

**Ministério da saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

O EFEITO DA VITAMINA D NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Schistosoma mansonii* (Sambon, 1907) E NA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM DOSES SUBCURATIVAS DE PRAZIQUANTEL EM MODELO MURINO

por

Larisse de Souza Barbosa Lacerda

Belo Horizonte

2020

DISSERTAÇÃO

MCS – IRR

L. S. B. LACERDA

2020

LARISSE DE SOUZA BARBOSA LACERDA

O EFEITO DA VITAMINA D NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Schistosoma mansonii* (Sambon, 1907) E NA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM DOSES SUBCURATIVAS DE PRAZIQUANTEL EM MODELO MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas Não Transmissíveis.

Orientadora: Dra. Cristina Toscano Fonseca
Coorientador: Dr. Gabriel da Rocha Fernandes

Belo Horizonte

2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

L131
2020

Lacerda, Larisse de Souza Barbosa

O Efeito da Vitamina D na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) e na eficácia do tratamento com doses subcurativas de praziquantel em modelo murino/
Larisse de Souza Barbosa Lacerda – Belo Horizonte, 2020

XVIII, 106 f.: il.: 210 x 297mm.

Bibliografia: 81-103

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas Não Transmissíveis.

1. Vitamina D/imunologia 2. Esquistossomose 3. Sistema Imune/parasitologia. I. Título. II. Fonseca, Cristina Toscano(Orientação); Fernandes, Gabriel da Rocha (Coorientação).

CDD – 616.963

LARISSE DE SOUZA BARBOSA LACERDA/ 2020

O EFEITO DA VITAMINA D NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Schistosoma mansonii* (Sambon, 1907) E NA EFICÁCIA DO TRATAMENTO COM DOSES SUBCURATIVAS DE PRAZIQUANTEL EM MODELO MURINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fiocruz Minas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas Não Transmissíveis.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca (IRR/Fiocruz Minas) - Presidente

Prof. Dr. Gabriel da Rocha Fernandes (IRR/Fiocruz Minas) - Presidente

Profa. Dra. Érica Alessandra Rocha Alves (IRR/Fiocruz Minas) - Titular

Prof. Dr. Gustavo Batista Menezes (UFMG) - Titular

Profa. Dra. Marina de Moraes Mourão (IRR/Fiocruz Minas) - Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/05/2020.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha amada família, Anita (filha), Ideny (marido e companheiro), Maria (mãe), Edward (pai), Glicia (irmã), por me ensinarem diariamente sobre o amor eterno, a compreensão, o companheirismo, a gratidão e o carinho!

Agradecimentos

À Deus primeiramente pela vida!! Na minha luta por viver, quando escutei dos médicos que a ciência me ajudaria até ali, Ele me acolheu em seus braços e hoje estou aqui!!! Obrigada também Senhor pelas bênçãos e oportunidades!!!

Agradeço imensamente a minha família: Anita (filha amada), Ideny (marido e companheiro), Maria (mãe), Edward (pai) e Glícia (irmã), cada um com seu jeitinho peculiar sempre me acalentando, apoiando, ensinando, amando, compreendendo... muitos aprendizados!!! Vocês são mais que especiais!! Amo com amor que não cabe... infinito!! Gratidão eterna!! Sou extremamente abençoada por tê-los em minha vida!!! Unidos em todas as situações!! Família!!!

À Dra. Cristina Toscano, Kika, minha orientadora. Obrigada com profunda gratidão pela oportunidade e aprendizados! Eu estava há muito tempo fora do universo acadêmico, desconhecida na Fiocruz, sem nenhuma referência, fui ao seu encontro com um projeto de pesquisa (bruto ainda), que demandaria uma abordagem diferente da linha que trabalha e... aceitou o desafio! Acreditou que seria possível e se disponibilizou a avançarmos juntas. Aprendi muito!! Desde trabalho de campo a biologia molecular!!! Admiro sua determinação, seu empenho em realizar os trabalhos, sua coragem diante novos horizontes!! Mulheres na ciência!!

Ao Dr. Gabriel, meu coorientador. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com um tema que também tenho muito apreço: a microbiota!! Agradeço também pela parceria, ensinamentos e pelos esforços para que essa parte do projeto fosse desenvolvida!!

Aos membros da Banca, Dra. Érica Alessandra, Dr. Gustavo Menezes e Dra. Marina Mourão pela disponibilidade e contribuições importantes para que não somente esse trabalho se aperfeiçoasse como também eu pudesse crescer profissionalmente e pessoalmente!

Ao grupo Pecxisto pelos infinitos aprendizados sobre esquistossomose e trabalho de campo! Encantamento pela oportunidade de aproximar mais a ciência e a população! Obrigada!

Aos amigos queridos Caroline Penido e Pedro Sucupira que me acompanharam desde o início dessa jornada... sentirei muita saudade dos nossos lanches de acolhimentos e desabafos!! Carol, obrigada também por todos os momentos juntas, todo o carinho, sabedoria, inteligência, companhia, ensinamentos!! Você é muito especial!!

Aos amigos da sala de pesquisadores: Juliana, Paloma, Kátia, Débora, Thiago, Raul, Fabiano, Neviton, Laila, Beré, Paula. Carinhosos momentos... de amizade, conselhos, terapias coletivas, avanço do conhecimento, cooperação... aniversários!!!

Aos amigos que carrego no coração e que não fazem parte do IRR, mas que caminharam comigo durante esse processo com muito carinho, alegria, disponibilidade, encontros e conversas!!

Agradecimentos

Ao grupo de Meditação, em especial ao Professor Simranjeet pelo trabalho maravilhoso desenvolvido conosco, o que me auxiliou a manter o equilíbrio, avançando na minha percepção própria e da coletividade!

Ao Projeto Cuidar e toda sua equipe pela atenção dedicada com tanto zelo e excelência a saúde mental de todos do IRR, acolhendo servidores, alunos e tercerizados.

Ao Projeto de Saúde e Literatura!! Que terapia!! Trabalho lindo, desempenhado com grande maestria pela Daniela, Tânia, Kátia e Paloma. Tantas amizades e descobertas nesse grupo!! Durante minha jornada no Mestrado tive a companhia constante de João Guimarães Rosa...quanta alegria!!

À Sueleny, Patrícia, Aureo e Neusa pela disponibilidade, experimentos, ensinamentos, carinho... Vocês me ajudaram enormemente nessa travessia!! Super gratidão!!

Agradeço a Gardênia, Poliane e Fernando pela amizade e também pela grande ajuda nos experimentos!!

A todos do Grupo de Pesquisa em Biologia e Imunologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias, obrigada! Cada um de vocês contribuiu para realização desse projeto. Somos um grupo!!

À equipe da Plataforma de Imunohistoquímica do IRR. Obrigada Dra. Erica Alessandra e Dr. Vítor Miranda pela orientação e auxílio no tocante a histologia dos tecidos.

Ao Professor Dr. Ricardo Gonçalves e ao Laboratório de Patologia da UFMG pela colaboração.

À toda a equipe do Biotério de experimentação e produção do IRR pelo cuidado, ensinamentos, disponibilidade e colaboração.

À Plataforma de Citometria de Fluxo do IRR pelo suporte.

À Plataforma de Microscopia Confocal e Fluorescência do IRR pelo auxílio às análises realizadas.

À equipe da limpeza, em especial a Lili e Josi por cuidarem dos espaços comuns e dos nossos locais de trabalho!

À equipe dos Feneis, em especial ao Elmo e a Érica por manterem nossos materiais prontos para execução das atividades! Como isso auxilia as nossas tarefas!!

À equipe do Núcleo de Esterilização pelo apoio e pela colaboração.

À Coordenação e funcionários da Pós-Graduação e a todos os colegas de curso.

À Biblioteca do IRR por fornecer acesso à informação técnico-científica.

À equipe da portaria e vigilantes pela gentileza no dia a dia e também pelo suporte diante a necessidade.

Agradecimentos

À diretoria do IRR na pessoa da Dra. Zélia Profeta e os funcionários da Fiocruz Minas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

À todas as mulheres por persistirem e abrirem espaço para que cada vez mais possamos ter igualdade de oportunidades, direitos e reconhecimentos.

Agradecimento as Agências de Fomento

Agradeço ao Instituto René Rachou/ Fiocruz Minas pelo financiamento do projeto e a CAPES pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa”.

João Guimarães Rosa

Resumo

A vitamina D (vit.D), compreendida como um hormônio, é responsável pelos mecanismos de absorção do cálcio e fósforo, bem como desencadeia diversos eventos genômicos e não genômicos no organismo mediados por seus receptores VDRs presentes em uma ampla variedade de tecidos corporais como cérebro, coração, pele, intestino, gônadas, ossos, rins, paratireoides e células imunológicas, sendo essa última de interesse em nosso estudo. A vit.D apresenta importante papel imunoregulatório sobre linfócitos T e células APC, e sobre a diferenciação de células CD4+, promovendo uma alteração no perfil de resposta de Th1 para Th2, auxiliando no enfrentamento a determinados patógenos, bem como modulando o limiar de dano tissular potencial relacionado à resposta Th1. Além disso, participa da regulação da diferenciação das células precursoras em células mais especializadas no sistema monocítico-macrofágico. Estudos epidemiológicos evidenciam uma generalizada deficiência e insuficiência dessa vitamina em diversas regiões do mundo, especialmente na Ásia, África e América Latina o que pode predispor esses indivíduos a diversas doenças. Os continentes em destaque para hipovitaminose D apresentam também doenças relevantes de saúde pública, como é o caso da esquistossomose que afeta aproximadamente 240 milhões de pessoas ao ano, em 54 países, sendo o Brasil uma das regiões acometidas. O Praziquantel (PZQ), única droga disponível para o tratamento, não apresenta efeito contra formas jovens do parasito e possui eficácia reduzida em determinados grupos, pois depende da resposta imunológica do indivíduo para sua eficácia. Portanto, buscamos nesse trabalho compreender e avaliar o impacto da suplementação de 10.000UI de vit.D na esquistossomose e na eficácia do tratamento com subdoses de praziquantel. Estabelecemos um protocolo de suplementação de vitamina D que promoveu alterações séricas de seu metabolito ativo. Avaliamos o impacto dessa suplementação sobre o desenvolvimento e sobrevivência do *S. mansoni*, sobre níveis séricos de citocinas, anticorpos e na patologia hepática induzida pela infecção experimental e na eficácia do tratamento com doses subcurativas de Praziquantel. Nossos resultados mostraram que a suplementação com vitamina D não alterou a carga parasitária, antes e após o tratamento, não afetou os níveis séricos das citocinas TNF- α , IL-4, IL-2 e imunoglobulinas IgG, IgG1. Porém, encontramos diferenças significativas nos níveis séricos das citocinas IL-10, IL-17, IFN- γ e IL-6 e de IgG2c anti-SWAP e observamos uma redução significativa na área do granuloma hepático, em animais suplementados em relação aos controles. Nossos resultados evidenciaram a ação da vitamina D sobre a resposta imunológica específica contra o parasito e seu possível impacto sobre a patologia hepática. Estudos ainda são necessários para melhor compreensão desses eventos.

