; ALMALKI, M.J.; GHAILAN, K.Y. **Schistosomiasis: A neglected tropical disease of poverty: A call for intersectoral mitigation strategies for better health.** Journal of Health Research, v. 5, p. 1-12, 2018.

KIM, H. J.; KIM, Y. J.; LEE, S. H.; YU, J.; JEONG, S. K.; HONG, S. J. **Effects of Lactobacillus rhamnosus on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4+CD25+Foxp3+ Tregs.** Clinical Immunology, v. 153, p. 178–186, 2014.

KIRTE, M. T.; COUTINHO, E. M.; ABATH, F. G. C.; MONTENEGRO, S. M. L. **Effects of non-specific immunopotentiators in experimental Schistosoma mansoni infection: II. Corynebacterium parvum.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 38, p. 359-364, 1996.

KONIECZNA, P.; GROEGER, D.; ZIEGLER, M.; FREI, R.; FERSTL, R.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E. M. M.; KIELY, B.; AKDIS, C. A.; O'MAHONY, L. **Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells.** Gut Microbiota, v. 61, p. 354-366, 2012.

KONIG, J.; BRUMMER, R. J. **Alteration of the intestinal microbiota as a cause of and a potential therapeutic option in irritable bowel syndrome.** *Beneficial Microbes*, v. 5, n 3, 247-261, 2014.

LAFOREST-LAPOINTE, I.; ARRIETA, M. C. **Microbial eukaryotes: a missing link in gut microbiome studies.** *MSystems*, v. 3, n 2, p. 1-5, 2018.

LARKIN, B. M.; SMITH, P. M.; PONICHTERA, H. E.; SHAINHEIT, M. G.; RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. **Induction and regulation of pathogenic Th17 cell responses in schistosomiasis.** *Seminars Immunopathology*, v. 34, n 6, p. 873–888, 2012.

LE CHATELIER, E.; NIELSEN, T.; QIN, J.; PRIFTI, E.; HILDEBRAND, F.; FALONY, G.; ALMEIDA, M.; ARUMUGAM, M.; BATTO, J.M.; KENNEDY, S.; LEONARD, P.; LI, J.; BURGDORF, K.; GRARUP, N.; JØRGENSEN, T.; BRANDSLUND, I.; NIELSEN, H.B.; JUNCKER, A.S.; BERTALAN, M.; LEVENEZ, F.; et al. **Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers.** *Nature*, v. 500, n. 7464, p. 541-546.

LEBLANC, J. G.; CHAIN, F.; MARTIN, R.; HUMARAN, L. G.; COURAU, S.; LANGELLA, P. **Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria.** *Microbial Cell Factories*, v. 16, n 79, 2017.

LI, Z.; LI, D.; TSUN, A., LI, B. **FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation.** *Cellular & Molecular Immunology*, v. 12, p. 558–565, 2015.

LIM, H. S.; YEU, J. E.; HONG, S. P.; KANG, M. S. **Characterization of antibacterial cell-free supernatant from oral care probiotic *Weissella cibaria*, CMU.** *Molecules*, v. 23, n 8, p. 1-13, 2018.

LIMA, M. T.; ANDRADE, A. C. S. P.; OLIVEIRA, G. P.; NICOLE, J. R.; MARTINS, F. S.; KROON, E. G.; ABRAHÃO, J. S. **Virus and microbiota relationships in humans and other mammals: An evolutionary view.** *Human Microbiome Journal*, v. 11, 2019.

LIPPOLIS, R.; SICILIANO, R. A.; MAZZEO, M. F.; ABBRESCIA, A.; GNONI, A.; SARDANELLI, A. M.; PAPA, S. **Comparative secretome analysis of four isogenic *Bacillus clausii* probiotic strains.** *Proteome Science*, v. 11, n 28, p 1-14, 2013.

