



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

YENER CRISTYELL VALLE ARANDA

**EFEITO IMUNO-MODULADOR DO *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) SOBRE
OS MARCADORES α -SMA, IL-25, IL-33 NO FÍGADO E INTESTINO DE
CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Recife

2022

YENER CRISTYELL VALLE ARANDA

**EFEITO IMUNO-MODULADOR DO *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) SOBRE
OS MARCADORES α -SMA, IL-25, IL-33 NO FÍGADO E INTESTINO DE
CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas (CCM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como requisito final para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa.

COORIENTADOR: Prof. Dr. André de Lima Aires.

Recife
2022

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

A662e Aranda, Yener Cristyell Valle
Efeito imuno-modulador do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) sobre os marcadores α -SMA, IL-25, IL-33 no fígado e intestino de camundongos com esquistossomose mansônica experimental / Yener Cristyell Valle Aranda. – 2022.
62 p. : il.

Orientadora: Vlândia 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. Imunomodulação. 2. Probióticos. 3. Fibrose. 4. Schistosoma. 5. *Bacillus clausii*. I. Costa, Vlândia Maria Assis (orientadora). II. Aires, André de Lima (coorientador). III. Título.

616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 124)

YENER CRISTYELL VALLE ARANDA

**EFEITO IMUNO-MODULADOR DO *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) SOBRE
OS MARCADORES α -SMA, IL-25, IL-33 NO FÍGADO E INTESTINO DE
CAMUNDONGOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas (CCM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como requisito final para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 30 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Virginia Maria Barros de Lorena (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE

Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)
Área acadêmica de Medicina Tropical, CCM-UFPE

Francisca Janaina Soares Rocha (Examinador Externo)
Área acadêmica de Medicina Tropical, CCM-UFPE

Quando a vida coloca em nossa frente inúmeras pessoas e situações, escolher as motivações que geraram este trabalho é uma tarefa difícil, então decidi dedicar este trabalho primeiro a uma motivação de vida primordial, aos que tem menos, a sociedade para quem nossas instituições acadêmicas servem, ao pedinte da rua, à travesti que todo dia tem o risco de perder a vida, as mães da comunidade, à quem trabalha na roça, à quem defende as florestas e a todos aqueles que não tem espaço em textos dessa natureza, provavelmente nunca saberão que dediquei esse trabalho a todos eles, sinto-me realizado apenas sabendo que o dediquei.

Dedico esse trabalho também ao frequente motivo das minhas orações, aos mais de 500 mortos de abril, presos políticos e quem ainda resiste na Nicarágua, em mãos da prepotência, o orgulho e a demência de alguns poucos; também quero colocar neste espaço aos milhões de pessoas que nos deixaram durante a pandemia, esse momento obscuro, ou melhor obscurantismo, que como cientista tivemos que confrontar com nosso compromisso com a verdade em quanto víamos ir embora amigos e familiares por culpa da negligencia e a estupidez de uns poucos.

Não podemos esquecer que fazer ciência é resistência, é altruísmo, que nossos resultados não são apenas valores de P, OR ou RR, também é dar esperança, salvar vidas, lutar por um mundo mais justo, trazer as verdades à tona por mais incômodas que sejam, é por isso que dedico este trabalho também a todos os pesquisadores que fazemos o esforço de ter um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

A todos que me ajudaram a dar os primeiros passos. Meus Professores de ensino fundamental, ensino médio e graduação, em especial Prof. René Silva.

A todos que acreditaram em mim antes de iniciar este desafio, Dra. Neema Kaseje. David Aldrete, Dra. Lucia Lira, Socorro Esther, Dra. Katy Seyedmadani.

À minha família na Nicarágua, aos meus pais Jacqueline e Dagoberto, meu irmão Alex Amauri e a minha família no Brasil, meu esposo Ádamo Brito, Minha Sogra Maria de Jesus e cunhada, Alessa Brito.

A quem me estendeu a mão em um país desconhecido, Flavio e Rutânia Monteiro.

Aos meus Colegas de turma, Aline, Tony, Claudia Albuquerque, Juliana Mané, Caroline Louise e Bruno Veras, por terem me encorajado a não desistir.

A quem me ajudou a materializar este projeto, Profa. Vláudia, Prof. André, Profa. Janaína, Prof. Jacinto Costa e Profa. Virginia.

As pulgas sonham em comprar um cão, e os ninguéns com deixar a pobreza, que em algum dia mágico de sorte chova a boa sorte a cântaros; mas a boa sorte não chova ontem, nem hoje, nem amanhã, nem nunca, nem uma chuvinha cai do céu da boa sorte, por mais que os ninguéns a chamem e mesmo que a mão esquerda coce, ou se levatem com o pé direito, ou comecem o ano mudando de vassoura.

Os ninguéns: os filhos de ninguém, os donos de nada.

Os ninguéns: os nenhuns, correndo soltos, morrendo a vida, fodidos e mal pagos:

Que não são embora sejam.

Que não falam idiomas, falam dialetos.

Que não praticam religiões, praticam superstições.

Que não fazem arte, fazem artesanato.

Que não são seres humanos, são recursos humanos.

Que não tem cultura, têm folclore.

Que não têm cara, têm braços.

Que não têm nome, têm número.

Que não aparecem na história universal, aparecem nas páginas policiais da imprensa local.

Os ninguéns, que custam menos do que a bala que os mata.

(GALEANO, 1995 Pg. 71)

RESUMO

A fibrose é um dos principais fatores relacionados a complicações decorrentes da dinâmica imunológica da esquistossomose, estudos recentes têm apontado que tanto a microbiota como probióticos tem a capacidade de influenciar na homeostasia tanto a nível sistêmico quanto local. Este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre probiótico e hospedeiro no contexto da esquistossomose experimental e o seu resultado na expressão de actina de músculo liso tipo α (α -SMA), as alarminas IL25 e IL-33 e avaliar a potencial regulação de citocinas inflamatórias IL-6, TNF α , MCP-1. Neste estudo os camundongos foram distribuídos em quatro grupos experimentais, separados de acordo com exposição cercariana e esquema terapêutico adotado: G1 (tratado e não infectado), G2 (infectado), G3 (infectado e tratado profilaticamente) e G4 (infectado e tratado após oviposição). IL-6, TNF α , MCP-1 foram avaliadas em sobrenadante de cultura esplênica com estímulo de *B.clausii* (Enterogerminal) e sem estímulo. Nos animais dos grupos experimentais foi realizada a avaliação in situ em fígado e intestino foi realizado por imunohistoquímica utilizando como marcadores IL-25, IL-33 e α -SMA com as seguintes diluições: 1:50, 1 μ g/ml e 1:600, respectivamente. A quantificação da área marcada foi mediante software de análise de imagem. Em nosso modelo experimental conseguimos observar potenciais efeitos moduladores em IL-25 e MCP-1 na coexistência da Esquistossomose mansônica e *Bacillus clausii*.

Palavras-chaves: imunomodulação; probiótico; fibrose; schistosoma; *Bacillus clausii*.

ABSTRACT

Fibrosis is one of the main factors related to complications resulting from the immunological dynamics of schistosomiasis. Recent studies have shown that both the microbiota and probiotics have the ability to influence homeostasis both systemically and locally. This study aimed to evaluate the interaction between probiotics and the host in the context of experimental schistosomiasis and its impact on the expression of smooth muscle actin type α (α -SMA), the alarmins IL25 and IL-33, and the potential regulation of inflammatory cytokines IL-6, TNF α , MCP-1. In this study, mice were divided into four experimental groups, separated according to cercarial exposure and therapeutic scheme adopted: G1 (treated and not infected), G2 (infected), G3 (infected and treated prophylactically), and G4 (infected and treated after oviposition). IL-6, TNF α , and MCP-1 were evaluated in splenic culture supernatant with and without *B. clausii* (Enterogermina) stimulation. In the animals of the experimental groups, in situ evaluation in the liver and intestine was performed by immunohistochemistry using IL-25, IL-33, and α -SMA as markers with dilutions of 1:50, 1 μ g/ml, and 1:600, respectively. The quantification of the marked area was performed using image analysis software. In our experimental model, we were able to observe potential modulatory effects on IL-25 and MCP-1 in the coexistence of *Schistosoma mansoni* and *Bacillus clausii*.

Keywords: immunomodulation; probiotic; fibrosis; schistosoma; *Bacillus clausii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição global da transmissão da esquistossomose	17
Figura 2 - Indicadores epidemiológicos da esquistossomose mansônica na região Nordeste do Brasil	19
Figura 3 - Distribuição espacial das taxas médias anuais bruta e bayesiana de mortes relacionadas à esquistossomose, por município de residência, Brasil, 2000-2011	20
Figura 4 - Análises dos clusters espacial e espaço temporal das taxas de mortes relacionadas à esquistossomose, por município de residência, Brasil, 2000-2011	20
Figura 5 - Análises dos clusters espacial e espaço temporal das taxas de mortes relacionadas à esquistossomose, por município de residência, Brasil, 2000-2011	22
Figura 6 - Grupos de camundongos Swiss western utilizados no experimento	35
Figura 7 - Fotos representativas de cortes marcados com anti-IL-25 por Imunohistoquímica, espécimes de Fígado e Intestino em 10x e 40x	40
Figura 8 - Fotos representativas de cortes marcados com anti-IL-33 por Imunohistoquímica, espécimes de Fígado e Intestino em 10x e 40x	42
Figura 9 - Fotos representativas de cortes marcados com anti- α -SMA por Imunohistoquímica, espécimes de Fígado e Intestino em 10x e 40x	43
Figura 10 - Correlação de Spearman entre as diferentes variáveis quantificadas por citometria de fluxo e análise de imagens de imuno-histoquímica	47
Gráfico 1 - Quantificação de área marcada por IHQ de IL-33, IL-25 e α -SMA entre os grupos experimentais	41
Gráfico 2 - Quantificação TNF- α , IL-6, MCP1 entre os grupos experimentais ...	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST	Aspartato transferase
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Grupamento de diferenciação
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DC	Células dendríticas
EG	Enerogermine
ESPID	sociedade Europeia de doenças infecciosas pediátricas
GGT	Gama glutamil-transferase
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular tipo 1
IFN γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina tipo M
IL	Interleucina
ILC2	Células linfoides inatas tipo 2
INPEG	Inquérito Nacional de Prevalência em Esquistossomose mansoni e Geo-helmintose
LDH	Desidrogenase láctea
LPS	Lipopolissacarídeos
M2	Macrófagos tipo 2
MCP-1	Proteína de quimioatração de monócitos tipo 1
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteínas de matriz
N/R	<i>B. clausii</i> resistente a novobiocina e rifampicina
O/C	<i>B. clausii</i> resistente ao cloranfenicol
PBS-BSA	Fosfato salino com albumina sérica bovina ao 1%
PZQ	Praziquantel
RMR	Região Metropolitana do Recife
SEA	Antígenos de ovos solúveis de <i>S. mansoni</i>
SIN	<i>B. clausii</i> resistente a neomicina e estreptomicina
SWAP	Preparação de antígenos solúveis de vermes adultos
T	<i>B. clausii</i> resistente a tetraciclina
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Células T auxiliares
TIFF	Formato de Arquivo de Imagem Rotulado
TIMPs	inibidores teciduais de metaloproteínas
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α

Treg	Células T regulatórias
TSLP	Linfoproteína estromal tímica
UFC	Unidades formadoras de colônia
VCAM-1	Proteína 1 de adesão celular vascular
A-SMA	Actina do Musculo Liso α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	RESPOSTA IMUNE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	22
2.2	MICROBIOTA INTESTINAL E ESQUISTOSSOMOSE.....	24
2.3	POTENCIAL IMUNOMODULADOR DOS PROBIÓTICOS.....	25
2.4	BACILLUS CLAUSII.....	28
2.5	PERGUNTA CONDUTORA.....	30
2.6	JUSTIFICATIVA.....	30
2.7	HIPÓTESES	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	METODOLOGIA:	33
4.1	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	33
4.1.1	Condições de cultivo e obtenção do <i>Bacillus clausii</i>	33
4.1.2	Administração do <i>Bacillus clausii</i>	33
4.1.3	Infecção e parasitológico de fezes.....	33
4.1.4	Animais e formação dos grupos experimentais	34

4.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
4.2.1	Grupos não infectados	34
4.2.2	Grupos infectados	34
4.2.3	Imunohistoquímica (IHQ) e análise de imagem	35
4.3	CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO 37	
4.4	ENSAIO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO – IL-6, MCP-1, TNFA.	37
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	DETERMINAÇÃO DE IL-25, IL33 E ASMA EM FÍGADO E INTESTINO POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	39
5.2	NÍVEIS DE TNF-A, IL-6 E MCP-1 EM CULTURAS ESPLÊNCIAS	43
5.3	CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES TNF-A, IL-6 E MCP-1, IL-33, IL-25 E A-SMA	45
6	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A – PARECER DO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS UFPE	62

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma infecção helmíntica de elevada prevalência no mundo atingindo cerca 200 milhões de indivíduos. Os ovos de *S. Mansoni*, representam a principal causa de morbidade por conta das complicações em órgãos e uma série de sintomas clínicos devido ao tropismo específico da espécie (BURKE et al., 2009; ANTHONY et al., 2010). Os casais de vermes adultos residem no sistema de vasos mesentéricos onde realizam sua postura de ovos. Estes ovos são translocados pela parede do intestino para serem eliminados nas fezes. Este processo é modulado pelo sistema imunológico do hospedeiro. Após deposição dos ovos ocorre uma mudança no padrão de resposta imune que antes da postura de ovos é Th1 e modifica para um padrão Th2. Este processo é caracterizado pela formação do granuloma e subsequente fibrose (SCHWARTZ C & FALLON, 2018).