Palavras-chave: vitamina D, esquistossomose, sistema imune.

Abstract

The Vitamin D (vit.D) is known as a hormone and is involved in calcium and phosphorus absorption, as well as in triggering various genomic and non-genomic events in the body. Vitamin D actions are mediated by its VDR receptors present in a wide variety of body tissues such as the brain, heart, skin, intestine, gonads, bones, kidneys, parathyroid and immune cells, being the latter of interest in our study. The vit.D has an important immunoregulatory role on T lymphocytes and APC cells, and in the differentiation of CD4+ cells, promoting a switch in the immune response profile from Th1 to Th2. This shift helps the immune system to cope with certain pathogens, as well as to modulate potential tissue damage related to Th1 response. In addition, it participates in the regulation of differentiation of precursor cells into more specialized cells in the monocytic-macrophage system. Epidemiological studies show a generalized deficiency and insufficiency of this vitamin in several regions of the world, especially in Asia, Africa and Latin America. This hypovitaminosis D can predispose individuals to different diseases and is highly prevalent in continents that present relevant public health diseases, such as schistosomiasis. Schistosomiasis affects approximately 240 million people per year, in 54 countries, among them Brazil. Praziquantel (PZQ), the only drug available for treatment, has no effect against young forms of the parasite and has reduced efficacy in specific population groups, as it depends on the individual's immune response for its efficacy. Therefore, in this study we aimed to understand and evaluate the impact of supplementation with 10000UI of vit.D in schistosomiasis and in the effectiveness of treatment using subdoses of praziquantel. We established vitamin D supplementation protocol that promoted serum changes in its active metabolite. We evaluated the impact of this supplementation on the development and survival of *S. mansoni*, on serum levels of cytokines, antibodies, on liver the pathology induced by experimental infection and on the effectiveness of treatment with subcurative doses of Praziquantel. Our results showed that vitamin D supplementation did not alter parasitic burden before or after treatment, it also did not affect seric levels of TNF- α , IL-4, IL-2 cytokines and anti-Swap IgG, IgG1 immunoglobulins. However, we found significant differences increase in seric levels of IL-10, IL-17, IFN- γ and IL-6 and Swap specific IgG2, and a significant reduction in the area of hepatic granuloma in supplemented animals compared to controls. Our results showed the effect of vitamin D supplementation under some components of the immune response induced against the parasite that promoted a less severe pathology in the liver. More studies are still needed to better understand these events.

Key words: vitamin D, schistosomiasis, immune system.

Lista de Figuras

Figura 1. Fórmula estrutural plana da vitamina D2 (Ergocalciferol) e D3 (Colecalciferol).....	20
Figura 2. Metabolismo da vitamina D.....	21
Figura 3. Mecanismo de ação genômica e não-genômica da 1,25D.....	22
Figura 4. Ações da vitamina D sobre a imunidade inata e adaptativa.....	27
Figura 5. Prevalência da deficiência de vitamina D na população em geral e em gestantes....	29
Figura 6. Recomendações para a interpretação dos níveis séricos de 25OHD.....	30
Figura 7. Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coprocópicos no Brasil de 1998 a 2008.....	34
Figura 8. Ciclo da Esquistossomose.....	35
Figura 9. Desenho experimental.....	46
Figura10. Variação do peso dos animais submetidos à dieta controle e suplementada.....	55
Figura11. Consumo de ração dos grupos controle e suplementado durante a padronização..	56
Figura12. Concentração sérica de vitamina D nos grupos submetidos à dieta controle e suplementada.....	57
Figura13. Variação do peso dos animais durante o protocolo experimental.....	60
Figura14. Consumo de ração dos grupos controle e suplementado durante o experimento....	61
Figura15. Concentração sérica de vitamina D nos animais controle e suplementado infectados não tratados e tratados.....	62
Figura16. Número de vermes total (A), machos (B) e fêmeas (C) recuperados nos camundongos dos grupos experimentais.....	63
Figura17. Número de ovos presentes no intestino (A) e fígado (B) dos animais infectados não tratados e tratados.....	64
Figura18. Medida da área do granuloma hepático de animais controle e suplementado infectados e não tratados.....	65
Figura19. Produção de TNF- α em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	66
Figura20. Produção de IL-4 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	66
Figura21. Produção de IL-2 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	67
Figura22. Produção de IL-10 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	67

Lista de Figuras

Figura23. Produção de IL-17 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	68
Figura24. Produção de IFN- γ em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	68
Figura25. Produção de IL-6 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada.....	69
Figura26. Análise da resposta humoral de IgG (A), IgG1 (B) e IgG2c (C) anti-SWAP nos animais submetidos as dietas controle e suplementada.....	70

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição da ração AIN93M das dietas controle e suplementada.....	45
Tabela 2. Monitoramento comportamental dos animais no período de padronização.....	54
Tabela 3. Monitoramento animal de todos os grupos experimentais.....	58/59

25(OH)D: 25-hidroxivitamina D

1,25(OH)₂D₃: 1,25 Dihidroxivitamina D₃

AIDS: Síndrome Imunodeficiência Adquirida, do inglês: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

Ag: Antígeno

BIOP: Biotério de Produção

BIOTEX: Biotério de Experimentação

cAMP: Adenosina Monofosfato Cíclica, do inglês: *Cyclic Adenosine Monophosphate*

CaBp-9k: Proteína de ligação ao cálcio dependente de vitamina D, do inglês: *Vitamin-D-dependent calcium-binding protein*

CBA: Ensaio com beads em citometria, do inglês: *Cytometric Bead Array*

CCR2: Receptor de Quimiocina CC Tipo 2, do inglês: *CC Chemokine Receptor Type 2*

CEUA: Comissão de Ética de Uso de Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CYP27B1: Citocromo P450, isoforma 27B1

CYP2R: Citocromo P450, isoforma 2R

CXCR4: Receptor de Quimiocina CXC tipo 4, do inglês: *CXC Chemokine Receptor Type 4*

CYP27B1: 25-Hidroxivitamina D₃ 1-alfa-hidroxilase (VD₃ 1-α hidroxilase)

CYP450: Enzima Citocromo P450

DALY: Anos de vida ajustados por incapacidade, do inglês *Disability-Adjusted Life Years*

DBP: Proteína de Ligação a Vitamina D, do inglês: *Vitamin D Binding Protein*

DCS: Células Dendríticas, do inglês: *Dendritic cells*

EOL-1: Linhagem celular eosinofílica humana

EDTA: Etilenodiaminotetracético, do inglês: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês: *Enzyme linked immunosorbent assay*

FGF23: Fator de Crescimento Fibroblástico 23 ou FGF 23, do inglês: *Fibroblast Growth Factor 23*

FOXP3: Fator de transcrição para células T reguladoras, do inglês: *Forkhead Box P3*

GC: Guanilato ciclase, do inglês *Guanylate cyclase*

GHD: Dados de Saúde Global, do inglês: *Global Health Data*

GF: Livre de germes, do inglês: *Germ-Free*

HE: Hematoxilina e Eosina

Lista de Abreviaturas

- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*
- HOMA-IR:** Modelo de Avaliação da Homeostase, do inglês: *Homeostatic Model Assessment*
- ICAM:** Molécula de Adesão Intercelular, do inglês: *Intercellular Adhesion Molecule*
- IFN- γ :** Interferon-gama
- Ig:** Imunoglobulina
- IgAs:** IgA secretora
- IL:** Interleucina
- ILT3:** Transcrição do tipo imunoglobulina 3, do inglês: *Immunoglobulin-like Transcript 3*
- IOM:** Instituto de Medicina
- KOH:** Hidróxido de Potássio
- LDL:** Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês: *Low Density Lipoproteins*
- MCP1:** Proteína quimioatraente de monócitos 1, do inglês: *Monocyte chemoattractant protein 1*
- MHC-II:** Complexo principal de histocompatibilidade de classe II, do inglês: *Major Histocompatibility Complex*
- μ g:** Micrograma
- μ L:** Microlitro
- μ m:** Micrômetro
- MSC:** Células-tronco Mesenquimais, do inglês: *Mesenchymal Stem Cell*
- NaPi2b:** Proteína de transporte de fosfato dependente de sódio 2B, do inglês: *Sodium-dependent phosphate transport protein 2B*
- NFAT:** Fator Nuclear das Células T Ativadas, do inglês: *Nuclear Factor of Activated T-cells*
- NF-KB:** Fator kappa Nuclear B, do inglês: *Factor nuclear kappa B*
- NK:** Células matadoras naturais, do inglês: *Natural killer*
- NLR:** Receptores nodulares, do inglês: *Nod-Like Receptors*
- OMS:** Organização Mundial da Saúde, do inglês: *World Health Organization*
- T0:** Tempo zero
- PAMPs:** Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês: *Pathogen-Associated Molecular Patter*
- PBMC:** Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
- PD-L1:** Ligante de Morte Programada 1, do inglês: *Programmed Death-Ligand 1*
- PGE₂:** Prostaglandina E2
- PK:** Proteína Quinase, do inglês: *Protein Kinase*

Lista de Abreviaturas

- PTH:** Paratormônio, do inglês: *Parathyroid Hormone*
- RANKL:** Proteína Ligante do Recetor Ativador do Fator Nuclear kappa B, do inglês: *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand*
- ROR γ t:** Receptor órfão Gamma 2 do inglês: *Gamma 2 Orphan Receptor γ T*
- RUNX1:** Fator de Transcrição 1 Runt, do inglês: *Runt-Related Transcription Factor 1*
- RXR:** Receptor retinóide, do inglês: *Retinoid Receptor*
- SCFA:** Ácidos graxos de cadeia curta, do inglês: *Short-Chain Fatty Acids*
- SEA:** Antígeno Solúvel do Ovo, do inglês: *Soluble Egg Antigen*
- SPF:** Livre de Patógenos Específicos, do inglês: *Specific Pathogen Free*
- TCD4:** Linfócito T auxiliar, do inglês: *T helper cells*
- TCD8:** Linfócito T citotóxico, do inglês: *T cytotoxic cells*
- TGF- β 1:** Fator de crescimento transformador beta 1, do inglês: *Transforming Growth factor beta-1*
- TGI:** Trato Gastrointestinal
- Th1:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 1, do inglês: *T helper cells type 1*
- Th2:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 2, do inglês: *T helper cells type 2*
- TNF- α :** Fator de Necrose Tumoral α , do inglês: *Tumor Necrose Factor α*
- Th17:** Subpopulação de células T auxiliares do tipo 17 do inglês: *T helper cells type 17*
- TLR:** Receptor do tipo Toll, do inglês: *Toll-Like Receptor*
- Treg:** Subpopulação de células T reguladoras, do inglês: *T regulatory cells*
- TRPV5:** Canal de Potencial do Receptor Transitório V5, do inglês: *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 5*
- TRPV6:** Canal de Potencial do Receptor Transitório V6, do inglês: *Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6*
- UI:** Unidade Internacional
- UVB:** Radiação Ultravioleta B
- VDR:** Receptor de vitamina D, do inglês: *Vitamin D Receptor*
- VDR-AP:** Receptor de vitamina D alternativo, do inglês: *VDR-alternative pocket*
- VDRmem:** Receptor de vitamina D de membrana
- VDRnuc:** Receptor de vitamina D nuclear
- Vit.D:** Vitamina D
- Vit.D₂:** Vitamina D₂
- Vit.D₃:** Vitamina D₃