LJUNGH, A; WADSTROM, T. **Lactic acid bacteria as probiotics.** *Current issues in intestinal microbiology*, v. 7, n. 2, p. 73-90, 2006.

LOPETUSO, L. R.; SCALDAFERRI, F.; FRANCESCHI, F.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives.** *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 10, n 8, p. 943-948, 2016.

LOURENÇO, E. V.; LA CAVA, A. **Natural regulatory T cells in autoimmunity.** *Autoimmunity*, v. 44, n 1, p. 33–42, 2011.

LOVERDE, P.T. **Schistosomiasis.** *Digenetic Trematodes, Advances in Experimental Medicine and Biology* 1154, 2019.

MANSOUR-GHANAEL, F. DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. **Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis.** World Journal Gastroenterology, v. 9, n. 8, p. 1832-1833, 2003.

MARTINS, DEMETRIUS DA SILVA et al. **Schistosomiasis in Southern Brazil 17 years after the confirmation of the first autochthonous case.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 48, p. 354-357, 2015.

MCMANUS, D.P.; DUNNE, D.W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B.J.; ZHOU, X.N. **Schistosomiasis.** Nature Reviews. Disease Primers. Article citation ID: 4:13, 2018.

MÍNGUEZ, M.; BENAGES, A. **Diagnóstico del síndrome del intestino irritable.** Med Clin Monograf (Barc), v. 4, n. 2, p. 37-40, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Vigilância da Esquistossomose Mansonii.** 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção.** Disponível em: Acesso em: 28 dez. 2019.

MITRA, A. K.; MAWSON, A. R. **Neglected Tropical Diseases: epidemiology and global burden.** Tropical Medicine and Infectious Disease, v.2, n 36, p. 1-15, 2017.

MOHAMED, A. H.; OSMAN, G.Y.; ZOWAIL, M.E.; EL-ESAWY, H.M. **Effect of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on certain parasitological and molecular aspects in *Schistosoma mansoni* infected mice.** Journal of Parasitic Diseases, v. 40, n 3, p. 823–832, 2016.

MOHAMED, S. T.; KHALAF, K. J.; SULAIMAN, N. M. ***Lactobacillus salivarius* bacteriocin and supernatant activity against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo.** British Journal of Biology, Health and Medical Science Research, v. 3, n 1, p. 19-28, 2015.

MOUNTFORD, A. P.; TROTTEIN, F. **Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation.** TRENDS in Parasitology, v. 20, n 5, p. 221-226, 2004.

MUSIKASANG, H.; SOHSOMBOON, N.; TANI, A.; MANEERAT, S. **Bacteriocin-producing lactic acid bacteria as a probiotic potential from Thai indigenous chickens.** Czech Journal. Animal Science, v. 57, n 3, p. 137–149, 2012.

NASCIMENTO, G. L.; PEGADO, H. M.; DOMINGUES, A. L. C.; XIMENES, R. A. A.; ITRIA, A.; CRUZ, L. N.; OLIVEIRA, M. R. F. **The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of *schistosomiasis mansoni*.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v. 11, p1-19, 2019.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 13^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. **Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014.** Journal of Natural Products. 79 (3), 629-661, 2016.

NISTA, E. C.; CANDELLI, M.; CREMONINI, F.; CAZZATO, I. A.; ZOCCO, M. A.; FRANCESCHI, F.; CAMMAROTA, G.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. ***Bacillus clausii* therapy to reduce side-effects of anti-*Helicobacter pylori* treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial.** Aliment Pharmacol Ther, v. 20, p. 1181-11-88, 2004.

O'MAHONY, C.; SCULLY, P.; O'MAHONY, D.; MURPHY, S.; O'BRIEN, F.; LYONS, A.; SHERLOCK, G.; MACSHARRY, J.; KIELY, B.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, L. **Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kb activation.** Plos Pathogens, v. 4, n 8, 2018.