A fibrose é particularmente dependente da resposta Th2 e envolve principalmente as citocinas IL4, IL5 e IL13 (PEARCE et al 1991). Um estudo relatou que baixas concentrações de Interleucinas (IL-6, IL-10), Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e quimocinas se encontravam em formas mais severas de fibrose em pacientes diagnosticados com esquistossomose, ao contrário o que é relatado para IL-13, que é descrito como um fator pro fibrótico importante e principal causa de morbidade e mortalidade na doença (KAMDEM et al., 2018; MUTENGO et al., 2018). Tanto o ovo como o verme adulto compartilham um mesmo nicho com a microbiota do hospedeiro e é um fator a tomar em conta quando falamos de mediadores inflamatórios e durante a esquistossomose tem sido relatado uma composição da microbiota colitogénica (JENKINS et al., 2018; FLOUDAS et al., 2019).

A capacidade imunomoduladora de Th1/Th2/Th17/Treg tanto pela microbiota como de probióticos ou seus derivados tem sido descrito em modelos recente de Colitis (WADDELL et al., 2015; VEGA-MAGAÑA et al., 2018; SATO et al., 2020; JEONG et al., 2021); os mecanismos locais que levam a polarizar a resposta inata trazem à tona o papel de três alarminas: IL-25, IL-33 e Linfoproteína estromal tímica (TSLP), a partir disso estudos tem descrito que elas poderiam mediar um resposta

anti-inflamatória e ativação de células linfoides inatas tipo 2 (ILC2), fonte importante de IL-13 (GERBE et al., 2016; VON MOLTKE et al., 2016b, 2016a; BANERJEE; COFFEY; LAU, 2018; BANERJEE et al., 2018; HAYAKAWA; WANG, 2018; NADJSOMBATI et al., 2018; SCHNEIDER et al., 2018a; ZHU et al., 2019; MCGINTY et al., 2020a); em outro modelo experimental, durante a infecção por *Schistosoma mansoni* a produção dessas alarminas demonstraram ter funções redundantes com aumentos de IL-25 e TSLP, dependente da ovipostura, mas não de IL-33 (MUKENDI et al., 2021).

B. Clausii demonstrou ter mecanismos de competição principalmente com Gram-positivos e gerar mudanças na diversidade microbiana intestinal com o intuito de estabelecer efeitos anti-inflamatório (URDACI; BRESSOLLIER; PINCHUK, 2004; BOUHSS et al., 2009; PRADHAN et al., 2019), a expressão de interleucinas como IL-13 e IL-1 β foram relatadas em conjunto a uma redução de genes de IL-6 em pacientes com esofagite. Em uma coorte com pacientes diagnosticados com Artrite reumatoide e tratados com probióticos, mistura *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, observou-se uma inibição da produção de interleucinas tais como TNF- α , IL17 e também IL-6 (CANNARELLA et al., 2021).

Em um estudo prévio de nossa equipe de pesquisa foi avaliada a modulação sistêmica dos perfis pro inflamatória, Anti-inflamatória e regulatória, encontrando uma regulação conjunta e importante dos perfis Th1 e Th2 assim como melhoras nos parâmetros parasitológicos em camundongos que foram tratados com *B. Clausii* (CRUZ, 2020), mostrando que o uso deste probiótico durante a oviposição consegue ter um efeito imunomodulador, pelo descrito nas evidências atuais a polarização da resposta imune para Th1 ou Th2 parece ter efeitos antagônicos em relação a fibrose, restando comprovar se esse fenômeno é influenciado com relação a resposta pro inflamatória.

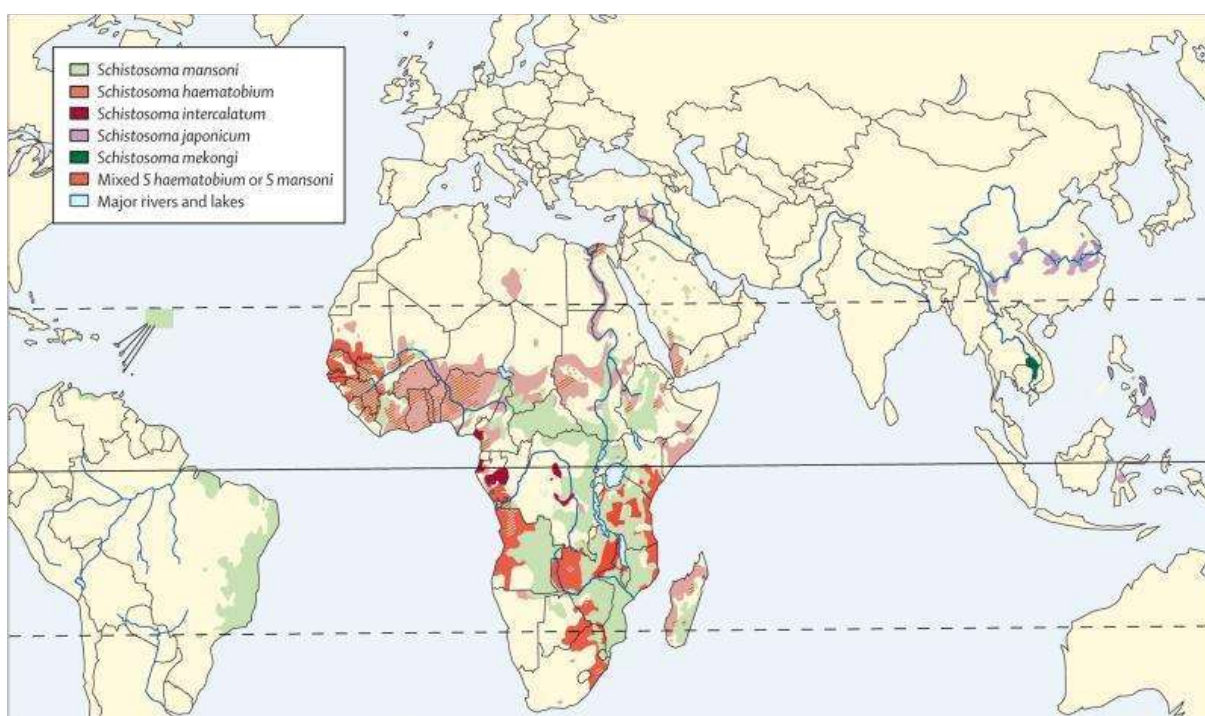
Tomando em conta que as evidências atuais não consideram os efeitos imunomodulatório compartilhados entre Probióticos e esquistossomose neste trabalho pretendemos correlacionar o efeito sistêmico sobre IL-6, Proteína de quimioatração

de monócitos tipo 1 (MCP-1) e TNF- α , e a identificação in situ de Actina do Músculo liso α (α -SMA) e duas alarminas (IL-25 e IL-33) em modelo experimental de esquistossomose com intervenção terapêutica de *B. Clausii* (O/C, N/R, T e SIN).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na perspectiva global, 219,9 milhões de pessoas e um total de 52 países requereram medicação profilática em 2017 (WHO, 2018) sendo a África a região mais atingida contendo 42 países endêmicos (Figura 1) (INOBYA et al., 2014). No entanto nas Américas 25 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença relatando-se 10 países atingidos. A lista de países afetados também inclui: Brasil, Venezuela, Suriname, Santa Lucia, Antígua e Barbuda, Guadalupe, Martinica, Montserrat e Porto Rico, esses últimos quatro com possível redução da doença, e finalmente Republica Dominicana que atualmente está coletando as evidencias disponíveis para provar a interrupção da esquistossomose (OMS/OPS, 2016).

Figura 1 - Distribuição global da transmissão da esquistossomose



Fonte: COLLEY et al. (2014). Adaptado de Gryseels et al. (2006).

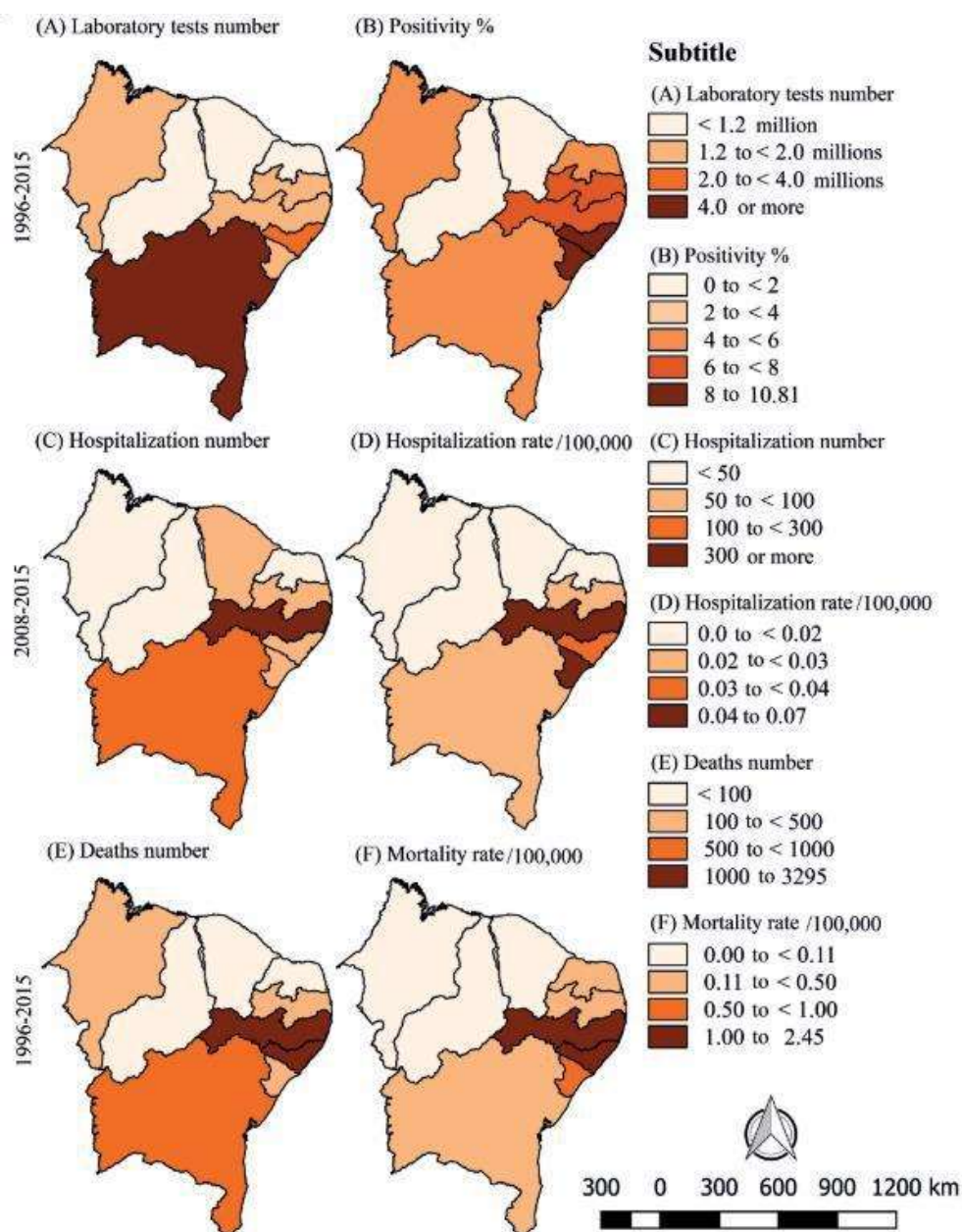
No Brasil a infecção pelo *S. Mansoni* é considerada um problema de saúde pública em 19 estados, como resultado Brasil é considerado o país de América Latina com maior transmissão (BRASIL, 2014). Em 2015 o Inquérito Nacional de Prevalência

em Esquistossomose mansônica e Geo-helmintose (INPEG) Foram examinados 197.564 escolares residentes em 521 municípios, nas 27 Unidades de Federação e no Distrito Federal; nesse ano passaram de 19 estados categorizados como endêmicos para 14 e o Distrito Federal, os estados negativos neste INPEG foram Ceará, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul caindo para cerca de 1% de positividade (KATZ, 2018).

Inicialmente, a esquistossomose era endêmica de áreas rurais, contudo devido a migração humana, a transmissão está acontecendo também em grandes centros urbanos e concentrando as altas taxas de prevalência na região Nordeste (CALASANS et al., 2018) (Figura 2).

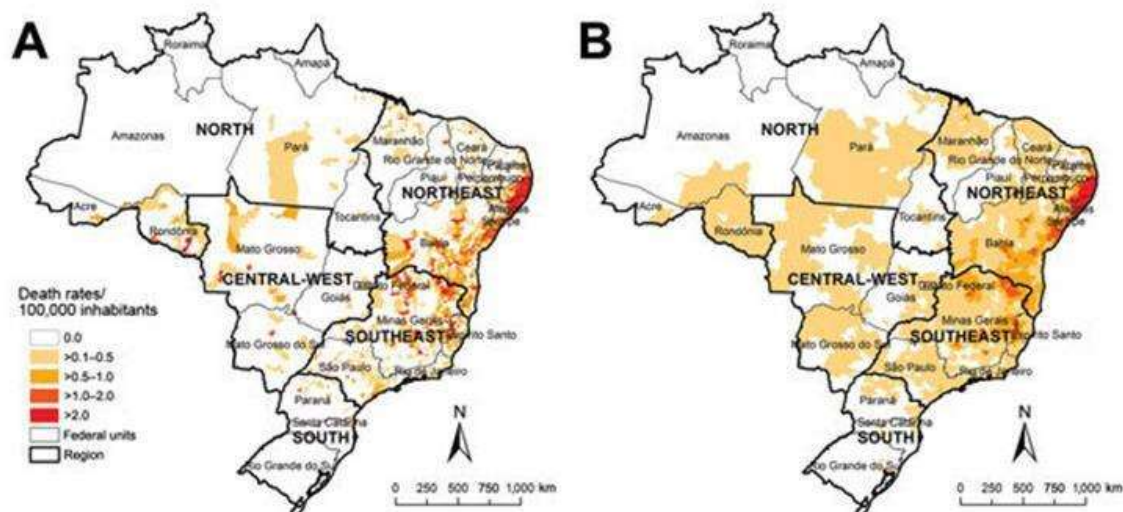
Dos dez estados, quatro acumularam 91,5% (n=6.029) dos óbitos nessa região entre 1996 e 2015; foram eles: Pernambuco (n=3,295; taxa=1,94/100,000), Alagoas (n=1,463; taxa=2,45/100,000), Sergipe (n=277; taxa=0,69/100,000) e Bahia (n=994; taxa=0,35/100,000). Por serem óbitos potencialmente evitáveis, a taxa de mortalidade representa um dos indicadores mais sensíveis em termos de implementação de medidas de saúde pública para o controle e vigilância da esquistossomose (FEITOSA DA SILVA et al., 2018); nesses 19 anos, o estado de Pernambuco registrou uma série de testes laboratoriais inferiores a 2 milhões, mas apresentou as maiores taxas de mortalidade (Figura 3). Já Martins-Melo et al., (2015) identificaram esse padrão de comportamento nos dados utilizando como série temporal dados de 2000-2011 identificando, por meio de análise espacial e espaciotemporal, cluster de alto risco para óbitos relacionados a esquistossomose, particularmente nos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia (Figura 4).