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Vitamina D.....	19
1.1.2 Receptor VDR	21
1.1.3 Efeitos Biológicos da Vitamina D	23
1.1.4 Vitamina D e Sistema Imune	24
1.1.5 Epidemiologia da Hipovitaminose D.....	28
1.2 Esquistossomose.....	32
1.2.2 Ciclo de Vida do <i>S. mansoni</i>	34
1.2.1 Fases da Doença	35
1.2.2 Imunobiologia da Esquistossomose.....	37
1.3 Vitamina D e Esquistossomose	41
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1 Animais.....	45
4.2 Ração Especializada	45
4.3 Cepas LE de <i>Schistosoma mansoni</i>	46
4.4 Protocolo Experimental	46
4.5 Monitoramento animal.....	47
4.6 Infecção percutânea	48
4.7 Coletas Sanguíneas	49
4.8 Dosagem de Vitamina D.....	49
4.9 Determinação dos níveis de anticorpos específicos para antígenos do <i>S. mansoni</i>	49
4.10 Avaliação do perfil de citocinas	50
4.11 Coletas das Fezes.....	51
4.12 Tratamento com doses subcurativas de Praziquantel.....	51
4.13 Perfusão dos animais	51
4.14 Contagem do número de ovos e avaliação histopatológica.....	52
4.15 Análise Estatística	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Padronização do protocolo experimental - Etapa 1	54
5.2 Avaliação do efeito da suplementação com vitamina D sobre a infecção pelo <i>S. mansoni</i> e sobre o tratamento com Praziquantel – Etapa 2	57

6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	79
8. PERSPECTIVAS.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICES.....	104
ANEXOS.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vitamina D

O termo vitamina D (vit.D) refere-se a um conjunto de moléculas secoesteróides, lipossolúveis, derivadas de reações enzimáticas interconectadas no organismo que ocorrem no sistema endocrinológico vitamina D. Esse sistema é composto pela proteína carreadora de vitamina D (DBP), pelo receptor de vitamina D (VDR), pelas enzimas que participam da cascata de reações de ativação e inativação da vitamina e pelos metabólitos produzidos por esta via (CASTRO, 2011). Esse complexo vitamina D se relacionava somente a ações osteomineralizantes através da regulação e interação da absorção do cálcio e fosfato pelos tecidos. Contudo, as descobertas dos receptores extrarrenais dessa vitamina propiciaram estudos que demonstraram as ações não-calcêmicas por ela desempenhadas, como também a reconhecendo como molécula hormonal (BOUILLON, 1995; CASTRO, 2011; HOLICK, 2017).

O metabolismo da vit.D apresenta como fonte principal a síntese endógena (80%-90%) que tem seu início na epiderme (camada de Malpighi) após exposição à radiação ultravioleta (UVB – 290nm a 315nm) (HOLICK et al., 1977). A parcela restante de vitamina D encontrada no organismo é proveniente da dieta (10%-20%) (Figura 2). A produção cutânea se origina da clivagem fotoquímica do 7-desidrocolesterol, formando a pré-vitamina D₃ (HOLICK et al., 1977). Essa molécula, uma vez formada, sofre um rearranjo molecular dependente de temperatura que resulta na formação de homodímeros em aproximadamente 24 horas, resultando na vitamina D₃ (colecalfiferol) (HOLICK et al., 1977, HART et al., 2011). A exposição excessiva à radiação ultravioleta B (UVB) não causa intoxicação por vitamina D, pois ela induz a produção de metabólitos inativos com a degradação do 7-desidrocolesterol e do colecalfiferol (HOLICK, 1977; CASTO, 2011; HART et al., 2011; ALTIERI et al., 2020).

O Colecalfiferol (vit.D₃) pode ser também proveniente da dieta através do consumo de peixes gordurosos de águas profundas e frias. Outra fonte alimentar de vit.D constitui-se no Ergosterol, oriundo de vegetais, em especial fungos. Assim como ocorre na síntese de vitamina D₃, o Ergosterol é convertido por meio da radiação UVB em Ergocalciferol (vitamina D₂) (JONES et al., 1975). Ambos os metabólitos (vit.D₃ e vit.D₂) são precursores da forma ativa da vitamina D (calcitriol).

A diferença entre as duas moléculas, além da origem, consiste na presença, no Ergocalciferol, de um grupo metil ligado ao carbono 24 e uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 (Figura 1) (HOLICK et al., 1977; HART et al., 2011).

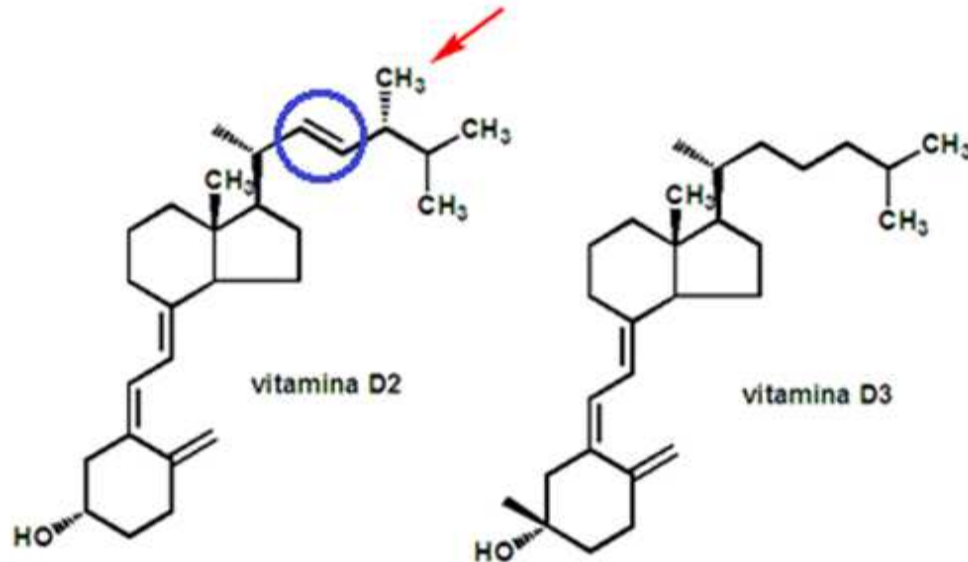


Figura 1. Fórmula estrutural plana da Vitamina D₂ (Ergocalciferol) e D₃ (Calecalciferol)

Adaptado: <https://robertofrancodoamaral.com.br/blog/wp-content/uploads/2014/01/vitaminas-d2-d3.png>

Independente da proveniência (Cutânea ou Intestinal), a biodiversidade desses metabólitos ocorre na circulação (HOLICK, 1995). No sangue, esses metabólicos são carregados, em sua maioria pelas proteínas carreadoras DBPs e, em uma fração menor, pela albumina em direção ao fígado para a primeira etapa de ativação. Alcançado esse órgão, sofrem hidroxilação mediada pela enzima citocromo P450 (CYP450) sendo convertidos em 25-hidroxivitamina D [25(OH) D] ou calcidiol (FRASER et al.,1970), que representa a forma circulante de maior quantidade, com meia vida de aproximadamente duas semanas (BLUNT et al., 1968; CASTRO, 2011). A etapa de conversão do calecalciferol e do ergocalciferol em calcidiol 25(OH)D é pouco regulada, por isso os níveis sanguíneos de 25(OH)D refletem proporcionalmente as quantidades de vitamina D ingeridas e/ou produzidas na pele (CASTRO, 2011). Na primeira passagem no fígado, aproximadamente 75% dos precursores vitamina D₃ e D₂ circulante são convertidos a calcidiol (HOLICK, 1999; MILLER E PORTALE, 1999; PROSSER E JONES, 2004).

A última etapa de ativação da vitamina D acontece nos rins, produzindo a 1,25 dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D₃] através da hidroxilação adicional pela enzima 1- α -hidroxilase (CYP27B1) na mitocôndria das células renais, originando a forma ativa da

vitamina D, o calcitriol (DEEB et al., 2007; HEWISON, 2010; MARQUES et al., 2010; CASTRO, 2011).

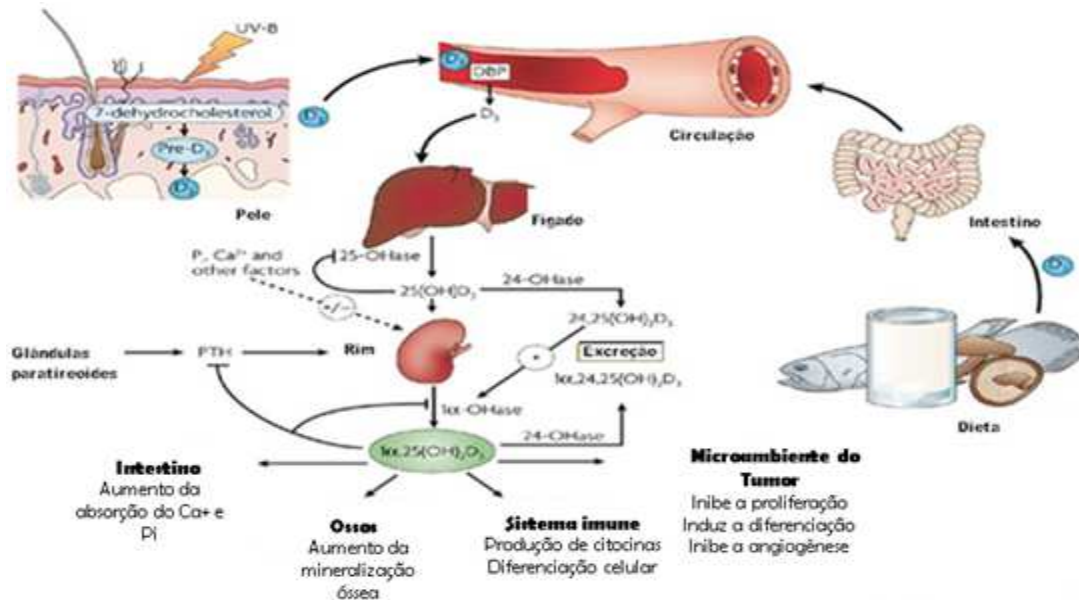


Figura 2. Metabolismo da vitamina D. Adaptado: DEEB et al., 2007.

Estudos demonstraram ocorrer essa hidroxilação final também de forma extrarrenal, pois diversas células (linfóides, mielóides, epiteliais) possuem receptores VDR e também a enzima necessária para essa reação em sua constituição, formando o metabólito ativo (SUDA et al., 1970; BOUILLON, 1995; STUMPF et al., 1979; ADAMS e HEWISON, 2008; BIKLE, 2014; KUNDU, 2014).