OLIVEIRA SC, FIGUEIREDO BC, CARDOSO LS, CARVALHO. **A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases.** Mucosal immunology, v. 9, n. 6, p. 1366-1371, 2016.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; DAVID, E. B.; RIBEIRO, C.; GUIMARAES, S.; MASSENO, A. P. B.; KATAGIRI, S.; SEQUEIRA, J. L. **Effect of *Bifidobacterium animalis* on mice infected with *Strongyloides venezuelensis*.** Revista Instituto Medicina Tropical, v. 56, n 2, p. 105-109, 2014.

ORIENTE, A.; FEDARKO, N. S.; PACOCHA, S. E.; HUANG, S. K.; LICHTENSTEIN, L. M.; ESSAYAN, D. M. **Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 292, n 3, 1999.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B. RELMAN, D. A. BROWN, P. O. **Development of the human infant intestinal microbiota.** PLoS Biology, v. 5, n 7, 2007.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. **The immunobiology of schistosomiasis.** Nature Reviews Immunology, v. 2, p. 1-13, 2002.

PERNAMBUCO, SECRETARIA DE SAÚDE. **Boletim esquistossomose.** Diretoria Geral de Controle de Doenças e Agravos. 2018.

PERRUCCI, S.; FICHI, G.; RICCI, E.; GALOSI, L.; LALLE, M.; ROSSI, G. **In vitro and ex vivo evaluation of the anti-*Giardia duodenalis* activity of the supernatant of Slab51 (SivoMixx).** PloS One, v. 14, n 3, 2019.

PICKERD, N.; TUTHILL, D. **Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment.** Postgrad Medical Journal, v. 80, p. 112–113, 2004.

PRADHAN, B.; GUHA, D.; NAIK, A. K.; BANERJEE, A. TAMBAT, S.; CHAWLA, S.; SENAPATI, S.; AICH, P. **Probiotics *L. acidophilus* and *B. clausii* modulate gut microbiota in Th1- and Th2-biased mice to ameliorate *Salmonella typhimurium*-induced diarrhea.** Probiotics and Antimicrobial proteins, v. 11, n 3, p. 887-904, 2019.

QUIGLEY, E. M. M.; FLOURIE, B. **Probiotics and irritable bowel syndrome: a rationale for their use and an assessment of the evidence to date.** Neurogastroenterology & Motility, v. 19, n. 3, p. 166-172, 2007.

REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M. T.; MCCORMICK, J. K. **Potential uses of probiotics in clinical practice.** Clinical Microbiology Reviews, v. 16, n4, p. 658-672, 2003.

RESTA-LENART, S.; BARRETT, K. E. **Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC).** Gut, v. 52, p. 988-997, 2003.

REY, L. **Esquistossomose mansônica: O parasito.** In: LUIS REY. (Org.). Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2011. p. 153-158.

RIGOTHIER, M. C.; MACCARIO, J.; GAYRAL, P. **Inhibitory activity of *Saccharomyces* yeasts on the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes *in vitro*.** Parasitol Res, v. 80, p. 10-15, 1994.

RINNINELLA, E.; RAOUL, P.; CINTONI, M.; FRANCESCHI, F.; MIGGIANO, G. A. D.; GASBARRINI, A.; MELE, M. C. **What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases.** Microorganisms, v. 7, n 1, 2019.

ROCHA, F. J. S. Pereira, C. L. D; De Melo, F. L, Soares, C. R. P; Paz, S. T; Giorgio, S. **Expressão do fator 1 α induzível por hipóxia na *leishmaniose tegumentar* humana causada por *Leishmania braziliensis*.** Annals of parasitology, v. 64, n. 1, 2018.

ROWLAND, I.; GIBSON, G.; HEINKEN, A.; SCOTT, K.; SWANN, J.; THIELE, I.; TUOHY, K. **Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components.** European Journal Nutrition, v. 57, p. 1-24, 2018.