Figura 2 - Indicadores epidemiológicos da esquistossomose mansônica na região Nordeste do Brasil



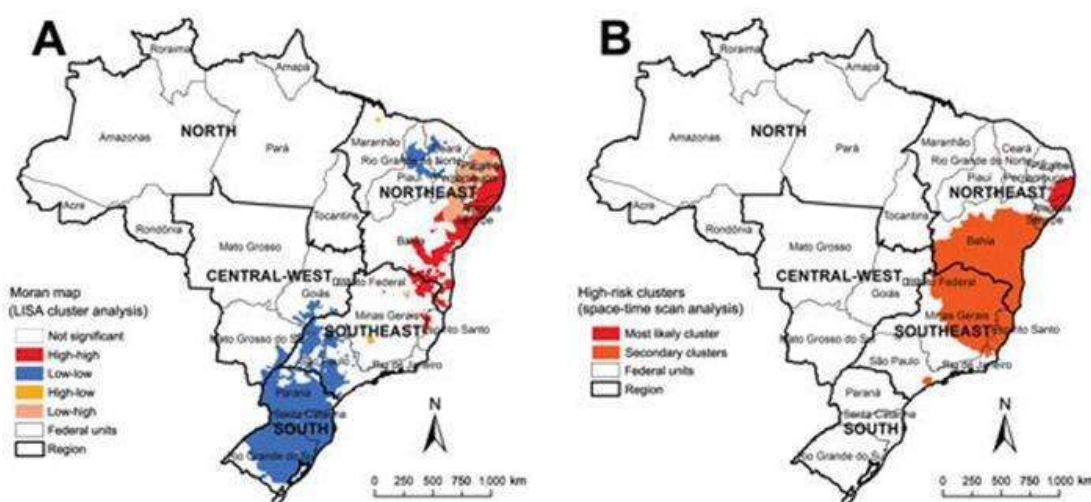
Fonte: FEITOSA DA SILVA et al. (2018). Legenda: (A) Testes laboratoriais (B). Percentual de positividade (C). Internação (D). Taxa de internação (E).

Figura 3 - Distribuição espacial das taxas médias anuais bruta e bayesiana de mortes relacionadas à esquistossomose, por município de residência, Brasil, 2000-2011



Fonte: Martins-Melo et al. (2015). Legenda: (A) Distribuição espacial da média anual bruta de mortes relacionadas à esquistossomose. (B) Taxas bayesianas suavizadas de mortes relacionadas à esquistossomose.

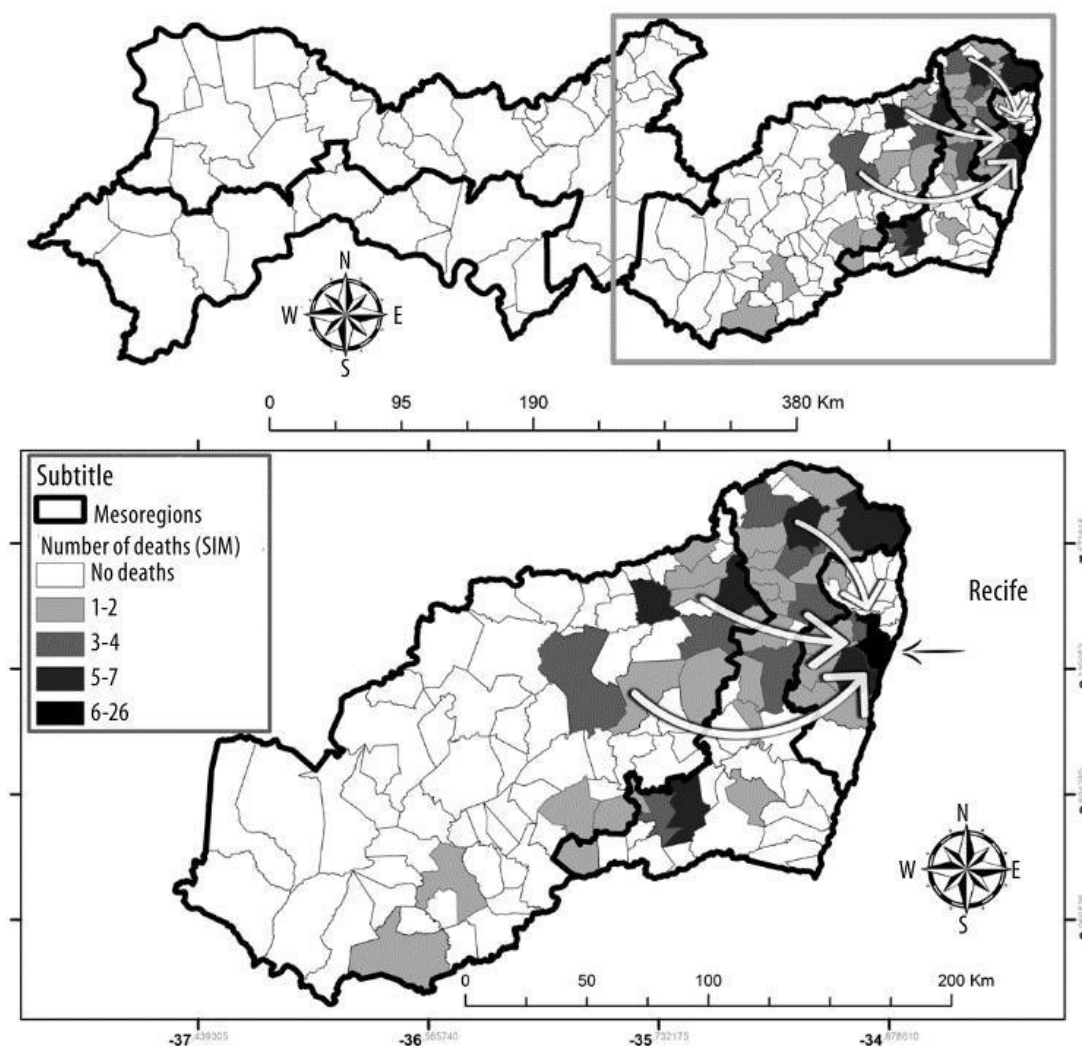
Figura 4 - Análises dos clusters espacial e espaço temporal das taxas de mortes relacionadas à esquistossomose, por município de residência, Brasil, 2000-2011



Fonte: Martins-Melo et al. (2015). Legenda: (A) Análise de cluster LISA (Mapa de Moran), com base no índice I de Moran local. (B) Análise de clusters espaço-tempo, calculado usando estatística de Kulldorff.

Entre 2010 e 2014, a taxa de mortalidade de Pernambuco diminuiu de 2,23 para 1,51 (para cada 100 mil habitantes). No entanto, a prevalência neste estado está concentrada principalmente na mesorregião da Zona da mata e afetando as classes econômicas C e D (FACCHINI et al., 2018), o que concorda com os dados encontrados por Oliveira et al. (2018) no Hospital das Clínicas do Recife, onde o 50,4% dos casos foram infectados na Zona da Mata, 33,6% na Região Metropolitana (RMR) e 20,8% no Agreste (Figura 5) e apenas 20,8% dos óbitos em Recife não tinham antecedentes informados (pelos familiares) de viagem para áreas endêmicas. Os dados mais recentes em quanto a incidência (2015-2016) apontam a importância epidemiológica tanto da zona da mata como Região Metropolitana, nos quais se reportaram nos Municípios de: Escada, Aliança, Jaboatão dos Guararapes, São Lourenço da Mata e Recife notáveis frequências de casos positivos.

Figura 5 - Análises dos clusters espacial e espaço temporal das taxas de mortes relacionadas à esquistossomose, por município de residência, Brasil, 2000-2011



Fonte: Oliveira et al. (2018).

2.1 RESPOSTA IMUNE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Para compreender a imunopatologia da esquistossomose mansônica é necessário entender a interação do verme e do hospedeiro e seus fatores. No caso do *S. Mansoni* são importantes fatores como a cepa, a fase evolutiva, a intensidade e o número de infecções e do lado do hospedeiro participam a constituição genômica, órgão predominantemente lesado, padrão alimentar, etnia, reativação da doença,

tratamento específico, infecções associadas, sensibilização in útero e o perfil imunitário antes, durante e após a infecção, talvez este último seja o fator mais importante na determinação e evolução das formas anátomo clínicas (SOUZA et al., 2011).

A resposta imune contra a cercaria e possivelmente de outros estágios do ciclo de vida da parasita são importantes para o desenvolvimento de resistência ante reinfecções, enquanto as respostas aos antígenos do ovo são responsáveis pela patologia na esquistossomose (MCMANUS et al., 2018). Antes que a produção de ovos possa começar, os esquistossomulos de *S. Mansoni* precisam amadurecer até a idade adulta enquanto navegam da pele, através dos pulmões para, aproximadamente 4-6 semanas pós-infecção, chegar até as veias mesentéricas do intestino o qual é o sitio de oviposição. Nesta fase de migração a resposta imune é caracterizada pelo aumento de Interferon gama (IFN γ) e de IL12. Após os vermes alcançarem a maturidade e as fêmeas iniciarem a postura de ovos, a resposta imune modifica para um perfil Th2, com aumento das citocinas IL4, IL5 e IL13 (Schwartz et al. 2018) Os ovos quando colocados em contato próximo com o endotélio, provavelmente se ligam às moléculas de adesão da superfície endotelial, incluindo a Molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1), Proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM-1) e E-selectina, Além disso, existem evidências que o ICAM-1 não apenas medeia a ligação dos ovos, mas também participa da geração de inflamação granulomatosa ao redor dos ovos dos parasitas, regulando o tráfego de leucócitos, a permeabilidade vascular e modulando a resposta das células T a antígenos de ovos solúveis de *S. Mansoni* (SEA)(COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018).

A formação do granuloma ao redor dos ovos presos no tecido hepático e intestinal é um distintivo da infecção pelo esquistossomo e a principal causa de patologia nos hospedeiros infectados. No entanto, o granuloma do ovo funciona tanto para o hospedeiro quanto para o parasita: A inflamação granulomatosa intestinal facilita o processo de translocação do ovo para o lúmen gastrointestinal; melhora a translocação bacteriana do intestino para a circulação do hospedeiro; protege os tecidos do hospedeiro de respostas imunes exageradas contra os ovos antigênicos e

finalmente beneficia os parasitas adultos para manter o hospedeiro intacto (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A reação granulomatosa desencadeada pelo ovo é orquestrado inicialmente pelas células T CD4+ e possivelmente as células T CD8+, B e M2 também apresentam um papel importante na formação desse, No entanto a geração da eosinofilia tecidual é mediada pelas citocinas tipo 2 (IL5 e IL13) (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). SCHWARTZ et al., (2014) demonstraram que as células T são fontes críticas dessas citocinas tanto para a formação do granuloma como para a prevenção de infecção letal precoce, porém os níveis, no caso da IL-13, são potencializados mediante a ativação das células linfoides inata tipo 2 (ILC2) (VON MOLTKE et al., 2016).

A lesão tecidual que induz a liberação das alarminas IL-25, IL-33 e Lipoproteína estromal tímica (TSLP) é um potente mecanismo que conduz a imunidade do tipo 2. O TSLP regula as células dendríticas (DC), Basófilos, Células Mastoides, monócitos, Natural Killer e ILC2; enquanto IL-25 e IL-33 exibem similar atividade promotora de Th2 principalmente estimulando ILC2s, basófilos, mastócitos e eosinófilos (HE; PAN; FEN DONG, 2018). No caso do intestino, nos últimos anos foram descrito o possível mecanismo da ativação das ILC2 mediado por alarminas liberadas pelas Células Tufo (GERBE et al., 2016; HOWITT et al., 2016; NADJSOMBATI et al., 2018; SCHNEIDER et al., 2018). No fígado, em resposta da lesão tecidual, as células estreladas hepáticas (HSC) sofrem transdiferenciação em células ativadas do tipo miofibroblastos que produzem componentes da Matriz Extracelular (MEC), além de citocinas fibrogênicas, metaloproteinases de matriz (mmps) e inibidores teciduais de metaloproteinases (timps) (BURKE et al., 2009).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL E ESQUISTOSSOMOSE

Os seres humanos nascem e se desenvolvem na coexistência com micróbios e ao nascer somos completamente estéreis e sem a resposta imune adequada para nossos comensais até que somos imediatamente colonizados por micróbios do ambiente local durante o nascimento, mas, diante desse influxo de invasores não

próprio, nosso sistema imunológico rapidamente se adapta e se desenvolve. (LAWLEY; WALKER, 2012).

Em geral, a ecologia da microbiota do intestino está constituída tanto por organismos anaeróbios (Bifidobacterium, Clostridium, Bacteroides, Eubacterium) como aeróbios (Escherichia, Enterococcus, Streptococcus, Klebsiella) (MISHRA; MISHRA, 2018). No contexto da esquistossomose mansônica as infecções são acompanhadas de mudanças profundas na composição da microbiota intestinal no momento da produção dos ovos (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018), porém SCHNEEBERGER et al.(2018) dentro de suas descobertas concluíram que a relação entre os indicadores usuais da microbiota intestinal e a presença de *S. Mansoni* são relativamente sutis e que possivelmente ocorre a interferência de outros fatores, como nutricionais em combinação com fatores próprios do hospedeiro evidenciando a complexidade de elucidar os fatores extrínsecos com capacidade de modificar a qualidade da microbiota intestinal em humanos.