A regulação da 1- α -hidroxilase renal é dependente dos níveis de cálcio e fósforo, metabólitos do calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) e do Paratormônio (PTH). Por outro lado, a regulação extrarrenal decorre de fatores locais como produção de citocinas, fatores de crescimento e níveis de $25(\text{OH})\text{D}$, tornando essa via mais sensível à deficiência de Vitamina D (LEVENTIS et al., 2008).

1.1.2 Receptor VDR

A resposta biológica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é mediada pelo receptor de vitamina D (VDR) presente nas células em sua membrana plasmática (VDRmem) e na membrana nuclear (VDRnuc) (Figura 3). As ações desencadeadas a partir da interação vitamina-receptor distinguem-se em ações genômicas (vit.d-VDRnuc) e ações não-genômicas (vit.d-VDRmem).

As ações genômicas da 1,25 (OH) 2D₃ resultam de sua interação estereoespecífica com seu receptor nuclear, VDRnuc, que na presença do hormônio sofre mudanças conformacionais que resultam na heterodimerização com o receptor retinóide (RXR), interagindo com o DNA de forma a modular a expressão gênica. Estas ações podem perdurar por horas ou dias e são conhecidas como respostas genômicas (BOUILLON et al., 1995). Essa via resulta na ativação ou regulação da expressão de genes controlados pelo complexo vitamina D-VDR-RXR que se estima regular a expressão de 3% de todo genoma humano (BOUILLON et al., 2008).

Por outro lado, essa vitamina também pode desencadear uma resposta não-genômica por meio do receptor de membrana (VDR_{mem} ou VDR-AP) com ação rápida, segundos ou minutos, através da ativação de mensageiros secundários, tais como: vias guanilato ciclase (GC), fosfatidilinositol-3-quinase, Adenosina monofosfato cíclica (cAMP), mitogen-activated protein kinase; proteína quinase (PK)A e fosfolipase C; abertura dos canais de cálcio e cloro dependentes de voltagem e mobilização de cálcio do retículo sarcoplasmático (MASSHEIMER et al., 1994; LE MELLAY et al., 1997; MIZWICKI et al., 2009; HAUSSLER et al., 2011).

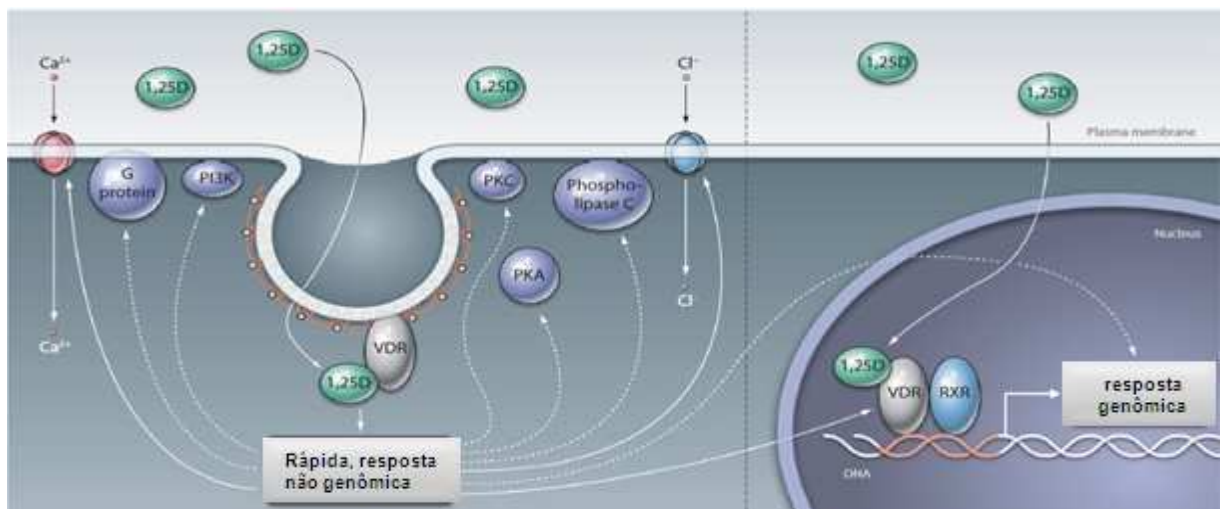


Figura 3. Mecanismo de ação genômica e não-genômica da 1,25D. Adaptado de Mizwicki *et al.*, 2009.

O VDR e a enzima 1 α -hidroxilase (enzima de conversão ao calcitriol) são expressos em diversas células, tais como: mamárias (SUDA et al., 1970), prostáticas (PEEHL et al., 1994), neurônios (EYLES et al., 2005), adipócitos, enterócitos (STUMPF et al., 1979), miócitos (BISCHOFF et al., 2001) e leucócitos (BOUILLON, 1995). Essas células são capazes de sintetizar a 1,25(OH)₂D₃ e, conseqüentemente, responder a esse hormônio através de seus respectivos VDRs. Dessa forma, ocorrem as ações intácrina, parácrina e endócrina da vitamina D (ADAMS et al., 2007; NORMAN, 2008; MIZWICKI et al., 2009; SCHUCH, 2009; VERHAVE et al., 2010).

1.1.3 Efeitos Biológicos da Vitamina D

A interação entre a forma ativa da vit.D (calcitriol) e seus receptores VDRs (de membrana ou nuclear) resultam em efeitos biológicos rápidos ou de longa duração, como já explanado.

As ações calcêmicas envolvem a homeostase do cálcio e fosfato e o metabolismo ósseo. O equilíbrio do cálcio no organismo mediado pela vitamina D ocorre através da absorção intestinal e renal. A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ regula a absorção intestinal do cálcio via transporte transcelular e paracelular (HAUSSLER et al., 2013; CHRISTAKOS et al., 2016). A absorção de Ca^+ ativa é regulada pelo estímulo à expressão de proteínas responsáveis pela captação do cálcio pelos enterócitos (TRPV5 e TRPV6), pelo aumento na produção de proteínas envolvidas no transporte intracelular do cálcio (claudinas) e também dos canais de membrana ATP-dependentes para extrusão do cálcio para o fluido extracelular. Além disso, a vitamina D induz a expressão de paracelinas (proteínas intercelulares), formando canais que auxiliam no transporte passivo desse cálcio por gradiente de concentração (HOENDEROP et al., 2005; HAUSSLER et al., 2013; CHRISTAKOS et al., 2016). Nos rins, ao nível do túbulo distal, acontece a reabsorção de cálcio via regulação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e pelo PTH, através de um mecanismo de transporte ativo, transcelular, semelhante ao que ocorre a nível intestinal (HOENDEROP et al., 2005; HAUSSLER et al., 2013; CHRISTAKOS et al., 2016). Assim, perante baixos níveis séricos de cálcio, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e o PTH estimulam a reabsorção renal de cálcio, induzindo a expressão e ativando o canal de cálcio TRPV5 e PTH (HOENDEROP et al., 2005; HAUSSLER et al., 2013; CHRISTAKOS et al., 2016).

O mecanismo envolvido na homeostase do fosfato compreende a correção da expressão do FGF-23 e da proteína cotransportadora de sódio e fosfato tipo 2b ($\text{NaPi}2\text{b}$). A vitamina D estimula a produção de $\text{NaPi}2\text{b}$ que promove a absorção intestinal de fosfato, sendo inibida pelo FGF-23 (SHIMADA et al., 2004). Ao mesmo tempo, a expressão do FGF-23 pode ser regulada por vias de sinalização dependentes ou independentes da ativação do VDR (SHIMADA et al., 2004).

O metabolismo ósseo via calcitriol decorre da ação sobre osteoblastos, através da ativação da via do NF- κ B, promovendo a transcrição do fator osteogénico RANKL (ligante do recetor ativador do NF- κ B) que liga-se ao receptor RANK presente nos precursores dos osteoclastos, induzindo a sua diferenciação em osteoclastos, e estimulando sua ação osteoclastogénica (HARRISON et al., 1989; ZHANG et al., 1997; DOSSING et al., 2005; HAUSSLER et al., 2013; CHRISTAKOS et al., 2016). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ também atua via

intácrina, por meio da CYP21B (25-hidroxivitamina D-1-alfa-hidroxilase) presente nos condrócitos da placa de crescimento, na diferenciação dessas células, na angiogênese e na osteoclastogênese durante o desenvolvimento endocondral *in vivo* (NAJA et al., 2009).

Os achados de receptores VDRs extrarrenais direcionaram estudos sobre sua ação em células e tecidos. As funções não-calcêmicas já descritas compreendem: modulação da ativação ou repressão de genes do ciclo G0/G1, diferenciação, multiplicação e apoptose de células (DEEB et al., 2007); regulação da esteroidogênese local, foliculogênese e espermogênese nas gônadas (BLOMBERG et al., 2010); modulação do crescimento celular da musculatura lisa e do sistema renina-angiotensina no músculo cardíaco (SIMPSON et al., 2007; LI et al., 2008); regulação do crescimento de miócitos, do volume da massa muscular, tônus e força no músculo esquelético (ROMEU et al., 2019); controle e síntese da insulina (BOURLON et al., 1999; STUMPF, 2008); crescimento neural e moduladores do desenvolvimento cerebral (NEVEU et al., 1994; SANCHES et al., 2009) e regulação, proliferação, maturação e diferenciação de leucócitos (PROVVEDINI et al., 1983; BOONSTRA et al., 2001; HEWISON, 2010).

Esses efeitos evidenciam a importância da vitamina D sobre sistemas biológicos, podendo exercer funções relevantes tanto na manutenção da homeostasia como no estabelecimento de doenças.

1.1.4 Vitamina D e Sistema Imune

As descobertas dos receptores VDRs em células do sistema imune despertaram o interesse em compreender o papel exercido pela vitamina D nas células do sistema imunológico. Pesquisas evidenciaram a presença desse receptor tanto em células da resposta imune inata (células epiteliais, macrófagos, células dendríticas), quanto em células da resposta imune adaptativa (células B e células T) (BHALLA et al., 1983; PROVVEDINI et al., 1983; BOONSTRA et al., 2001; MOK, 2013; AZRIELANT, 2017).

O sistema imunológico inato compreende componentes tanto do indivíduo quanto dos residentes (microbiota), sendo representado pelas barreiras físicas (pele, superfícies mucosas, muco e células endoteliais vasculares), enzimas expressas por células epiteliais e células fagocíticas (lisozima), proteínas e peptídeos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e outros expressos por fagócitos), componentes humorais inflamatórios (complemento, opsoninas, quimiocinas e citocinas), receptores celulares que reconhecem rapidamente

patógenos (receptores toll-like, NLR, receptores do tipo c-lectina) e células (mastócitos, células dendríticas, macrófagos, células neutrófilas e natural killer) presentes em todos os indivíduos desde o nascimento (ABBAS et al., 2015; AZRIELANT, 2017; SASSI et al., 2018).