RUTITZKY, L. I.; BAZZONE, L.; SHAINHEIT, M. G.; JOYCE-SHAikh, B.; CUA, D. J. STADECKER, M. J. **IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in *schistosomiasis* and for lesional expression of IL-17.** Journal Immunology, v. 180, p. 2486-2495, 2008.

RUTITZKY, L. I.; ROSA, J. R. L.; 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.** Journal Immunology, v. 175, p. 3920-3926, 2005.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. **Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ .** European Journal of Immunology, v. 41, p. 2677–2687, 2011.

SANTOS, J. F. M.; VASCONCELOS, J.; SOUZA, J. R.; COUTINHO, E. M.; MONTENEGRO, S. M. L.; AZEVEDO-XIMENES, E. **The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection.** Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical, v. 37, n. 6, 2004.

SCHNEEBERGER, P. H. H.; COULIBALY, J. T.; PANIC, G.; DAUBENBERGER, C.; GUEUNING, M.; FREY, J. E.; KEISER, J. **Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome.** Parasites and Vectors, v. 11, n 168, 2018.

SCHOLTE, R. G. C.; GOSONI, L.; MALONE, J. B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J. VOUNATSO, P. **Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models.** Acta. Tropica, v. 132, p. 57–63, 2014.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. **Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body.** PLoS Biology, v. 14, n 8, 2016.

SENESE, S. et al. **Molecular Characterization and Identification of *Bacillus clausii* Strains Marketed for Use in Oral Bacteriotherapy.** Appl. Environ. Microbiol., v. 67, n. 2, p. 834–839, 2001.

SHAINHEIT, M. G.; LASOCKI, K. W.; FINGER, E.; LARKIN, B. M. SMITH, P. M.; SHARPE, A. H.; DINARELLO, C. A.; RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. **The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1b.** Journal Immunology, v. 187, p. 5328–5335, 2011.

SILVIA, M. L. M.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F. G. C.; TEIXEIRA, K. M.; COUTINHO, E. M.; BRINKMAN, J.; GONÇALVES, I.; DOMINGUES, L. A. W.; DOMINGUES, A. L. C.; SHER, A.; WYNN, T. A. **Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of Interferon-g and Interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens.** The Journal of Infectious Diseases, v. 179, p. 1502–14, 1999.

SINGH, K. P.; GERARD, H. C.; HUDSON, A. P.; REDDY, T. R.; BOROS, D. L. **Retroviral Foxp3 gene transfer ameliorates liver granuloma pathology in *Schistosoma mansoni* infected mice.** Immunology, v. 114, p. 410–417, 2005.

SOUZA, F. P. C et al. **Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural.** Rev Bras Clin Med, v. 9, n. 4, p. 300–7, 2011.

SOUZA, F.J. et al. **Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis.** Mediators Inflamm, 2014.

SPILLER, R. **Probiotics and prebiotics in irritable bowel syndrome.** Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 28, n. 4, p. 385–396, 2008.

SPINOSA, Maria R. et al. **On the fate of ingested *Bacillus* spores.** Research in microbiology, v. 151, n. 5, p. 361–368, 2000.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. **CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis.** Immunological Reviews, v. 211, p. 39– 48, 2006.

TANAKA, M.; NAKAYAMA, J. **Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life.** Allergology International, v. 66, p. 515–522, 2017.

TAYLOR, J. J.; MOHRS, M.; PEARCE, E. J. **Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the th effector population.** Journal Immunology, v. 176, p. 5839–5847, 2006.

TAYLOR, V. H. **The microbiome and mental health: Hope or hype?** Journal Psychiatry Neuroscience, v. 44, n 4, p. 219–222, 2019.

TIBIRIÇA, S. H. C.; GUIMARÃES, F. B.; TEIXEIRA, M. T. B. **A esquistossomose mansoni no contexto da política de saúde brasileira.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 16, n. 1, p. 1375-1381, 2011.