Em contrapartida, ZHAO et al., (2019) mediante o controle dos fatores extrínsecos num modelo experimental conseguiram avaliar a composição da microbiota em relação ao desenvolvimento de granuloma intestinal por *S. Japonicum* em camundongos C57BL/6 e BALB/c, dentro da pesquisa relataram, com base na análise da diversidade alfa, que a riqueza e a diversidade da microbiota intestinal em amostras fecais de ambas linhagens foram visivelmente alteradas após a infecção por *S. Japonicum* e que o microbioma intestinal ao nível do filo em não infectados e infectados foi dominado por Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria correspondendo com os filos dominantes em pesquisas realizadas previamente sob a microbiota humana (KAY et al., 2015; SCHNEEBERGER et al., 2018).

2.3 POTENCIAL IMUNOMODULADOR DOS PROBIÓTICOS

Alterar a composição da microbiota intestinal pode ser uma nova forma de abordar tratar e prevenir determinadas enfermidades com impacto na saúde do indivíduo (KÖNIG et. Al, 2014; STERN et. Al, 2018). Uma das formas de alteração da

microbiota consiste na utilização de microrganismos probióticos. Probióticos são microrganismos que quando administrados em uma concentração recomendada são capazes de trazer benefícios à saúde (HILL et al., 2015).

Para um determinado microrganismo ser considerado como probiótico, alguns critérios devem ser levados em consideração: 1) não ser patogênico, 2) possuir evidências quanto ao seu benefício biológico e 3) possuir resistência ao pH estomacal e aos sais biliares (HARZALLAH et. Al, 2013). Várias espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são comumente utilizadas como probióticos, 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. Os microrganismos probióticos exercem seus benefícios por diversos mecanismos de ação, dos quais podemos citar: 1) manutenção e reparo na barreira intestinal e junções intracelulares (HSIEH et al., 2015; RESTA-LENERT et. Al, 2003); 2) modulação da microbiota via competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos (FIJAN et al., 2016; MUSIKASANG et al., 2012); 3) aumento da absorção e metabolização de nutrientes como o cálcio, proteínas e ácidos graxos de cadeias curtas; 4) modulação do metabolismo microbiano por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática (ALMEIDA et al., 2012; DUBEY et al., 2018; IRVINE et. Al 2011; LEBLANC et al., 2017); 5) estimulação do sistema imune do hospedeiro a partir do aumento da frequência de linfócitos B e níveis aumentados de imunoglobulinas (principalmente iga); 6) aumento ou diminuição da atividade de macrófagos e células dendríticas, e estimulação de células T auxiliares e regulatórias (DRAKES et al. 2004; FOLIGNE et al., 2007; KIM et al., 2014; KONIECZNA et al., 2012; O'MAHONY et al., 2008).

Kirte et al. (1996) demonstraram que o *Corynebacterium parvum*, administrado via intraperitoneal em camundongos C57Bl/10 infectados com *S. Mansoni*, reduziu em 44% a carga parasitária do grupo sob intervenção terapêutica em esquema profilático. Ainda ao avaliar a reação tecidual e quimiotaxia in vivo, foi visto maior influxo de polimorfonucleares nos grupos profilático e curativo em comparação com infectado não tratado. A análise histopatológica não demonstrou diferença significativa quanto ao

diâmetro e quantidade dos granulomas hepáticos e intestinais. Os autores concluíram que o aumento da quimiotaxia leucocitária pode ser uma das justificativas para o aumento da resposta de proteção contra *S. Mansoni* observada no grupo profilático.

Santos et al. (2004) demonstraram que camundongos machos C57Bl/10, infectados com *S. Mansoni*, obtiveram redução de 61% da carga parasitária com o tratamento oral com 10^9 CFU/ml cultura da *Zymomonas mobilis* em esquema terapêutico curativo (início do tratamento após 7 dias de infecção). Nesse estudo, nenhuma diferença estatística significativa foi observada nos pesos do baço e fígado dos camundongos dos grupos infectados com *S. Mansoni*. Entretanto esses resultados não estão de acordo com os resultados obtidos por Ghanem et al. (2005) que demonstraram em camundongos Swiss Webster infectados com 100 cercárias de *S. Mansoni*, 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 aspartato transferase (AST), desidrogenase láctea (LDH) e gama glutamil-transferase (GGT) (marcadores de dano hepático) próximo aos níveis encontrados no grupo não infectado. Além disso, verificaram que a suplementação com esse alimento exercia efeitos imunomoduladores significativos, ao estimular aumento da resposta de imunoglobulina tipo M (igm) contra a preparação de antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP), antes e após a infecção por *S. Mansoni*.

Mohamed et al. (2016), estudaram o efeito protetivo do *Lactobacillus sporogenes* 415722 e/ou PZQ em camundongos CD-1 machos albinos infectados com *S. Mansoni*. Demonstrou-se que a combinação entre PZQ e *L. Sporogenes* 415722 reduziu a contagem de vermes e modificou o padrão de ovoposição com aumento da quantidade de ovos mortos na parede do intestino. Além disso, observações histológicas mostraram redução significativa dos valores médios dos diâmetros de granuloma no fígado e intestino em camundongos infectados tratados com PZQ e/ou *L. Sporogenes* 415722. Quando analisado os danos moleculares foi visto que a administração de *L. Sporogenes* 415722 em camundongos infectados, reduziu o dano no DNA provocado pela infecção (quebra de fitas simples e apoptose durante o ciclo

celular) em comparação com aqueles infectados, não tratados e infectados tratados com PZQ. Zowail et al. (2012), utilizaram o mesmo probiótico e modelo experimental, demonstrou que a administração de *L. Sporogenes* reduziu significativamente as aberrações cromossômicas (deleção da cromátide, fragmentação do anel cromossômico, fusão concêntrica) induzidas pela infecção ou tratamento com PZQ.

Poucos estudos avaliaram os potenciais efeitos dos probióticos sobre a esquistossomose, aqueles que os fizeram, ficaram restritos a análise de alguns aspectos moleculares e parasitológicos da doença. Porém, para compreensão dos possíveis mecanismo de ação dos mesmos no processo patológico da doença, faz-se necessário além do estudo parasitológico, a análise do sistema imune relacionado ao processo de imunopatogênese e gravidade da doença.

2.4 BACILLUS CLAUSII

Atualmente os probióticos mais utilizados e estudados são bactérias ácido-láticas não formadoras de esporos como *Lactobacillus spp.* E *Bifidobacterium spp* (HARZALLAH et al., 2013; LJUNGH et al., 2006). Porém, probióticos do gênero *Bacillus*, apresentam vantagens documentadas sobre essas bactérias, principalmente por serem administrados na forma de esporos. Os esporos são extremamente resistentes e estáveis, o que garante a sobrevivência do probiótico ao baixo pH da barreira gástrica, e assegura que o mesmo chegue na dose ingerida e intacto ao intestino. Além disso, podem ser armazenados em temperatura ambiente sem ocorrer efeitos deletérios na sua viabilidade até a administração (CUTTING, 2011).

Enterogermina® Sanofi-Aventis spa, é uma suspensão probiótica aquosa constituída por esporos de quatro cepas de *Bacillus clausii*: O/C, N/R, T e SIN. As cepas são assim designadas devido a seu perfil de resistência aos antimicrobianos: O/C resistente ao cloranfenicol, N/R resistente a novobiocina e rifampicina, T resistente a tetraciclina e SIN resistente a neomicina e estreptomicina (SENESI et al., 2001). Nenhum dos genes envolvidos nos mecanismos de resistência atribuídos as cepas do *B. Clausii*, está associado a um elemento plasmidial móvel conhecido, não

havendo assim transferência horizontal desse material genético para bactérias patogênicas e/ou comensais (BOZDOGAN et al., 2003). Ao analisar o secretoma, demonstrou-se que proteínas são diferencialmente expressas por cada cepa apesar da similaridade genotípica, o que poderia conferir funções probióticas específicas; porém os efeitos clínicos globais da administração do Enterogermina®, são atribuídos a soma dos componentes metabólicos produzidos por cada cepa presente na formulação (LIPPOLIS et al., 2013).

Ghelardi et al., (2015), demonstraram em estudo com voluntários saudáveis, que após administração em dose única de Enterogermina®, *B. Clausii* foi capaz de chegar viável ao intestino onde sofreu germinação e multiplicação e pôde ser encontrado nas fezes por até 12 dias. A quantidade de células e/ou esporos recuperados nas fezes, variou de acordo com a cepa. De fato, a quantidade de *B. Clausii* cepas O/C, N/R e SIN recuperado, foi igual ou até maior que a dose administrada, enquanto que a cepa T desapareceu rapidamente ou não foi detectada. Além disso, a cepa NR foi isolada de todos os voluntários por mais tempo. Os autores concluem que o comportamento diferenciado entre as cepas OC, NR, SIN e T no intestino de voluntários saudáveis não implica, necessariamente, que elas mantenham o mesmo comportamento em pacientes que sofram de doenças gastrointestinais ou que foram submetidos a tratamento com antibióticos. Os benefícios clínicos obtidos com probióticos são principalmente atribuídos a produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, e ao seu potencial imunomodulatório. Em um estudo in vitro realizados em células isoladas de camundongos Swiss e C57B1/6j, Urdaci et al. (2004), demonstraram que o *B. Clausii*, produziu uma substância similar a bacteriocina (não caracterizada no estudo) durante a fase estacionária de crescimento e esporulação, que possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium difficile*. Outro estudo realizado por Bouhss et al. (2009), demonstrou-se que o *B. Clausii* é capaz de produzir e secretar a Clausina um antibiótico tipo A (bacteriocina classe I), que interage com intermediários lipídicos essenciais para a biossíntese de ácidos lipotécóicos e outros polímeros presentes na parede celular de bactérias Gram-positivas.

Di Caro et al. (2005), após avaliarem o padrão de expressão genética em pacientes com esofagite tratados com *B. Clausii*, demonstraram o papel desse probiótico em desencadear uma resposta imune do tipo Th2, com 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. Outro estudo realizado por Ciprandi et al. (2005), utilizando crianças com rinite alérgica, na qual o *B. Clausii* foi capaz de reduzir os níveis de IL-4 e eosinófilos e aumentar a produção de IFN- γ e IL-12. Além disso, foi visto aumento de IL-10, Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), que poderiam levar a modulação e ativação de células Treg. Em um estudo recente Dar et al. (2018), utilizando camundongos BALB/c com osteoporose pós menopausa, e demonstraram que o *B. Clausii* Enterogermina® aumentou a produção de IL-10 e de células Treg (CD4+Foxp3+), ao passo que inibiu simultaneamente a ativação de células Th17 (CD4+ror γ t) e a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-17 e TNF- α .

2.5 PERGUNTA CONDUTORA

O *Bacillus clausii* é capaz de modular a produção de IL25, IL33 e α -SMA na infecção experimental com *Schistosoma mansoni* ou estimula citocinas de perfil pró-inflamatório?

2.6 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, causando graves consequências para a saúde. O uso de probióticos, como o *Bacillus clausii*, tem sido estudado como uma abordagem terapêutica para ajudar a modular a resposta imunológica e reduzir os danos causados pela doença. No entanto, há poucos estudos que avaliam os efeitos específicos do *Bacillus clausii* sobre marcadores imunológicos e inflamatórios no fígado e intestino de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*. Portanto, esta dissertação tem como objetivo avaliar o efeito imunomodulador do *Bacillus clausii* em camundongos infectados com esquistossomose mansônica, investigando a

expressão dos marcadores IL25, IL33 e α -SMA nos tecidos hepático e intestinal, bem como a produção de marcadores pró-inflamatórios. Os resultados obtidos podem fornecer informações importantes sobre a eficácia do *Bacillus clausii* como uma terapia adjuvante no tratamento da esquistossomose mansônica.

2.7 HIPÓTESES

H0: *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) não apresenta efeito imunomodulador sobre os marcadores IL25, IL33 e α -SMA, no fígado e intestino de camundongos com esquistossomose mansônica tratados e não tratados com Enterogermina® e sobre a produção sistêmica de marcadores pró-inflamatórias.

H1: *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) apresenta efeito imunomodulador sobre os marcadores IL25, IL33 e α -SMA, no fígado e intestino de camundongos com esquistossomose mansônica tratados e não tratados com Enterogermina® e sobre a produção sistêmica de marcadores pró-inflamatórias.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação do efeito imunomodulador do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) sobre os marcadores IL25, IL33 e α -SMA, no fígado e intestino de camundongos com esquistossomose mansônica tratados e não tratados com Enterogermina® e sobre a produção sistêmica de marcadores pró-inflamatórias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos fêmeas não infectados ou infectados por *Schistosoma mansoni* cepa BH, submetidos à intervenção com *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) em esquemas curativo e profilático, objetiva-se:

- Determinar se o tratamento modula os marcadores IL25, IL33 e α SMA no fígado e intestino de camundongos infectados experimentalmente.
- Avaliar o efeito do tratamento sobre os marcadores inflamatórios TNF- α , MCP-1 e IL6.
- Identificar a correlação não causais entre IL25, IL33 e α -SMA em fígado e intestino, com TNF- α , MCP-1 e IL6 em SLC de cultura de células esplênicas.