A vitamina D é um regulador da imunidade inata e da imunidade adquirida (Figura 4). Os primeiros trabalhos publicados sobre esse tema foram estudos sobre patologias causadas por *Mycobacterium*, como tuberculose e hanseníase (HERRERA, 1949; AIREY, 1946). Essas pesquisas verificaram que a vitamina D foi capaz de contribuir para a melhora do quadro clínico, auxiliando no tratamento dos infectados com as sulfonas (Promin). Pesquisas posteriores demonstraram *in vitro* e *in vivo* os mecanismos envolvidos nos achados observados nesses primeiros trabalhos, demonstrando que a vit.D estimula a proliferação de monócitos, eleva nesses e em macrófagos a quimiotaxia, a autofagia, a capacidade fagocítica, a produção de IL-1 e catelicidinas, aumentando a atividade antimicrobiana (WANG et al., 2004, 2010; LIU et al., 2007; MARTINEAU et al., 2007; KHOO et al., 2011; SU et al., 2016; KIM et al., 2018). A exposição de monócitos humanos a patógenos, como *M. tuberculosis* e outros, regula a expressão do CYP27B1 e do VDR, aumentando assim a capacidade celular de produzir 1,25 (OH) 2D₃ no local da infecção e a capacidade para responder a esse metabólito (MARTINEAU et al., 2007; COUSSENS et al., 2012; SASSI et al., 2018).

Existem poucos dados sobre um efeito direto da vitamina D sobre eosinófilos, a principal célula efetora em reações alérgicas e importante na resposta contra helmintos. Sabe-se que os eosinófilos, assim como outras células imunológicas, expressam VDR. A expressão deste receptor é regulada pela exposição a 1,25 (OH) 2D₃, como mostrado na linhagem celular eosinofílica humana EoL-1 (LU et al., 2017). É importante ressaltar que o tratamento com 1,25 (OH) 2D₃ inibe a apoptose de eosinófilos, prolongando a sobrevivência celular. Além disso, a 1,25 (OH) 2D₃ regula positivamente a expressão de CXCR4 nos eosinófilos favorecendo a migração destas células para tecidos não inflamados (HIRAGUCHI et al., 2012). O efeito anti-apoptótico da vit.D promove também uma regulação da inflamação, ao reduzir a citólise destas células e a liberação de seus mediadores inflamatórios (ETHIER et al. 2016). Igualmente, já foi demonstrado *in vitro* que essa vitamina diminui a expressão dos mediadores inflamatórios de eosinófilos ao promover a interação do VDR com fatores de transcrição que regulam a expressão destes genes (LU et al., 2017). *In vivo*, camundongos deficientes em VDR apresentaram ativação espontânea de eosinófilos no intestino o que demonstra a importância da vit.D e seu receptor na regulação dessas células imunitárias (LU et al., 2017).

A resposta imunológica adaptativa também pode ser modulada pelo calcitriol. Foi demonstrado que este hormônio promove uma alteração no perfil de resposta de Th1 para Th2, modulando o dano tecidual potencial relacionado à resposta Th1 (BOONSTRA et al., 2001; HEWISON, 2010). Nas células T ativadas observa-se um aumento na expressão de receptores VDR e maior ligação e ativação desta vitamina. Esse mecanismo induz uma redução na produção de IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17, IL-22 e IL-23, e estimula a produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (BOONSTRA et al., 2001; ZAHRAN et al., 2018). Desse modo, há decréscimo no desenvolvimento de células Th1 e Th17 e acréscimo de Th2 (BOONSTRA et al., 2001; KHOO et al., 2011; STERLING et al., 2012; ZAHRAN et al., 2018). Na sepse infantil, a suplementação com vitamina D direcionaram a redução na produção de citocinas inflamatórias IL-6 e IL-1 β , melhorando o perfil da doença e o quadro geral das crianças (QURASHI et al., 2015).

Acredita-se que a vit.D normalize a proliferação e diferenciação de queratinócitos (BIKLE et al., 2012) e reduza a inflamação modulando as funções das células T e células dendríticas (DCs). A exposição direta a vitamina inibe a proliferação de células T, a expressão de IL-2, a produção de citocinas inflamatórias e promove o desenvolvimento de células T em Tregs (RIGBY et al., 1984; JEFFERY et al., 2009). Em suas ações também reprime a expressão de MHC-II e moléculas co-estimuladoras por DCs, levando à capacidade imunoestimuladora reduzida (PIEMONTE et al., 2000; GRIFFIN et al., 2001). Além disso, ela torna as DCs tolerogênicas ao regular negativamente a síntese de IL-12, aumentando a secreção de IL-10 e induzindo a expressão de ILT3 e PD-L1, direcionando a diferenciação de Treg e inibindo o desenvolvimento de células Th1 (PENNA et al., 2005; VAN DER AAR et al., 2011).

Estudos anteriores evidenciaram que linfócitos B em repouso expressam baixos níveis de VDR, no entanto, a expressão deste receptor é aumentada durante a ativação desta célula (MÜLLER et al. 1991). A 1,25 (OH) 2D₃ pode inibir a proliferação e diferenciação de células B. Contudo, dados referentes à ação da 1,25 (OH) 2D₃ nas células B são controversos. Por um lado, a vitamina D pode inibir indiretamente a função da célula B como resultado de alterações nas respostas das células T ou supressão da secreção de citocinas por monócitos / macrófagos (MÜLLER et al. 1991). Por outro lado, há relatos de que 1,25 (OH) 2D₃ afeta diretamente células B humanas inibindo a produção de imunoglobulinas (HEINE et al. 2002).

A vit.D é um imunossupressor em modelos de camundongos com doenças autoimunes, inflamatórias e alérgicas (LEMIRE et al., 1991; TAHER et al., 2008). Desse modo, ela e seus análogos vêm sendo utilizados com resultados promissores em tratamento tópico da psoríase

(SIGMON et al., 2009), em doenças autoimunes (esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistêmico) (MARQUES et al., 2010; McLAUGHLIN et al., 2018) nas doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa) (GARG et al., 2018; MARTIN et al., 2019), entre outras. Pesquisas realizadas com pacientes portadores de doenças autoimunes demonstraram uma redução na produção de IL-17A via ligação do VDR/calcitriol ao promotor do fator nuclear de ativação de células T (NFAT) e fator de transcrição 1 runt (RUNx1), inibindo o receptor órfão Gamma 2 (ROR γ t), que é o fator de transcrição de IL-17A e induzindo a produção de FOXP₃ (CHANG et al., 2010; JOSHI et al., 2011; PALMER et al., 2011; XIE et al., 2017).

Coussens et al. (2015), em um estudo longitudinal, ao avaliar o impacto da vitamina D basal, bem como a suplementação de 50.000UI em pacientes infectados pelo vírus HIV, verificou que altos níveis séricos de calcitriol relacionaram-se ao aumento de leucócitos circulantes, principalmente linfócitos (TCD4 e TCD8), redução na replicação viral periférica (via produção de peptídeos antimicrobianos) e melhora do estado geral, ao passo que baixas dosagens séricas desse metabólito associaram-se a progressão e mortalidade pela doença. Em pesquisa relacionada à vitamina D e câncer de mama, ao avaliarem 181 mulheres com câncer de mama e 197 controles, verificaram que os níveis de suficiência de vitamina D e a prática moderada de atividade física foram variáveis protetoras para esse tipo de câncer (OLIVEIRA-SEDIYAMA et al., 2016).

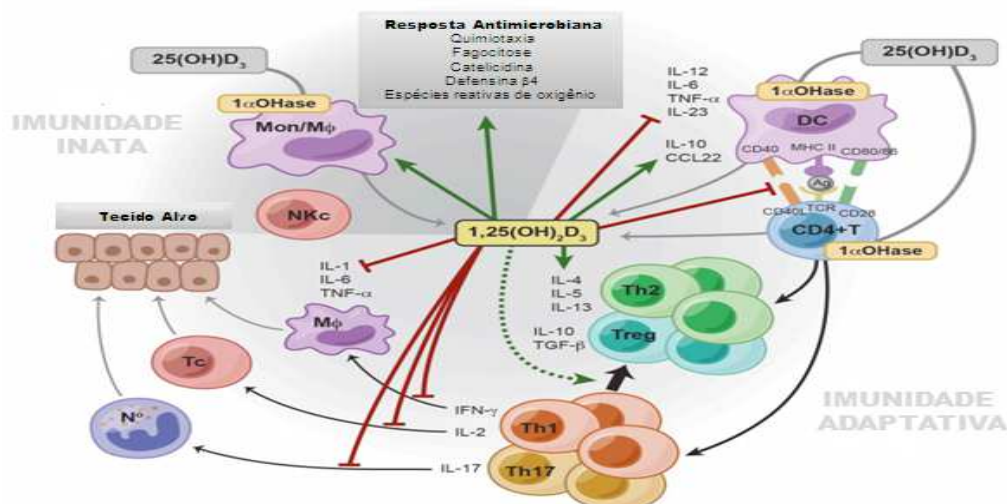


Figura 4. Ações da vitamina D sobre a imunidade inata e adaptativa. *In vitro*, a 1,25 (OH) 2D3 estimula o sistema imune inato, otimizando as respostas quimiotáticas e fagocitóticas de macrófagos, bem como a produção de proteínas antimicrobianas como a catelicidina. Por outro lado, ela promove uma modulação da imunidade adaptativa. A vitamina D induz a produção de citocinas Th2 (IL-4), ao passo que inibe a expressão das citocinas IL-12 e IL-23, deslocando indiretamente a polarização das células T de um fenótipo Th1 e Th17 em direção a um fenótipo Th2. Ela afeta diretamente as respostas das células T, inibindo a produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e citocinas Th17 (IL-17 e IL-21). Em Células Apresentadoras de Antígeno (APC) inibe a expressão do complexo MHC-II e de moléculas co-estimulatórias. Além disso, 1,25 (OH) 2D3 favorece o desenvolvimento de células Treg através da modulação de DCs por meio das células T. Fonte: Adaptado: MATHIEU, 2011.

Apesar de dados da literatura evidenciarem sua ação eficaz em diversas patologias humanas, estudos também demonstraram que a Vitamina D não apresenta efeito sobre algumas doenças. Ashenafi et al. (2019), em um estudo duplo-cego, em pacientes HIV positivos com doença progressiva lenta foram suplementados com 5.000UI de vitamina D, não verificaram diferença significativa em relação a carga viral e contagem de linfócitos entre os grupos controle e suplementado. No trabalho de De Lyra et al. (2006), foi avaliada a relação entre os níveis de Vitamina D e o câncer de mama em 88 mulheres com esse tipo de câncer e 35 controles (submetidos a mamoplastias ou ressecção de lesões benignas), não observando correlações significativas entre os níveis de vitamina D e o grau histológico do tumor I / II e III / IV.

Bilici et al. (2019), ao verificarem o efeito da suplementação de 200UI/dia em adolescentes obesos não observaram alterações significativas nas medidas de glicose, insulina, HOMA-IR, peptídeo C, resistência a insulina e taxa de síndrome metabólica, apesar de observarem uma redução significativa nos níveis de colesterol total e LDL, HbA1c, AST, PTH e IL-6.