TONG, J. L. et al. **Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during Helicobacter pylori eradication therapy.** Alimentary pharmacology & therapeutics, v. 25, n. 2, p. 155-168, 2007.

TURNER, J. D; JENKINS, G. R; HOGG, K. G; AYNLEY, S. A; PAVELEY, R. A; COOK, P. C; COLES, M. C; MOUNTFORD, A. P. **CD4+ CD25+ Regulatory Cells Contribute to the Regulation of Colonic Th2 Granulomatous Pathology Caused by Schistosome Infection.** PLoS Negl Trop Dis 5: e1269., 2011.

URDACI, M. C.; BRESSOLIER, P. PINCHUK, I. **Bacillus clausii probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities.** J Clin Gastroenterol, v. 38, p. 86-90, 2004.

VENTURA, L. L. A.; OLIVEIRA, D. R.; GOMES, M. A.; TORRES, M. R. F. **Effect of probiotics on giardiasis. Where are we?** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 54, n 2, p. 1-7, 2018.

VERMA ND, HALL BM, PLAIN KM, et al. Interleukin-12 (IL-12p70) Promotes **Induction of Highly Potent Th1-Like CD4(+)CD25(+) T Regulatory Cells That Inhibit Allograft Rejection in Unmodified Recipients.** Front Immunol.;5:190. 2014

VITETTA, L.; SALTZMAN, E. T.; NIKOV, T.; IBRAHIM, I.; HALL, S. **Modulating the gut micro-environment in the treatment of intestinal parasites.** Journal Clinic Medicine, v. 5, n 102, p. 1-11, 2016.

WEERAKOON, K. G. et al. **Advances in the diagnosis of human schistosomiasis.** Clinical microbiology reviews, v. 28, n. 4, p. 939-967, 2015.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. **Immunopathology of schistosomiasis.** Immunology Cell Biology, v. 85, n 2, p. 148–154, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. **Weekly Epidemiological Record. Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis: Number of People Treated in 2017.** <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276933/WER9350.pdf?ua=1> (Accessed 15 October 2019).

WYNN, THOMAS A; BARRON, L. **Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. In:** Seminars in liver disease. © Thieme Medical Publishers, p. 245-257, 2010.

YAMASHITA, T.; BOROS, D. L. **IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *schistosomiasis mansoni***. Journal Immunology, v. 149, p. 3659-3664, 1992.

YAOCHITE, J.N.U. **Imunidade aos agentes infecciosos**. Pósgraduação. 6f. Programa de pós-graduação em imunologia básica e aplicada. Ribeirão Preto, 2012.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. **CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System**. Immunity, v. 35, n 2, p. 161–168, 2011.

ZOWAIL, M. E. M.; OSMAN, G.Y.; ZOWAIL, M.E.; EL-ESAWY, H.M. **Protective role of *Lactobacillus sporogenes* (probiotic) on chromosomal aberrations and DNA fragmentation in *Schistosoma mansoni* infected mice**. Parasitology, v. 8, n 1, p. 121–130, 2012.

CALDAS, I. R. et al. **Human *schistosomiasis mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection**. Acta Trop, 108(2-3): 109-17, 2008.

LICHTENBERGOVA, L. et al. **Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis**. Parasite Immunol, 30(11-12): 585-95, 2008.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
 Fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br

Recife, 07 de julho de 2016.

Ofício nº 69/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.ª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
 Departamento de Medicina Tropical
 Centro de Ciências da Saúde
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.016405/2016-57

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos do *Bacillus clausii* sobre a esquistossomose mansoni: estudo da resposta imunológica, alterações intestinais e translocação bacteriana”, registrada com o nº 23076.016405/2016-57, sob a responsabilidade de Prof.ª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/06/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo <i>Swiss Mus musculus</i>
Nº de animais	50
Peso/idade	28-30g / 30 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do LIKA

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCS - UFPE
 UFPE - SIAPE 2801584