4 METODOLOGIA:

4.1 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

4.1.1 Condições de cultivo e obtenção do *Bacillus clausii*

Em um Erlenmeyer com capacidade para 1000ml e contendo 450ml de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion), será inoculado uma ampola de 5 ml do medicamento Enterogermina®, que posteriormente será colocado em agitador automático (IPM: 155), a 35°C durante 48h. Após este período, a cultura será então distribuída em tubos de ensaio e centrifugado para obtenção de precipitado contendo esporos do *B. Clausii*, que ao final serão concentrados apenas em um tubo do tipo Falcon de 40 ml e ressuspenso em 10ml de solução fisiológica estéril. Em seguida, 0,5ml desta suspensão será diluída seriadamente e plaqueada em ágar nutritivo para enumeração das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Concomitante a esta enumeração, a densidade ótica da suspensão com os esporos, será medida no espectrofotômetro de forma a obter uma concentração de 10⁹ esporos por mililitro. Após a padronização da suspensão, a cultura será fracionada em frascos de penicilina (0,5ml/frasco) fechados hermeticamente e mantidos sob temperatura ambiente até a sua administração.

4.1.2 Administração do *Bacillus clausii*

A concentração dos esporos de *B. Clausii* utilizada no tratamento será de 10⁹ esporos por ml. Esta concentração foi escolhida com base na literatura, a qual afirma que a dose diária recomendada de probióticos é de 10⁹ a 10¹¹ UFC/ml (Gratz et al. 2010). A administração será de 0,3 ml por dia em dose única por gavagem com o camundongo em jejum a 1 h.

4.1.3 Infecção e parasitológico de fezes

A infecção foi realizada por via percutânea, com 50 cercárias de *S. Mansoni*, cepa BH. A cepa de *Schistosoma mansoni* BH (Belo Horizonte) é mantida no moluscário da disciplina de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical

(CCS-UFPE), através da passagem sucessivas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e camundongos Swiss Webster.

4.1.4 Animais e formação dos grupos experimentais

Serão utilizados 50 camundongos (Swiss Webster), fêmeas, 28-30g, 30 dias de idade, fornecidos e mantidos no biotério do LIKA/UFPE de acordo com condições padronizadas de criação. Os camundongos serão igualmente distribuídos em quatro grupos experimentais (G1-G4) de acordo com a exposição cercariana e esquema terapêutico adotado. Vinte animais serão infectados (G2, G3 e G4), via percutânea com 40 cercárias de *S. Mansoni* (cepa BH), enquanto seis camundongos serão mantidos nas mesmas condições de criação, mas livres de exposição cercariana (G1).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Grupos não infectados

G1 (Controle *B. Clausii*) – Animais que receberão apenas solução salina ou bacilo do 1º ao 100º (tempo de experimento), dia de experimento, respectivamente.

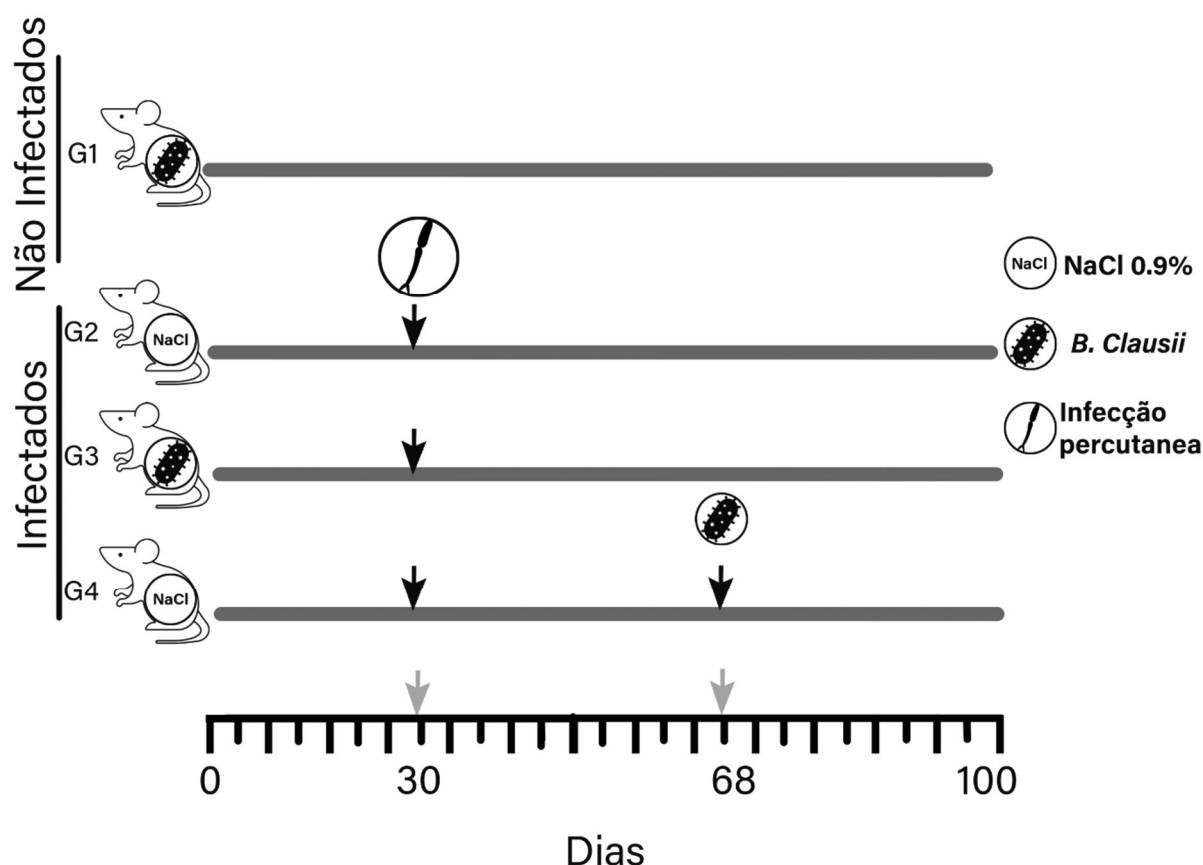
4.2.2 Grupos infectados

G2 (Controle Profilático) - receberá bacilo durante 30 dias antes da infecção e continuará sob intervenção terapêutica, com o *B. Clausii*, do 31º ao 100º dia de experimento (totalizando 100 dias intervenção terapêutica e 70 dias de infecção).

G3 (Controle Curativo) - receberá solução salina durante 30 dias antes da infecção e por mais 37 dias após a infecção. Esses animais iniciarão a intervenção terapêutica com o bacilo do 38º após a infecção (início da ovoposição) ao 70º dia (fase aguda da infecção), completando 100 dias de experimento.

G4 (Controle Positivo) – receberá solução salina durante 30 dias antes da infecção e continuará recebendo solução salina do 1º ao 70º dia após a infecção.

Figura 6 - Grupos de camundongos Swiss western utilizados no experimento



Fonte: O autor (2022). Legenda: Os indivíduos foram destinados nos seguintes grupos: Grupo 1 (G1) – Não infectados e tratados com *B. clausii* desde o 1º dia; Grupo 2 (G2) – Infectados com cercárias de *S. mansoni* no 30º dia e não tratados; Grupo 3 (G3) – Infectados com cercárias de *S. mansoni* no 30º dia e tratados com *B. clausii* desde o 1º dia; Grupo 4 (G4) – Infectados com cercárias de *S. mansoni* no 30º dia e tratados com *B. clausii* após oviposição no 68º dia.

4.2.3 Imunohistoquímica (IHQ) e análise de imagem

A fixação dos tecidos do fígado e intestino foram feitos com tampão de formol a 10% por 18 até 24hrs em temperatura ambiente e antes da imersão em parafina o corte em frio foi em acetona fria por 1 min., além foram obtidos cortes de 3 µm os cortes e desparafinizados em três banhos de xilol (um de 10 minutos e dois de 05 minutos cada) e reidratados por passagem em cadeia decrescente de etanol (100% - 70%) de 05 minutos cada e água destilada (03 banhos de 05 minutos).

Para a recuperação antigênica, foi utilizada a solução de citrato, pH 6.0, em micro-ondas, em 3 ciclos na potência mínima por 3 minutos em cada ciclo. Logo após, do resfriamento natural das lâminas por 20 minutos, e em seguida, bloqueio e sítios inespecíficos com Tampão Fosfato salino com albumina sérica bovina ao 1% (PBS-BSA 1%), para o consumo de peroxidase endógena o material foi incubado em Tween20 0,2% por 45 minutos.

As lâminas foram incubadas com anticorpos primários em câmara úmida e deixados em overnight a temperatura ambiente, as diluições utilizadas foram: 1:50, 1 µg/ml e 1:600 para IL-25, IL-33 e α -SMA respectivamente e seguidamente incubação do anticorpo secundário Rabbit anti IgG por uma hora com diluição de 1:500, para revelação da reação foi adicionado 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos evitando contato com a luz. Os espécimes seguiram para contra coloração com hematoxilina de Harris, imersão por 02 minutos e três lavagem em água destilada, desidratação através de passagem em bateria crescente de álcool (03 banhos de 05 minutos cada a 70%, 80% e 95% e 01 banho em álcool absoluto de 15 minutos), 02 banhos de xilol (05 minutos cada), e montagem com Entellan® e lamínula de vidro. Todas as lavagens rápidas foram em solução tampão de Tween20 0,2% e PBS 0,05M.

As imagens foram obtidas usando um microscópio invertido (Leica®) conectado a uma câmera digital MC170-HD e a um computador contendo o software LASX e armazenadas em formato TIFF. Para a interpretação da reação IHQ, foram deconvoluídas fotos de 10 campos aleatórios em fígado e intestino, em imagej (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), utilizando o canal DAB foi separado a área marcada do fundo aplicando método de segmentação automática (Renyi Entropy) e foi calculada a média da área marcada com um valor de calibração de 9,3538 pixels/µm.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS PARA ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Os camundongos de todos os grupos serão submetidos à eutanásia para remoção de seus baços em condições estéreis. Para obtenção dos esplenócitos, será utilizado o baço dos camundongos dos diferentes grupos. Os esplenócitos serão preparados em meio RPMI 1640 acrescido de solução de Penicilina e Estreptomicina (10ml a 1%), L-glutamina (1%) e soro bovino fetal 10%, sendo a viabilidade celular observada após coloração pelo Trypan Blue (10%). Os esplenócitos serão cultivados em tubos na concentração final de 5×10^6 células/ml, em estufa de CO₂ a 5% 37°C. As culturas serão estimuladas com 5 µg/ml de Concanavalina A ou antígenos do *B. Clausii* com 20µg/ml de SEA (Antígeno solúvel dos vermes).

4.4 ENSAIO PARA DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO – IL-6, MCP-1, TNFA.

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 CO₂ 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 serão realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas Instituto Aggeu Magalhães - IAM/FIOCRUZ. As análises serão realizadas através do Software FCAP Array versão 3.01 (Becton Dickson).

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados através da comparação entre os diferentes grupos de animais utilizando-se o teste para dados não paramétricos Kruskal-Wallis. Para os dados não paramétricos foi utilizado o método de Kruskal-Wallis. A obtenção dos cálculos estatísticos foi processada em linguagem R (versão 4.1.2) utilizando o ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (versão 2023.03.0+386) e foram considerados significativos valores de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DE IL-25, IL33 E ASMA EM FÍGADO E INTESTINO POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Por meio dos cortes de fígado marcados por Imunohistoquímica, foi possível observar marcações intensas de IL-25 no parênquima, principalmente no grupo G1. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas nas marcações, tanto no parênquima quanto nos granulomas, entre os grupos estudados. Já no caso do intestino, foram identificadas marcações de IL-25 no citoplasma das células epiteliais e em granulomas da maioria dos grupos (Figura 7).

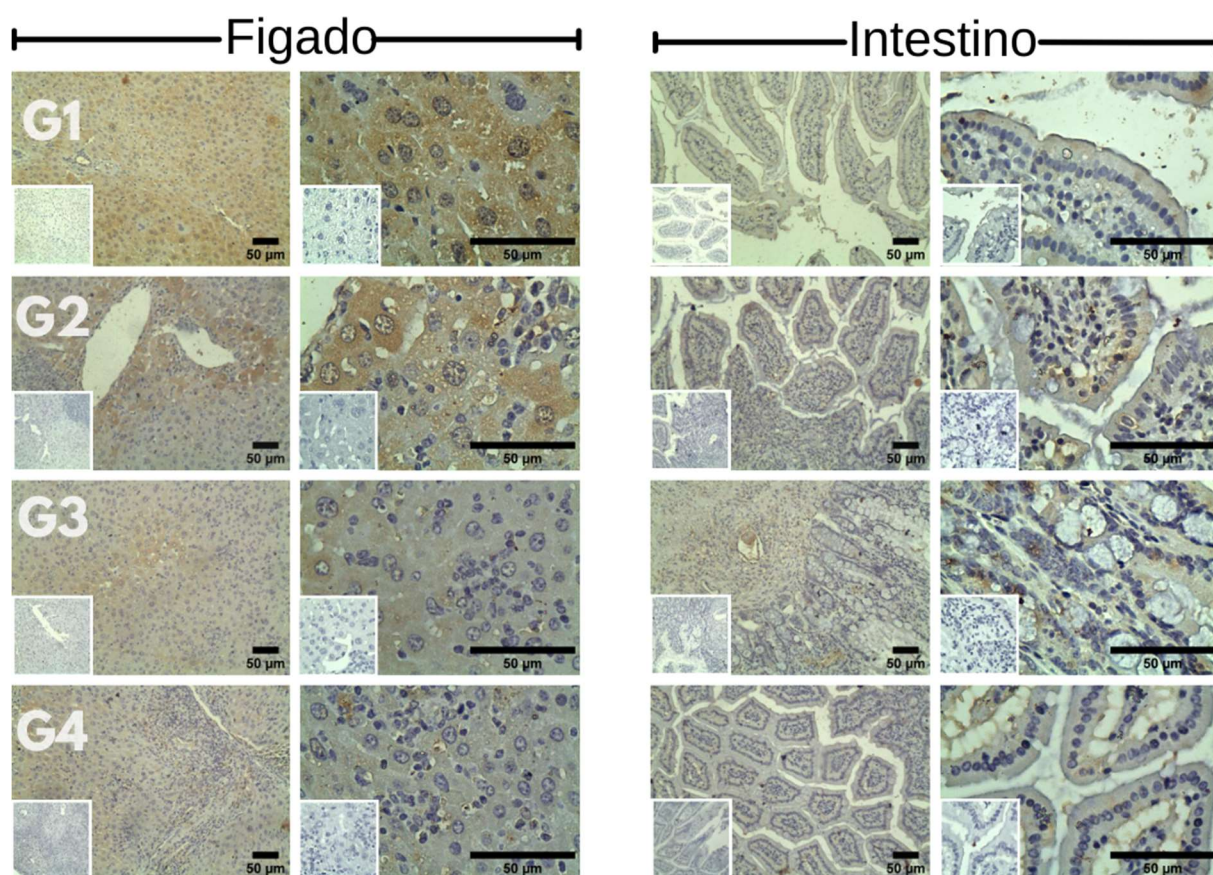
Este é o primeiro estudo que avalia o efeito do *B. Clausii* sobre IL33, IL25 e α -SMA e utilizando modelo de infecção experimental pelo *S. Mansoni*. As atividades das alarminas no nível local têm sido descritas como mediadores da resposta imune em diversos tecidos tanto em contextos de lesão tecidual quanto na homeostasia através da imunomodulação exercida pela microbiota e patógenos (MCGINTY et al., 2020; SALTER et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2018; VON MOLTKE et al., 2016b).