1.1.5 Epidemiologia da Hipovitaminose D

A prevalência de baixo nível de vitamina D (hipovitaminose D) é um problema global em todas as faixas etárias, mesmo em países com exposição solar o ano todo (Figura 5). Estudos epidemiológicos e meta-análises revelaram uma deficiência e insuficiência dessa vitamina nos indivíduos em diversas regiões do mundo, o que pode predispor a doenças, pois a vit.D interage diretamente sobre tecidos biológicos importantes (PALACIOS et al., 2014; HILGER et al., 2014; HOLICK, 2017; ANTONIO et al., 2018).

Os limites de referência para determinação do *status* sérico de vitamina D que se associam a um maior risco de complicações à saúde se encontram em ampla discussão. Desse modo, as sociedades científicas atualizam regularmente suas recomendações quanto à suplementação de vitamina D (ZANINELLI, 2017).

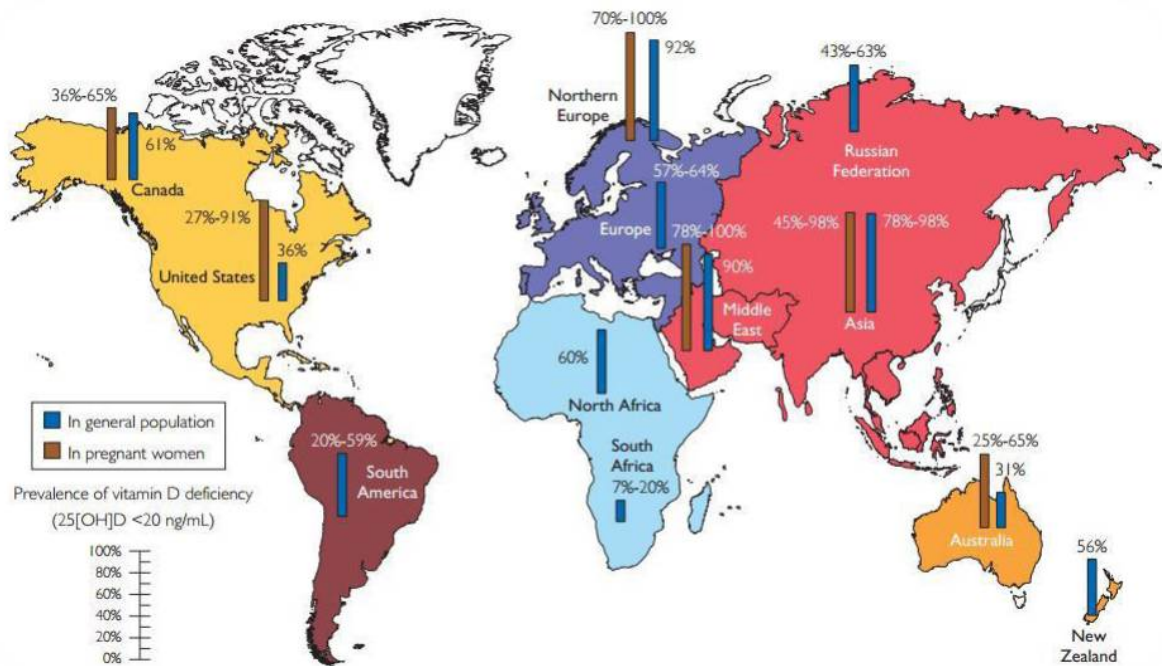


Figura 5. Prevalência da Deficiência de Vitamina D na população em geral e em gestantes. Adaptado: Fonte: Holick, 2017.

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, a Sociedade Brasileira de Metabolismo Ósseo e a Sociedade Brasileira de Endocrinologia se orientam pelas determinações do Instituto de Medicina - USA (IOM) e estabelecem os seguintes valores preconizados para dosagens séricas de vitamina D:

- Maior do que 20 ng/ml é o desejável para população geral saudável;
- Entre 30 e 60 ng/ml é o recomendado para grupos de risco como idosos (acima de 60 anos), indivíduos com fraturas ou quedas recorrentes, gestantes e lactantes, osteoporose (primária e secundária), doenças osteometabólicas tais como raquitismo, osteomalácia, hiperparatireoidismo, doença renal crônica, síndromes de má-absorção, após cirurgia bariátrica, doença inflamatória intestinal, medicações que possam interferir com a formação e degradação da vitamina D (terapia antirretroviral, glicocorticoides e anticonvulsivantes), neoplasias malignas, sarcopenia e diabetes;
- Entre 10 e 20 ng/ml é considerado baixo com risco de aumento da remodelação óssea e, com isso, perda de massa óssea, além do risco de osteoporose e fraturas;
- Menor do que 10 ng/ml é uma concentração muito baixa e com risco de evoluir com defeito na mineralização óssea, que é a osteomalácia, e raquitismo;
- Acima de 100 ng/mL risco de toxicidade e hipercalcemia.

BOUILLON (2017), em estudo publicado na *Nature Reviews Endocrinology* discutiu as diferenças nas recomendações para suplementação de vitamina D em mais de 40 nações, demonstrando a forma como as diferentes agências e países recomendam que seja feita a interpretação dos níveis séricos de 25 hidroxivitamina D (25(OH)D), conforme esquema a seguir:

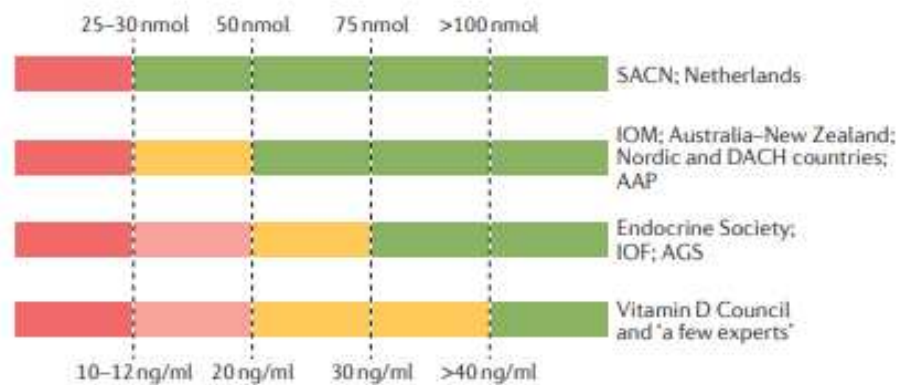


Figura 6. Recomendações para a interpretação dos níveis séricos de 25OH D. Código de cores: vermelho indica um estado de grave deficiência que deve ser corrigido sem exceção; laranja denota um estado de leve deficiência, em que a intervenção é aconselhável; verde indica um estado suficiente de níveis séricos que não necessita de suplementação adicional. AAP, americana Academia de Pediatria; AGS, American Geriatrics Society; DACH, Deutschland (Alemanha), Áustria e Confoederatio Helvetica (Suíça); IOF, Fundação Internacional de Osteoporose; IOM, Instituto de Medicina; SACN, Assessoria Científica Comitê de Nutrição. Fonte: BOUILLON, 2017.

A prevenção da hipovitaminose D, segundo o Instituto de Medicina (IOM), recomenda que bebês recebam imediatamente suplementação diária de vitamina D de 400 UI durante o primeiro ano de vida. Indivíduos entre 1 e 70 anos devem receber 600 UI de vitamina D diariamente e adultos > 70 anos devem receber diariamente dose de 800 UI de vitamina D (IOM, 2011). As doses preconizadas pelo IOM provavelmente aumentarão o 25 (OH) D a 20 ng/mL, que consideram adequados para a saúde óssea, mas não para níveis > 30 ng/mL, conforme o recomendado pela Sociedade de Endocrinologia.

Conforme entendimento da Sociedade de Endocrinologia (ES) a recomendação em suas Diretrizes Práticas é que os bebês durante seu primeiro ano de vida recebem uma suplementação diária de 400 a 1000 UI (até 2000 UI é seguro), crianças e adolescentes entre 1 e 18 anos uma suplementação diária de 600 a 1000 UI (até 4000 UI é seguro) e adultos > 18 anos suplementação diária de 1500 a 2000 UI (até 10.000 UI é seguro) para a prevenção de deficiência de vitamina D, pois as ações exercidas por essa vitamina no organismo são múltiplas (HOLICK et al., 2012 e ES, 2012).

Entretanto, indivíduos obesos, pacientes com síndromes de má absorção e pacientes com glicocorticóides, medicamentos anti-convulsivos e AIDS podem exigir doses mais altas

de vitamina D do que indivíduos sem estas condições (HOLICK et al., 2012). As Diretrizes de Prática Clínica da Sociedade Endócrina também recomendaram exposição ao sol, que para a maioria dos indivíduos é a principal fonte fisiológica de vitamina D, e forneceu uma lista dos alimentos ricos em vitamina D, incentivando a tomar um suplemento diário de vitamina D para garantir níveis adequados de 25 (OH) D.

Pesquisas que investigam o efeito da suplementação de vitamina D, em diversas regiões do mundo, demonstram uma melhora no quadro de saúde geral de indivíduos, seja na prevenção em populações de risco ou no tratamento da hipovitaminose D, bem como naqueles com patologias que se beneficiam com seu uso, após suplementação de vitamina D (SOUSA et al., 2017; DOBSON et al., 2018).

Trabalhos científicos desenvolvidos em diversas partes do mundo, com distintas faixas etárias, vem assinalando para uma abordagem mais reflexiva sobre os limiares dessa vitamina no organismo, pois os apontamentos são para um quadro mundial de deficiência em vit.D (PALACIOS et al., 2014; HILGER et al., 2014; HOLICK, 2017; ANTONIO et al., 2018).

Pesquisas em países com limitação de radiação solar como Nova Zelândia, Reino Unido e Estados Unidos demonstram que há deficiência de vitamina D em lactentes, o que também ocorre em regiões ensolaradas como África, Arábia Saudita e Austrália (CASEY et al., 2010).

Estudos em populações materno infantis na Turquia encontraram deficiência de vitamina D em 27,3% dos casos em lactentes e 30% dos casos em crianças de 12 a 24 meses (ONAL et al., 2010); no Canadá 50% dos 353 pesquisados, menores de seis meses, com amamentação não exclusiva e sem suplementação, não atingiram o consumo recomendado de vitamina D (SINA et al., 2010); no Japão, em 2009, nove em cada 100.000 crianças estavam com valores insuficientes dessa vitamina (MATSUO et al., 2009). No Brasil, em pesquisa com lactentes saudáveis com idade ≥ 6 a ≤ 24 meses, 6% apresentaram deficiência e 40% insuficiência dessa vitamina (ALMEIDA et al., 2018). Pesquisas em escolares indianos revelaram uma prevalência de deficiência grave de vitamina D (<9 ng/mL) em mais de 35% (MARWAHA et al., 2005) e mais de 80% das mulheres grávidas na Índia tiveram níveis de 25 (OH) D $< 22,5$ ng/mL (SACHAN et al., 2005). Dados epidemiológicos na África (PRENTICE et al., 2009), Austrália (VAN DER MEI et al., 2007), Brasil (MAEDA et al., 2007), Oriente Médio (SEDRANI et al., 1984; EL-HAJJ FULEIHAN et al., 2010), Mongólia (RICH-EDWARDS et al., 2011) e Nova Zelândia (ROCKELL et al., 2006) documentaram um alto risco de deficiência em vitamina D em adultos e crianças (PRENTICE et al., 2008; HOLICK et al., 2012).

As mudanças no estilo de vida, nos hábitos alimentares e nas formas de exposição solar são fatores de risco para a hipovitaminose D. Exposição à irradiação UVB restrita e limitada por roupas e bloqueadores, locais com pouca insolação e penetração da luz UVB, fatores biológicos como envelhecimento, cor da pele, doenças metabólicas (obesidade), degenerativas, inflamatórias, autoimunes, hepáticas e renais e alimentação pobre em nutrientes ricos em vit.D contribuem para redução da biodisponibilidade dessa vitamina no organismo (PREMAOR et al., 2005).

Conforme a literatura, as alterações séricas da vitamina estabelecem-se na proporção 100UI de vitamina D para elevar 1ng/ml na corrente sanguínea (VIETH et al., 2001; HEANEY et al., 2003; CATARINO et al., 2016). A exposição diária, de todo o corpo, durante 20 minutos a 1 hora é capaz de produzir por via endógena uma quantidade equivalente a 20.000UI de vitamina D (WACKER et al, 2013; HOLICK, 2014).

No entanto, certas condições, como doenças genéticas (TAYLOR et al., 1982) ou raros polimorfismos de enzimas envolvidas no metabolismo da vitamina D (SCHLINGMANN et al., 2011), assim como a ingestão excessiva com concentração sérica superior a 300ng/ml estão associados a um aumento do risco de toxicidade da vitamina D (JONES et al., 2008). Os sintomas de intoxicação por vitamina D incluem perda do apetite, náuseas e vômitos, seguidos por sede excessiva, aumento da emissão de urina, fraqueza, nervosismo e hipertensão arterial.

1.2 Esquistossomose

A esquistossomose, barriga d'água, xistose ou bilharziose consiste em uma verminose que compõe os quadros de doença tropical negligenciada, de transmissão hídrica, tratável, de relevância para a saúde pública. Essa patologia pode ser causada por sete espécies do trematodo *Schistosoma*: *S. haematobium* (Bilharz, 1852), *S.japonicum* (Katsurada, 1904), *S. mansoni* (Sambon, 1907), *S. mattheei* (Veglia & Le Roux, 1929), *S.intercalatum* (Fisher, 1934), *S. mekongi* (Voge, Bruckner & Bruce, 1978) e o *S. malayensis* (Greer, Ow-Yang & Yong, 1988). Destas, o *S. mansoni* é a predominante no continente americano.

A ocorrência dessa parasitose associa-se a localidades sem saneamento ou com saneamento básico inadequado. Outros fatores, como o nível socioeconômico, ocupação, lazer, grau de educação e informação da população exposta ao risco da doença, além do saneamento, contribuem para a ocorrência dessa patologia, em maior ou menor intensidade, de acordo com a realidade local (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A esquistossomose acomete aproximadamente 240 milhões de indivíduos ao ano, em 54 países, com predominância na África, Ásia e América Latina (WHO, 2014, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017/2014; KATZ, 2018; McMANUS et al., 2018). O Global Health Data (GHD) estimou uma perda de 1,45 milhões de DALYs (Disability-adjusted life years) pela esquistossomose no mundo, sendo essa considerada, entre as helmintoses, a mais representativa em termos de morbidade e mortalidade. Esse indicador mede a morbimortalidade levando em conta os anos de vida perdidos ajustados pela incapacidade ou os anos de vida potencialmente perdidos por morte prematura devido à doença (GHD, 2016).

O Brasil enquadra-se nas áreas de risco para a patologia, estando ela presente em 19 estados, sendo 8 destes endêmicos, apresentando-se o Nordeste e Sudeste como os limites geográficos mais acometidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017/2014; KATZ, 2018) (Figura 7). O Brasil figura entre os quadros da Organização Mundial de Saúde (OMS) como nação compromissada no controle e eliminação da infecção (WHO, 2014; OPAS, 2017).

As formas de controle e eliminação da esquistossomose compreendem o diagnóstico e tratamento, vigilância e controle dos hospedeiros intermediários, ações educativas em saúde e ações sanitárias; ainda não existem vacinas disponíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O diagnóstico é orientado pelo histórico do paciente em área endêmica, residente ou visitante. A confirmação da parasitose realiza-se pelo exame parasitológico de Kato-Katz e de modo complementar por testes sorológicos, biópsia retal, biópsia hepática, pesquisa de antígeno circulante por ELISA, intradermoreação, ultra-sonografia do abdômen, radiografia do tórax e endoscopia digestiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O Praziquantel, único fármaco disponível para o tratamento dos infectados, possui baixo custo, sendo administrado em dose única, 50 mg/kg de peso para adultos e de 60 mg/kg de peso para crianças, por via oral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Porém, este fármaco apresenta limitações de eficácia quando utilizado em paciente imunocomprometidos, crianças menores de 2 anos, gestantes e idosos, pois necessita da resposta imune dos indivíduos para eliminação eficaz do verme (FREZZA et al., 2007; DA SILVA et al., 2017). Além disso, não é efetivo contra formas mais jovens do parasito e foram relatadas resistência e tolerância do helminto ao fármaco, bem como restrições quanto a produção em larga escala (FREZZA et al., 2007; MESSERLI et al., 2009; DA SILVA et al., 2017; ABOU-EL-NAGA et al., 2019). A abordagem terapêutica inadequada cursa com agravamento e possível óbito do infectado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

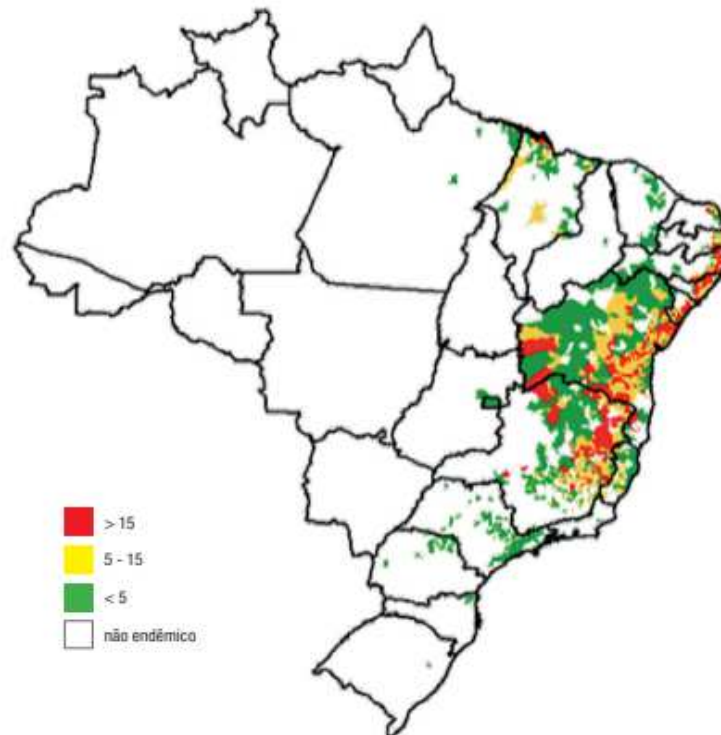


Figura 7. Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos no Brasil de 1998 a 2008. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/MS

1.2.2 Ciclo de Vida do *S. mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* ocorre alternadamente em um hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, onde ocorre a reprodução assexuada e um hospedeiro vertebrado definitivo, principalmente o homem, no qual a reprodução é sexuada (SOUZA & LIMA, 1997; LEWIS E TUCKER, 2014) (Figura 8).

A transmissão da esquistossomose ocorre por meio do contato do homem com coleções hídricas contaminadas por cercárias liberadas pelo hospedeiro invertebrado. As cercárias penetram ativamente pela pele do hospedeiro definitivo, auxiliadas pela presença de L-arginina e pelo calor proveniente desse (HAAS et al., 1997 e 2002; INGRAM et al., 2003). Ao atravessar a pele, as cercárias perdem a cauda e sofrem modificações morfológicas se transformando em esquistossomulos que alcançam a corrente sanguínea (FAUST et al., 1934; SOUZA & LIMA, 1997). Os esquistossomulos são carreados pelo fluxo sanguíneo para coração, pulmão e fígado. Nos vasos intra-hepáticos, os esquistossomulos se desenvolvem em vermes adultos machos e fêmeas. (FAUST et al., 1934; SOUZA & LIMA, 1997; HAAS et al., 1997 e 2002; INGRAM et al., 2003).

Os vermes adultos, acasalados, migram contra corrente circulatória, para as veias mesentéricas, onde farão a oviposição. As fêmeas maduras passam a depositar aproximadamente 350 ovos por dia. Uma parcela destes ovos atravessa a parede do intestino e são liberados junto às fezes no meio externo (VALADARES et al., 1981; PELLEGRINO & COELHO, 1978). Contudo, alguns ovos permanecem retidos na mucosa intestinal e/ou são direcionados, por meio do sistema vascular para o fígado, desencadeando uma reação inflamatória granulomatosa nesses locais.

Uma vez que os ovos do parasito eliminados junto às fezes do hospedeiro entram em contato com água, os miracídeos, estimulados pela luz e alta temperatura eclodem e nadam em direção ao hospedeiro invertebrado. Ao penetrarem os moluscos, os miracídeos transformam-se em esporocistos primários e estes em esporocitos secundários, que darão origem às cercárias de cauda bifurcada que retornarão ao ambiente.

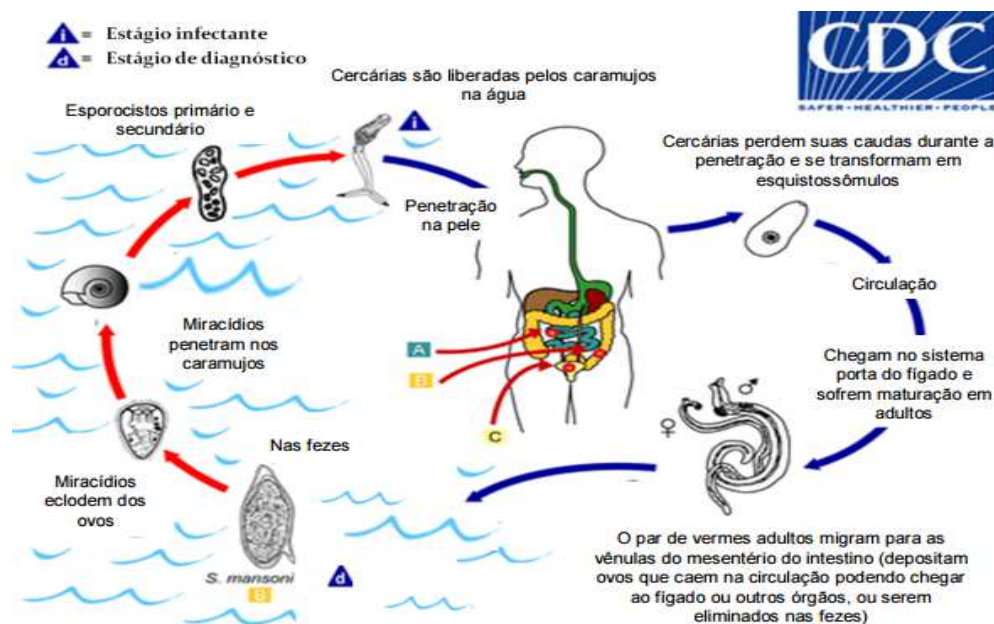


Figura 8. Ciclo da Esquistossomose. O esquema representa o ciclo de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. Apresenta uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário (setas vermelhas) e uma fase de reprodução sexuada no hospedeiro vertebrado (setas azuis). Adaptado do CDC: Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>.