A comparação da área de abrangência de marcação de nossas análises por IHQ (Gráfico 1) mostrou que os animais que receberam tratamento após oviposição (G4) apresentaram uma tendência a menor marcação para IL-25 em comparação aos demais grupos, resultando em diferenças estatisticamente significativas quando comparados com aqueles infectados e que receberam tratamento com *B. Clausii* (G3) ($p < 0,05$). Não houve significância estatística na comparação entre os diferentes tecidos.

Complementando a observação direta de IL-25 nas células epiteliais do intestino e no parênquima hepático, ao serem avaliadas em questão da magnitude, obtivemos diminuição significativa da área marcada no grupo tratado durante a ovipostura (G4) e diminuição de α -SMA no intestino. Este resultado sugere que o tratamento com o *B. Clausii* foi capaz de modular esta citocina. Nosso grupo, em trabalho anterior, demonstrou que o tratamento com *B. Clausii* reduziu o número de

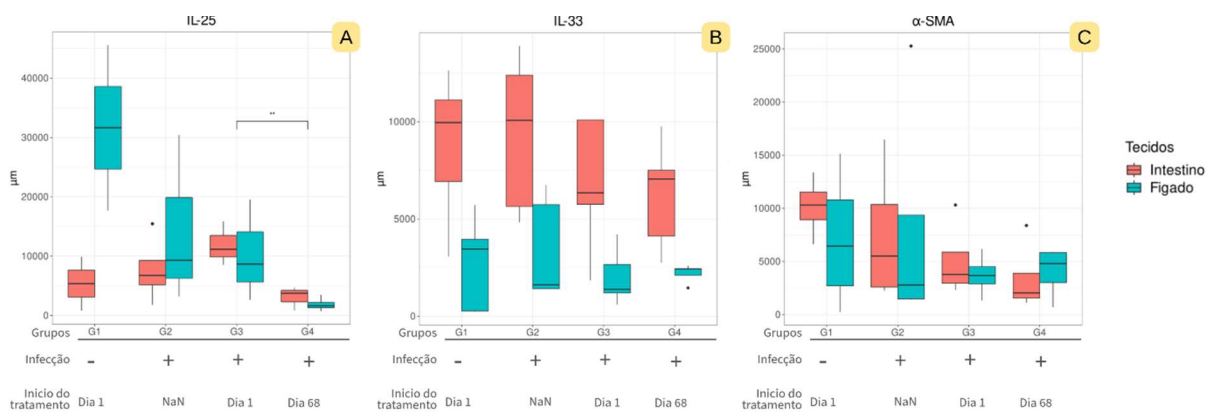
ovos liberados juntos com as fezes e a carga de ovos depositados nos tecidos hepático e intestinal nos dois grupos infectado e tratados com fins profiláticos e curativos, respectivamente (CRUZ, 2020). Desta forma é possível que esta redução nos níveis desta citocina tenha ocorrido devido a menor excreção dos ovos nos animais tratados com *B. Clausii*.

Figura 7 - Fotos representativas de cortes marcados com anti-IL-25 por Imunohistoquímica, espécimes de Fígado e Intestino em 10x e 40x



Legenda: Fonte: O autor (2022) Legenda: Cortes de intestino e fígado marcados por Imunohistoquímica e organizados por grupos experimentais, as fotos são acompanhadas por campos sem anticorpo primário (controle) dos mesmos indivíduos no quadrante inferior esquerdo, capturas tomadas com objetivas de 10x (coluna esquerda) e 40x (coluna direita).

Gráfico 1 - Quantificação de área marcada por IHQ de IL-33, IL-25 e α -SMA entre os grupos experimentais

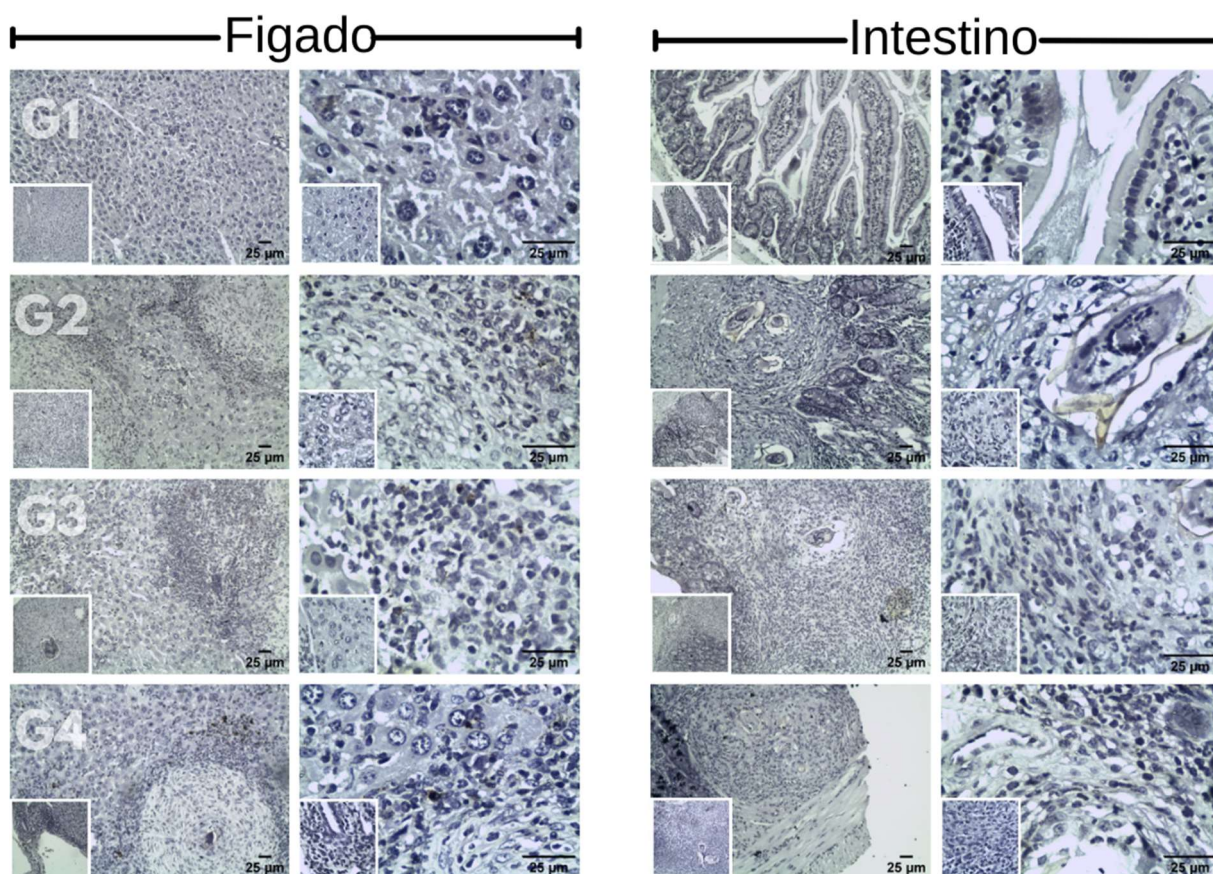


Legenda: Fonte: O autor (2022). Legenda: Quantificação da área marcada por imunohistoquímica de A) IL-25, B) IL-33, e C) α -SMA nos cortes de fígado e intestino dos quatro grupos experimentais. Obs.: Apenas as comparações (Kruskal Wallis) de grupos com significância estatística ($p < 0,05$) estão representados (**)

MUKENDI et al., 2021 demonstraram que os níveis de IL25 e TSLP tendem a aumentar com a oviposição, sugerindo que os ovos de *S. Mansoni* estimulam a liberação desta citocina, porém sem afetar a IL33 que se mantém constante. A IL33, IL25 e TSLP embora tenham funções redundantes, a atividade de IL33 pode ser potencializada pelas outras citocinas na indução das células ILC2 e Th2, estimulando a produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que tem papel fundamental na patologia da doença. Em modelo com murinos triplamente deficientes para IL-25, IL-33 e TSLP, registraram diminuição na formação de granulomas.

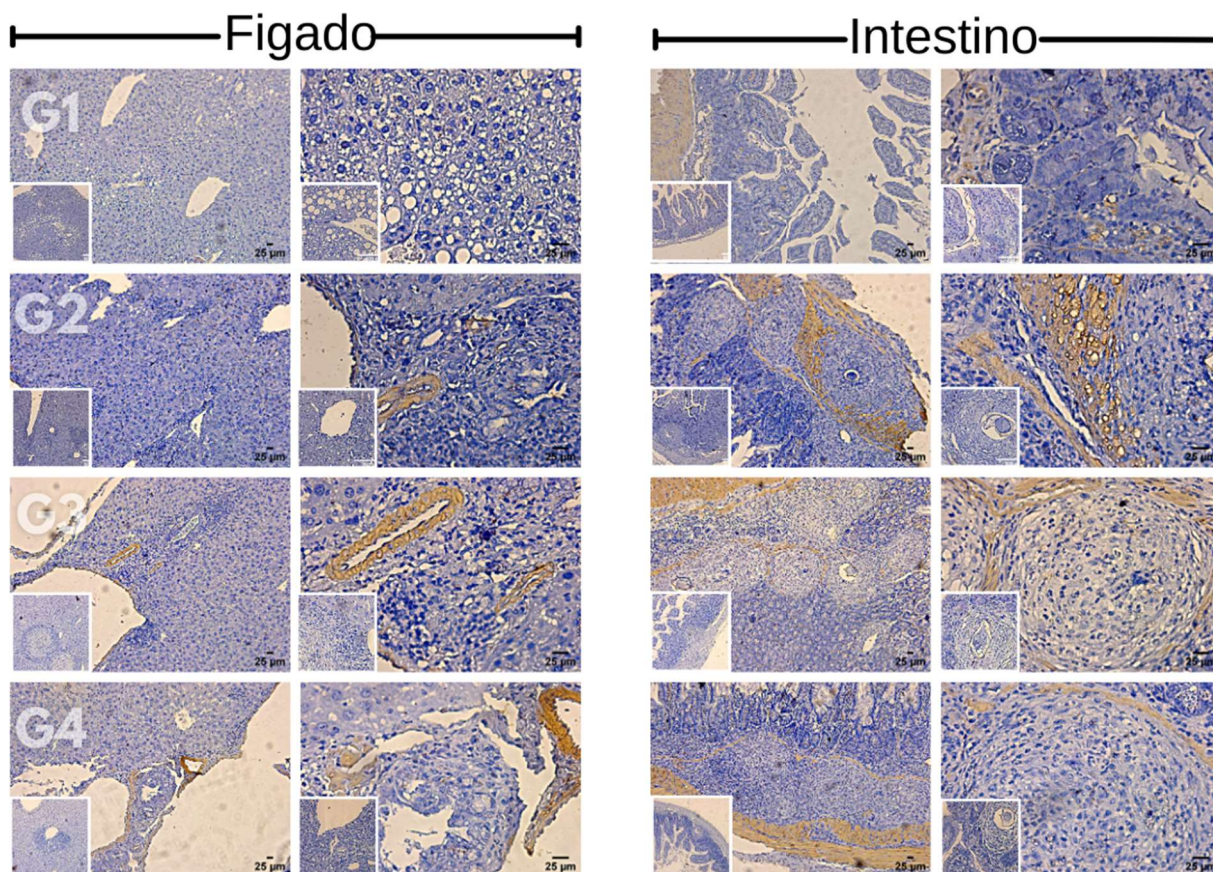
Não foram observadas marcações significativas com IL-33 (Figura 8). Em relação a α -SMA, foram encontradas marcações mais intensas nas paredes das estruturas do sistema porta e sinusoides hepáticos, principalmente nos grupos G2, G3 e G4. Além disso, foi possível identificar marcações de α -SMA nas bordas dos granulomas (Figura 9). Ao avaliar a área de marcação de α -SMA, observou-se uma tendência de diminuição nos intestinos de animais infectados e tratados com *B. Clausii*, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Gráfico 1C).

Figura 8 - Fotos representativas de cortes marcados com anti-IL-33 por Imunohistoquímica, espécimes de Fígado e Intestino em 10x e 40x



Legenda: Fonte: O autor (2022) Legenda: Cortes de intestino e fígado marcados por Imunohistoquímica e organizados por grupos experimentais, as fotos são acompanhadas por campos sem anticorpo primário (controle) dos mesmos indivíduos no quadrante inferior esquerdo, capturas tomadas com objetivo 10x encontra-se a esquerda e as capturas em 40x a direita.

Figura 9 - Fotos representativas de cortes marcados com anti- α -SMA por Imunohistoquímica, espécimes de Fígado e Intestino em 10x e 40x



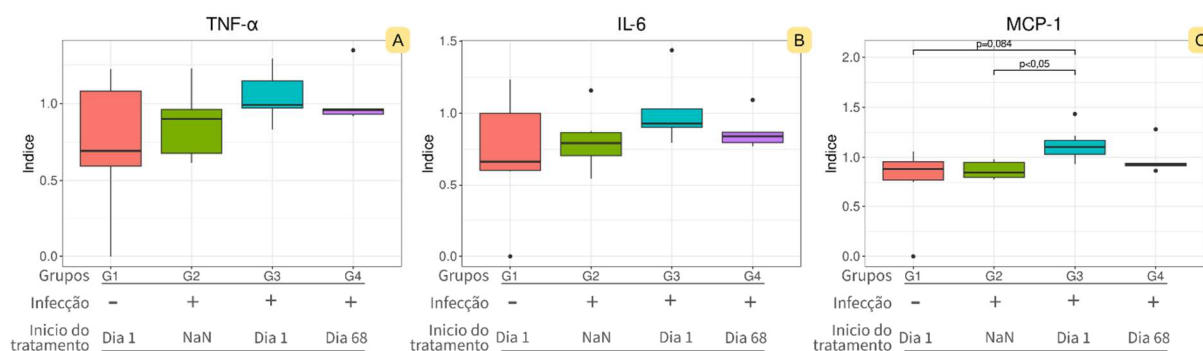
Legenda: Fonte: O autor (2022) Legenda: Cortes de intestino e fígado marcados por Imunohistoquímica e organizados por grupos experimentais, as fotos são acompanhadas por campos sem anticorpo primário (controle) dos mesmos indivíduos no quadrante inferior esquerdo, capturas tomadas com objetivo 10x encontra-se a esquerda e as capturas em 40x a direita.

5.2 NÍVEIS DE TNF-A, IL-6 E MCP-1 EM CULTURAS ESPLÊNCIAS

Optamos por comparar o quociente de quantificação (índice) entre sobrenadantes de culturas estimuladas com antígenos do *B. Clausii* e sobrenadantes de culturas em estado basal para avaliar possíveis alterações na resposta imune. Valores acima de 1 indicam um aumento de mais de 100% em relação ao estado basal, enquanto valores abaixo de 1 representam uma redução na quantificação em relação as culturas com ausência de estímulo.

Os índices registrados para as quantificações de IL-6 e TNF- α não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (Gráfico 2A e 2B). Entretanto, o grupo tratado profilaticamente (G3) apresentou quocientes próximos a 100% em comparação aos demais grupos, que registraram diminuição em relação ao estado basal. Em relação à MCP-1, houve diferenças estatisticamente significativas entre o controle positivo (G2) e o G3 ($p < 0,05$), com aumento observado no último grupo em relação as condições basais (Gráfico 2C). Já em relação ao controle para *B. Clausii* (G1), embora não tenham sido observadas diferenças significativas, o quociente entre o G3 e o Controle apresentou valores de p próximos ao limiar de significância ($p = 0,08$). Esses resultados são divergentes dos resultados apresentados em um modelo de Influenza A, que mostraram que a administração de *E. Faecalis* reduziu significativamente as concentrações de IL-6 e MCP-1 em camundongos infectados, a divergência com nossos resultados pode estar relacionado com as diferenças de modelo experimental (Chen M et al., 2017).

Gráfico 2 - Quantificação TNF- α , IL-6, MCP1 entre os grupos experimentais



Fonte: O autor (2022). Legenda: Quantificação por CBA de sobrenadantes livres de células de tecido esplênico de: A) TNF- α , B) IL-6 e C) MCP1 nos cinco grupos experimentais com fatores de estimulação *B. clausii*, e em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Obs.: Apenas as comparações (Kruskal Wallis) de grupos com significância estatística ($p < 0,05$) estão representadas

Em outro estudo utilizando o modelo experimental de colitis induzido por Sulfato de sodio dextrano versus *Lactobacillus jensenii* TL2937, as culturas de células mostraram diminuição das citocinas pro inflamatórias TNF- α , IL-6 e MCP-1 quando desafiadas com o imunobiótico (Sato N et al, 2020), em nosso estudo quimiocina

MCP-1 foi significativamente maior nos grupos de animais infectados e tratados com *B. Clausii* em comparação aos animais não infectados. Desta forma, o tratamento não aumentou essa quimiocina na infecção pelo *S. Mansoni*. Este fator é importante porque quimiocinas como CCL2 e seu receptor tem sido implicado com a exacerbação da doença. (Chuah, et al 2014)

Essas mesmas citocinas foram avaliadas em um estudo de coorte comparando pacientes com status parasitários diferentes (infecção com expulsão de ovos, Positivos para *S. Mansoni* sem expulsão de ovos) em relação a indivíduos não infectado, dentre as observações a MCP-1 foi a única quimiocina que não foi alterada entre os grupos analisados, mas reportaram diminuição de TNF- α quando comparados com os indivíduos infectados e com PCR positivo para *S. Mansoni* versus aqueles com expulsão de ovos(K. Arndts et al,2019) isso levanta a possibilidade que a diminuição das citocinas pro-inflamatórias em relação ao estado basal encontrado em nosso contexto (camundongos com infecção crônica) seja explicado pela alternância do perfil Th1 para Th2 que acontece durante a ovipostura onde TNF- α se relaciona com o perfil TH1 e a ovipostura marca o desbalanço hacia perfil TH2 (Schwartz et al. 2018,Zhang et al. 2018).

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES TNF-A, IL-6 E MCP-1, IL-33, IL-25 E A-SMA

De forma geral, os dados apresentados obtiveram um coeficiente de correlação moderado ($p=0,68$) (Figura 10). Ao comparar os marcadores sistêmicos (tanto basais quanto estimulados com *B. Clausii*) na matriz de correlação, observa-se coeficientes de fortes a moderado ($p=1$). Em outros modelos tem sido observado mudanças nos níveis de citocinas in situ na presença de probióticos (Waddell et al.,2015; Jeong et al. ,2021; Vega-Magaña et al.,2018; Toejing et al,2021), estímulos por *Lactobacillus jensenii* TL2937, onde a diminuição conjunta de TNF- α , IL-6 e MCP-1, o que sugere alguma relação assim como a observada na nossa matriz de correlação (Sato N et al, 2020). Em análises anteriores de nossa equipe tinha-se relatado a ausência de diferenças significativas nos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-6 em culturas

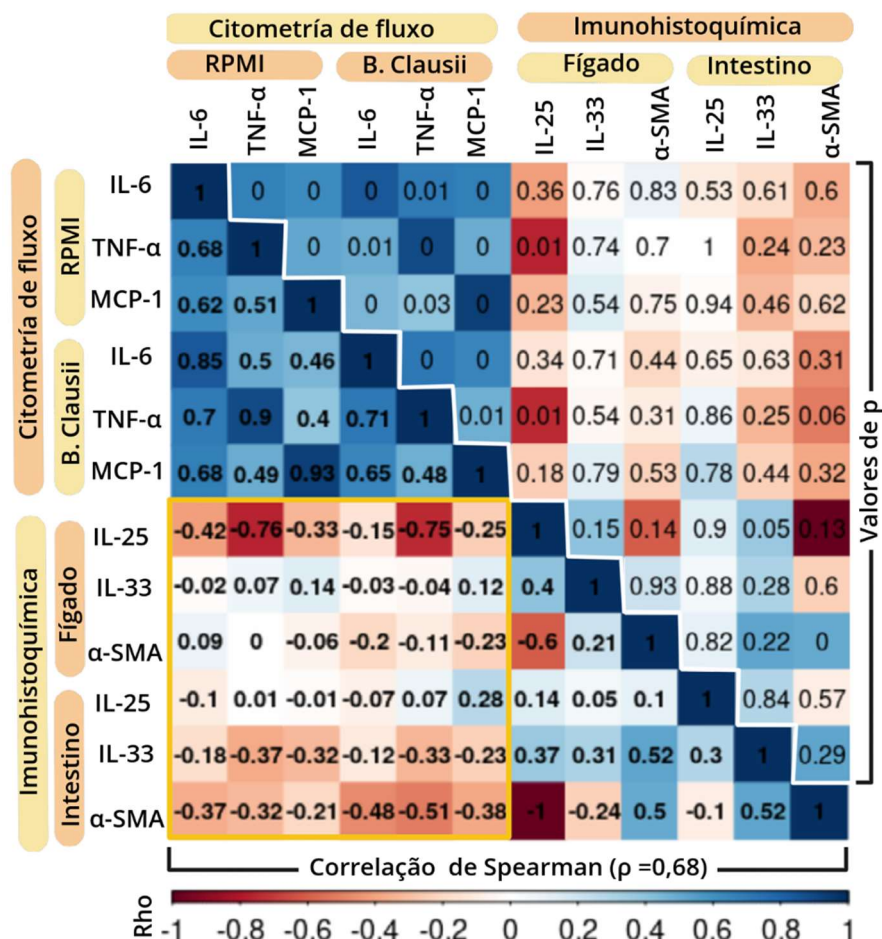
estimulada com *B. Clausii* quando contrastados com os aumentos significativos em culturas com estímulos mitogênicos (CRUZ, 2020), o que complementa a correlação de Spearman entre as quantificações de SLC sem estímulo e aqueles desafiados pelo probiótico de nosso estudo, sugerindo que em nosso modelo aumentos acima das condições basais, como no caso de MCP-1, seja atrelado a outros fatores mas não pelo estímulo direto de antígenos do *B. Clausii*.

Contrário à quase uniformidade dos coeficientes produto da quantificação por citometria, no segmento de IHQ a existe uma diversidade de graus de correlações que pode ser explicado pelas diferenças histológicas entre o intestino e o fígado. Nos coeficientes dos marcadores in situ, a variação é maior, destacando-se especialmente as correlações entre IL-25 quantificado no fígado e α -SMA quantificado no intestino ($\rho=-1$). Embora haja uma forte relação negativa a amostra pode não ser grande o suficiente para mostrar uma relação estatisticamente significativa ($p=0,13$). No caso de α -SMA, a correlação foi moderadamente positiva em ambos tecidos ($p<0,05$).

A IL25 foi amplamente descrita como um fator relacionado com a modulação da fibrose e de facilitar o estabelecimento do perfil TH2 (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; HE; PAN; FEN DONG, 2018, GERBE et al., 2016; HOWITT et al., 2016; NADJSOMBATI et al., 2018; SCHNEIDER et al., 2018), Mutengo e colaboradores (2018) em estudo com humanos identificou níveis significativamente maior de TNF- α em pacientes sem fibrose hepática em comparação com indivíduos com fibrose severa, o ue poderia se comparar com nossos achados em termos de magnitude e direção do coeficiente onde TNF- α , tanto basal ($\rho=-0,76$) quanto estimulado ($\rho=-0,75$), versus IL-25 hepático apresentaram as correlações negativas mais fortes ($p<0,05$).

Além disso, uma correlação negativamente moderada foi observada entre α -SMA no intestino e TNF- α nas culturas estimuladas com *B. Clausii* ($\rho=-0,51$), embora não ter atingido o limiar para considera-lo estatisticamente significativo, a correlação observada atingiu um valor de p muito próximo ($p=0,06$).

Figura 10 - Correlação de Spearman entre as diferentes variáveis quantificadas por citometria de fluxo e análise de imagens de imuno-histoquímica



Fonte: O autor (2022). Legenda: Valores de ρ (rô) de Spearman entre as variáveis medidas. (Inferior esquerdo) e valores de p para cada uma das correlações (Superior direito). As células com vermelhos e azuis mais escuras denotam correlação negativa e positiva respectivamente, entre as variáveis correspondentes. As variáveis estão agrupadas em *B. Clausii* e RPMI para as quantificações feitas por citometria de fluxo e em Fígado e Intestino para as variáveis quantificadas por Imunohistoquímica.

Também conseguimos observar correlação positiva moderada e estatisticamente significativa ($p = 0,37$; $p = 0,05$) entre as duas alarminas (IL-25 e IL-33) de nosso estudo em tecidos diferentes, a relação dessas alarminas pode estar explicada pelos fatores relacionados com o eixo intestino-fígado, em um modelo experimental de hepatotoxicidade, foram relatadas alterações na composição da microbiota com o aumento de produção de LPS (Lipopolissacarídeos) e SCFA (Ácidos graxos de cadeia curta) ao administrar nanopartículas de dióxido de titânio (tio2 nps)

oralmente e seguidamente no análise metabolômica do tecido hepático foi observada perturbação de metabólitos relacionadas ao metabolismo energético (Chen Z, 2019), nesse sentido a IL33 tem se mostrado capaz influenciar indiretamente a composição da microbiota intestinal promovendo a expressão de REG3γ, mecanismo mediado por mTOR, STAT3 e ERK1/2 (Xiao Y, 2019). Outrossim, em um modelo murino que avaliou a relação de IL-25 com esteatose hepática os achados indicaram que a ativação do IL-25 estimulou os macrófagos M2a e causou a expressão de STAT6 nos hepatócitos, resultando na expressão de IL-25. A investigação também identificou que o STAT6 se ligou diretamente ao promotor do IL-25, o que esclareceu os mecanismos moleculares que estão envolvidos na melhoria da esteatose hepática através do IL-25. Existem diversos mecanismos em que o IL33 e IL25 estão envolvidos ante lesões teciduais em fígado e intestino. No entanto, a relação entre essas duas alarminas pode estar explicada pelos fatores relacionados com o eixo intestino-fígado o que sugerem que a comunicação entre os dois tecidos pode desempenhar um papel crucial na regulação da inflamação e da homeostase metabólica nesses órgãos.

Finalmente, a estimulação direta In Vitro com o probiótico não demonstrou ter influência direta nas citocinas pró-inflamatórias sistêmicas. No entanto, na presença da doença, o *B. Clausii* pode interagir com a dinâmica imunomoduladora de *S. Mansoni*, favorecendo o aumento de MCP-1. Isso difere de outros modelos com probióticos e/ou outras doenças inflamatórias. Embora esse probiótico possua a capacidade de modular a resposta imunológica, é necessário avaliá-lo melhor para compreender os mecanismos envolvidos nos diferentes modelos de doenças.

6 CONCLUSÕES

Finalmente, a estimulação direta *In Vitro* com o probiótico não demonstrou ter influência direta nas citocinas pró-inflamatórias sistêmicas. No entanto, na presença da doença, o *B. Clausii* pode interagir com a dinâmica imunomoduladora de *S. Mansoni*, favorecendo o aumento de MCP-1. Isso difere de outros modelos com probióticos e/ou outras doenças inflamatórias. Embora esse probiótico possua a capacidade de modular a resposta imunológica, é necessário avaliá-lo melhor para compreender os mecanismos envolvidos nos diferentes modelos de doenças.

Alem disso, o nosso estudo examinou a relação entre marcadores sistêmicos e *in situ* em amostras de tecido hepático e intestinal estimuladas com a bactéria probiótica *B. Clausii*. Embora tenha sido encontrada uma correlação moderada entre os dados obtidos, com coeficientes de forte a moderado para os marcadores sistêmicos, os coeficientes dos marcadores *in situ* apresentaram uma maior diversidade de graus de correlação. Apesar disso, o estudo identificou correlações significativas entre alguns marcadores, como a correlação negativa entre a IL-25 e o TNF- α hepático, bem como a correlação positiva entre as alarminas IL-25 e IL-33 em tecidos diferentes. Essas correlações podem fornecer informações importantes para a compreensão da modulação da fibrose e do perfil TH2 e a relação entre o intestino e o fígado. No entanto, é importante observar que algumas das correlações observadas não atingiram o limiar de significância estatística, destacando a necessidade de mais estudos para entender completamente essas associações.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C; LORENA S.L.; PAVAN C.R.; AKASAKA H.M.; MESQUITA 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. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 247–251, 2012.
- ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 60, 2010.
- BANERJEE, A. et al. Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 5, p. 1711–1719, 1 maio 2018. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/120330>>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- BANERJEE, A.; COFFEY, R. J.; LAU, K. S. Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function The Journal of Clinical Investigation. **J Clin Invest**, v. 128, n. 5, p. 1711–1719, 2018. Disponível em: <<https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/120000/120330/cache/120330.1-20180420151900-covered-253bed37ca4c1ab43d105aefdf7b5536.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- BOUHSS, A. et al. Specific Interactions of Clausin, a New Lantibiotic, with Lipid Precursors of the Bacterial Cell Wall. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 5, p. 1390–1397, set. 2009.
- BOZDOGAN, B., GALOPIN S., GERBAUD G., COURVALIN P., LECLERCQ R. Chromosomal aadD2 encodes an aminoglycoside nucleotidyltransferase in *Bacillus clausii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1343–1346, 2003.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163–176, abr. 2009.

CANNA, S. W. et al. Life-threatening NLRC4-associated hyperinflammation successfully treated with IL-18 inhibition. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 5, p. 1698–1701, maio 2017.

CANNARELLA, L. A. T. et al. Mixture of probiotics reduces inflammatory biomarkers and improves the oxidative/nitrosative profile in people with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, v. 89, p. 111282, set. 2021.

CARO, S. di et al. **Bacillus Clausii effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis** **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/48f0/163d33fdf5374f3e77fd986ad7939ef80642.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

CIPRANDI, G., VIZZACCARO A., CIRILLO I., TOSCA M.A. *Bacillus clausii* effects 38 in children with allergic rhinitis. **Allergy**, v.60, n5 p. 702–703, 2005.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, 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

SANTOS, J.; 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 da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 502–504, 2004.

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3042, 20 dez. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 maio. 2019.

CRUZ, C. S. **Estudo do potencial imunomodulatório do *Bacillus clausii* (O/C, N/R, T e SIN) sobre a Esquistossomose mansoni experimental**. 2020. Recife, 2020.

DA SILVA, L. F. et al. Schistosomiasis mansoni in the northeast region of Brazil: Temporal modeling of positivity, hospitalization, and mortality rates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019. Acesso em: 20 mar. 2020.

DANESE, S. et al. Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II). **Gut**, v. 68, n. 1, p. 40–48, jan. 2019.

DAR, H. Y. et al. *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice model. **Nutrition**, v. 54, p. 118–128, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.02.013>>.

DE SOUZA, H. S. P.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2 jan. 2016.

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, n. 1, p. 59–69, 2018.

FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R Blockade during Chronic Schistosomiasis ansoni Results in the Loss of B Cells from the Liver and the Development of Severe Pulmonary Disease. 2012. Disponível em: www.plospathogens.org

. FIJAN, Sabina. Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. Probiotics and Prebiotics. **Human Nutrition and Health**, v.10, p.191-220, 2016.

FOLIGNE, B., ZOUMPOPOULOU G, DEWULF J., YOUNES A.B., CHAREYRE F., SIRARD J.C., POT B., GRANGETTE C. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, 2007.

FLOUDAS, A. et al. *Schistosoma mansoni* Worm Infection Regulates the Intestinal Microbiota and Susceptibility to Colitis. **Infection and immunity**, v. 87, n. 8, p. e00275-19, 1 ago. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31138616>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FRIEDRICH, M.; POHIN, M.; POWRIE, F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 992–1006, abr. 2019.

GALEANO, E. **O Livro dos Abraços**. 4a. ed ed. Porto Alegre: L&PM, 1995.

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., SALVETTI 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 of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 552–559, 2015

GERBE, F. et al. Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 226–230, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature16527>>.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The Schistosoma Granuloma: Friend or Foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 89, 15 abr. 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00089/abstract>>. Acesso em: 16 out. 2019.

HAN, M. et al. The Innate Cytokines IL-25, IL-33, and TSLP Cooperate in the Induction of Type 2 Innate Lymphoid Cell Expansion and Mucous Metaplasia in Rhinovirus-Infected Immature Mice. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 4, p. 1308–1318, 15 ago. 2017.

HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. Lactic Acid Bacteria as Probiotics : Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier **Journal of funconal foods**, p. 197–216, 2013.

HAYAKAWA, Y.; WANG, T. C. The Tuft Cell-ILC2 Circuit Integrates Intestinal Defense and Homeostasis. **Cell**, v. 174, n. 2, p. 251–253, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.037>

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.v.11, n. August 2014, p. 506–514, 2015..

HSIEH, C.Y.; OSAKA, T.; MORIYAMA, E.; DATE, Y.; KIKUCHIS J.; TSUNEDA, S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. **Physiological Reports**, v. 3, n. 3, p. e12327–e12327, 2015.

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, n. 12, p. 875–881, 2011.

JENKINS, T. P. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12072, 13 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-30412-x>>. Acesso em: 28 out. 2019.

JEONG, Y.-J. et al. Fermented Maillard Reaction Products by *Lactobacillus gasseri* 4M13 Alters the Intestinal Microbiota and Improves Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice with Colitis. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 4, p. 299, 28 mar. 2021.

KAMDEM, S. D. et al. Host Regulators of Liver Fibrosis During Human Schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2781, 28 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02781/full>>. Acesso em: 15 set. 2019.

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, n. 1, 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 *S. mansoni* infection. II.

Corynebacterium parvum. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, vol.38, n.5, pp.359-364, 1996.

KONIECZNA, P.; GROEGER, D.; ZIEGLER, M.; FREI, R.; FERSTL, R.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E.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**, v. 61, n. 3, p. 354–366, 2012.

KÖNIG, 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, p. 247–261, 2014.

LEBLANC, J. G. CHAIN, F.; MARTÍN, R.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; COURAU S.; LANGELLA, P. Beneficial effects on host energy metabolism of shortchain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2017

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. 1, p. 1, 2013.

LJUNGH, A.; WADSTROM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 73–90, 2006.

MCGINTY, J. W. et al. Tuft-Cell-Derived Leukotrienes Drive Rapid Anti-helminth Immunity in the Small Intestine but Are Dispensable for Anti-protist Immunity. **Immunity**, v. 52, n. 3, p. 528- 541.e7, mar. 2020a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761320300765>>. Acesso em: 13 fev. 2022.

MCGINTY, J. W. et al. Tuft-Cell-Derived Leukotrienes Drive Rapid Anti-helminth Immunity in the Small Intestine but Are Dispensable for Anti-protist Immunity. **Immunity**, v. 52, n. 3, p. 528- 541.e7, mar. 2020b.

MICHEL ARAUJO, J. et al. *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) immunization in absence of adjuvant induce IL-10 production by CD4+ cells and failed to protect mice against challenge infection. **Acta Tropica**, v. 124, p. 140–146, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.007>>.

MUKENDI, J. P. K. et al. Interleukin (IL)-33 is dispensable for *Schistosoma mansoni* worm maturation and the maintenance of egg-induced pathology in intestines of infected mice. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 70, 22 dez. 2021.

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

MUTENGO, M. M. et al. Low IL-6, IL-10, and TNF- α and High IL-13 Cytokine Levels Are Associated with Severe Hepatic Fibrosis in *Schistosoma mansoni* Chronically Exposed Individuals. **Journal of parasitology research**, v. 2018, p. 9754060, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29610679>>. Acesso em: 11 ago. 2019.

NADJSOMBATI, M. S. et al. Detection of Succinate by Intestinal Tuft Cells Triggers a Type 2 Innate Immune Circuit. **Immunity**, v. 49, n. 1, p. 33- 41.e7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.016>>.

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- κ B activation. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 8, 2008

PEARCE EJ, CASPAR P, GRZYCH JM, LEWIS FA, SHER A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med*. 1991 Jan 1;173(1):159-66.

PICHERY, M. et al. Endogenous IL-33 Is Highly Expressed in Mouse Epithelial Barrier Tissues, Lymphoid Organs, Brain, Embryos, and Inflamed Tissues: In Situ Analysis Using a Novel *Il-33–LacZ* Gene Trap Reporter Strain. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3488–3495, 1 abr. 2012.

PRADHAN, B. 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, 16 set. 2019.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, v. 52, n. 7, p. 988–97, 2003.

REYNOLDS, L. A.; FINLAY, B. B.; MAIZELS, R. M. Microbiota, and Host Immunity among Helminth Parasites, Bacterial Cohabitation in the Intestine: Interactions. **J Immunol References**, v. 195, p. 4059–4066, 2019. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/195/9/4059><http://www.jimmunol.org/content/195/9/4059.full#ref-list-1>>. Acesso em: 28 out. 2019.

SALTER, B. M. et al. IL-25 and IL-33 induce Type 2 inflammation in basophils from subjects with allergic asthma. **Respiratory Research**, v. 17, n. 1, p. 5, 14 dez. 2016.

SATO, N. et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 Alleviates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Differentially Modulating the Transcriptomic Response of Intestinal Epithelial Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 17 set. 2020.

SCHNEEBERGER, P. H. H.; COULIBALY, J.T.; PANIC, G.; DAUBENBERGER, C.; GUEUNING, M.; FREY, J.; KEISER, J. Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

SCHNEIDER, C. et al. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. **Cell**, v. 174, p. 271–284, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.014>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

SCHNEIDER, C. et al. A Metabolite-Triggered Tuft Cell-ILC2 Circuit Drives Small Intestinal Remodeling. **Cell**, v. 174, n. 2, p. 271- 284.e14, jul. 2018b.

SCHWARTZ, C. et al. T Cell–Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal *Schistosoma mansoni* Infection Independently of Basophils. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 7, p. 3590–3599, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/193/7/3590>>. Acesso em: 11 ago. 2019.

SCHWARTZ C, Fallon PG. *Schistosoma* "Eggs-iting" the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front Immunol*. 2018 Oct 29;9:2492

SENESI, S.; CELANDRONI, F.; TAVANTI, A.; GHELARDI, E. Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* strains marketed for use in oral

bacteriotherapy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 834–839, 2001.

SOMBETZKI, M. et al. host Defense Versus immunosuppression: Unisexual infection With Male or Female *Schistosoma mansoni* Differentially impacts the immune response against invading cercariae. v. 9, p. 24, 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>.

STERN, E. K.; BRENNER, D. M. Gut Microbiota-Based Therapies for Irritable Bowel Syndrome. *Clinical and Translational Gastroenterology*, v. 9, n. 2, p. e134, 2018.

TOEJING, P. et al. Influence of *Lactobacillus paracasei* HII01 Supplementation on Glycemia and Inflammatory Biomarkers in Type 2 Diabetes: A Randomized Clinical Trial. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1455, 23 jun. 2021.

URDACI, M. C.; BRESSOLIER, P.; PINCHUK, I. *Bacillus clausii* Probiotic Strains. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, n. Supplement 2, p. S86–S90, 2004.

VEGA-MAGAÑA, N. et al. Bacterial Translocation Is Linked to Increased Intestinal IFN- γ , IL-4, IL-17, and mucin-2 in Cholestatic Rats. **Annals of hepatology**, v. 17, n. 2, p. 318–329, 1 mar. 2018.

VON MOLTKE, J. et al. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 221–225, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature16161>>.

VON MOLTKE, J. et al. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 221–225, 14 jan. 2016b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature16161>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

WADDELL, A. et al. IL-33 Signaling Protects from Murine Oxazolone Colitis by Supporting Intestinal Epithelial Function. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2737–2746, dez. 2015.

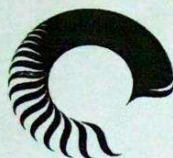
YEPES, E. et al. Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel. 2015.

YOH, K.; OJIMA, M.; TAKAHASHI, S. Th2-biased GATA-3 transgenic mice developed severe experimental peritoneal fibrosis compared with Th1-biased T-bet and Th17-biased ROR γ t transgenic mice. **Experimental Animals**, v. 64, n. 4, p. 353–362, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/64/4/64_15-0019/_article>.

ZHU, P. et al. IL-13 secreted by ILC2s promotes the self-renewal of intestinal stem cells through circular RNA circPan3. **Nature Immunology**, v. 20, n. 2, p. 183–194, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41590-018-0297-6>>.

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.

ANEXO A – PARECER DO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS UFPE



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	28/12/2018
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,