1.2.1 Fases da Doença

A infecção por *S. mansoni* classifica-se em duas fases: uma fase transitória (aguda) e outra crônica que pode se apresentar de maneira polimórfica, compreendendo as formas digestivas, os distúrbios vasculares pulmonares, as formas pseudoneoplásicas, a nefropatia esquistossomótica e as lesões ectópicas (FILHO et al., 1996; DE SOUZA et al., 2011).

A fase inicial ocorre logo após o contato infectante, podendo apresentar manifestações clínicas como a dermatite cercariana, caracterizada pela erupção papular, eritema, edema e prurido, de duração transitória que cede quase sempre espontaneamente (DE SOUZA et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; McMANUS et al., 2018). Após três a sete semanas de exposição pode ocorrer a febre de Katayama associada à migração dos esquistossômulos e ao início da oviposição, com sintomas que incluem febre, calafrios, tosse, náuseas, dor abdominal, mal-estar, mialgia, eosinofilia marcante e infiltrados pulmonares (LAMBERTUCCI et al. 1987; JAURÉGUIBERRY et al., 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; McMANUS et al., 2018).

Entretanto, na maioria dos casos, essa fase manifesta-se de forma assintomática, principalmente nos residentes de áreas endêmicas, e, por isso, os sinais e sintomas são mais observados em infecções primárias (NEVES, MARTINS & TONELLI, 1966; JAURÉGUIBERRY et al., 2010, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Após a fase inicial da doença, que pode apresentar-se expressiva, branda ou assintomática, institui-se a fase crônica aproximadamente seis meses após a infecção. Nesse estágio, distintas manifestações clínicas podem se desenvolver, pois seu curso dependerá de fatores endógenos e exógenos ao hospedeiro, o que determinará a gravidade da patologia. Segundo Andrade (2008), 90% dos pacientes desenvolvem a forma leve, sendo muitas vezes assintomáticos, e de 4 a 10% apresentam formas graves. A gravidade nessa fase relaciona-se aos tecidos afetados e a severidade do seu comprometimento.

A fase crônica, como já mencionada, apresenta-se com distintas categorias. As digestivas compreendem as formas, intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, sendo as duas primeiras características de um período intermediário e mais branda desse estágio (PRATA, 2008); os distúrbios vasculares pulmonares que clinicamente podem individualizar-se em hipertensivos e cianóticos (MALTA, 1994), ambos comumente associados à patologia hepatoesplênica; as pseudoneoplásicas em que há excessiva neoformação conjuntiva hiperplástica devido à resposta anômala aos elementos esquistossomóticos ou somente um conglomerado de ovos e granulomas (BOGLIOLO, 1981); o acometimento renal que se classifica em incipiente, de proliferação mesangial, síndrome edemigênica e síndrome nefrótica frequentemente acompanhada por graus variáveis de insuficiência renal (MALTA, 1994; DE SOUZA et al., 2011) e, por fim, as formas ectópicas consideradas como aquelas nas quais a presença do elemento parasitário – ovos ou vermes adultos – é localizada fora do sistema porto cava, o habitat natural do helminto, tendo importância a neuroesquistossomose. (FERRARI *et al.*, 2008; PRATA, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2011).

1.2.2 Imunobiologia da Esquistossomose

A imunobiologia da esquistossomose é complexa, com fases distintas de resposta imunológica em função das transformações apresentadas pelo parasito, bem como dos fatores ambientais, genéticos e fisiológicos envolvidos nessa resposta.

A fase inicial da doença apresenta quadro clínico diversificado, podendo ser assintomático ou polissintomático, a depender de infecção primária ou residente de área endêmica como já explanado (NEVES, MARTINS & TONELLI, 1966). Independentemente da apresentação clínica da fase aguda, são reconhecidos dois períodos evolutivos: o pré-patente (fase evolutiva pré-postural) e o pós-patente (fase evolutiva pós-postural) (SILVA et al., 2008).

O período pré-postural corresponde à exposição do hospedeiro às cercárias, a migração dos esquistossômulos e a maturação dos vermes adultos, sendo marcado por infiltrados de células polimorfonucleadas (PBMC) e pela produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , INF- γ , IL-1 e IL-6, caracterizando um perfil de resposta Th1 em infecção primária (RABELLO, 1995; MONTENEGRO et al., 1999; PEARCE et al., 2002). Corroborando o entendimento, pesquisas sobre a esquistossomose humana demonstraram que a resposta imune predominante no período pré-patente da fase aguda é do tipo Th1, com grande produção de IFN- γ e baixa produção de IL-5, sendo a produção de IL-10 baixa nesse período e elevada 120 dias após a infecção, no período pós-patente (DE JESUS et al., 2002; MONTENEGRO et al., 1999).

Nos indivíduos de áreas endêmicas a ausência de sintomas e um perfil de resposta imune Th2 nessa fase podem ser explicados pelo fato da sensibilização pelo *Schistosoma* em infecções prévias, como também, ainda no útero, haver a transferência materna de antígenos solúveis através da placenta para o feto (CARLIER et al., 1980). Assim, a pré-existência de um padrão ou resposta do tipo 2 em moradores de áreas endêmicas pré-sensibilizados, pode direcionar a uma menor susceptibilidade ao desenvolvimento do quadro inflamatório, característico da fase aguda da doença, quando houver infecção (PEARCE et al., 2002).

Sabendo-se que estes indivíduos de área endêmica têm uma resposta imune predominantemente Th2, é possível considerar que a resposta tipo Th1 seja mediadora de lesão tecidual e responsável pelo quadro clínico na esquistossomose aguda (SILVA et al., 2008).

Estudos relacionaram o agravamento da patologia à persistência de um estado pró-inflamatório marcado pelo aumento de citocinas do tipo Th1, como interferon (IFN- γ), fator

de necrose tumoral (TNF- α) e a deficiência de citocinas do tipo Th2, como interleucina IL-4 e IL-10, ou ambas (RUTITZKY et al., 2006).

Em conformidade com estes dados, pesquisas demonstraram que camundongos knockout de IL-4 e IL-10 infectados por *S. mansoni* morreram por quadro de hemorragia intestinal, caquexia e lesão hepática sem haver um aumento do número de parasitas ou ovos. Esses animais apresentaram uma falta de resposta Th2, moduladora de inflamação tissular, sendo a resposta inflamatória responsável pelo quadro clínico apresentado (BRUNET et al., 1997; HOFFMAN, CHEEVER & WYNN, 2000; SILVA et al., 2008).

A resposta Th1 é necessária para liberação de IFN- γ e IL-2, contribuindo para a formação do granuloma, porém o prolongamento dessa resposta direciona a um aumento da patologia e mortalidade (PEARCE et al., 2002). Na avaliação de monócitos em pacientes com esquistossomose foram observados níveis significativos de IL-6, TNF- α e TGF- β e citocinas pro-fibróticas, correlacionado aos quadros graves de fibrose (FERNANDES et al., 2014).

No decorrer do tempo de infecção, as transformações morfológicas do parasito na medida em que se desenvolve em verme adulto e inicia a produção de ovos (fase pós-postural) direcionam alterações no perfil da resposta imune Th1, característica do início da infecção para perfil Th 2 com aumento na produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL13 (BURKE, et al., 2009). Os vermes encontram-se acasalados e a liberação e a presença de ovos no organismo do hospedeiro promove uma reação inflamatória focal, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares, dispostos de forma organizada, denominada granuloma (LENZI et al., 1998).

Os granulomas protegem os tecidos do hospedeiro facilitando o processo de translocação do ovo para o lúmen gastrointestinal, circundando esses ovos e isolando as toxinas produzidas nesse processo. Paradoxalmente, a resposta granulomatosa também é responsável pela patogênese da doença, principalmente quando os ovos se depositam nos vasos hepáticos. Os granulomas hepáticos quando não modulados podem causar inflamação grave, eosinofilia tecidual, deposição de colágeno, fibrose e hipertensão portal. Significativa parcela da sintomatologia da esquistossomose mansônica está associada à resposta inflamatória granulomatosa induzida por ovo e fibrose associada (DUNE & PEARCE, 1999; PEARCE et al., 2002; AMARAL, 2017). A reação granulomatosa resulta em fibrose de tecidos, o que pode gerar comprometimento relevante e prejudicar a funcionalidade dos órgãos afetados, levando aos quadros mais característicos e graves da esquistossomose como hipertensão portal, hepatomegalia, esplenomegalia, aumento do volume abdominal

representado por ascite e formação de varizes esofagianas e hemorroidais (PRATA E BINA, 1968; LENZI et al., 2008; McMANUS et al., 2018).

Do ponto de vista histopatológico, Lenzi e colaboradores (1998), descreveram de forma detalhada os granulomas decorrentes da infecção experimental por *Schistosoma* em modelo murino. Segundo o estudo, os estágios do granuloma compreendem o pré-granulomatoso e o granulomatoso. O estágio pré-granulomatoso é caracterizado pela organização e estabelecimento da reação granulomatosa ao redor do ovo do parasita, com destruição focal das paredes dos vasos envolvidos e/ou parênquima adjacente e presença abundante de eosinófilos e macrófagos. Tal estágio pode ser subdividido em: estágio pré-granulomatoso de reatividade fraca ou inicial e estágio pré-granulomatoso exsudativo. Já o estágio granulomatoso é subdividido em três fases: exsudativo-produtivo, produtivo e involucional (involucional com dissociação das fibras colágenas, involucional com camada de colágeno espessa, involucional com camada de colágeno fina e involucional com pigmento macrófágico). Esses estágios caracterizam-se pelos diferentes perfis celulares (células epitelióides, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, fibroblastos, células gigantes e linfócitos) que se estabelecem ao redor ovo em distintas regiões, envoltas por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, inicialmente dispostas em malha e que, com o desenvolvimento do granuloma se dispõem de forma concêntrica, até ocorrer à degradação da matriz extracelular no estágio involucional e o granuloma se desintegrar e desaparecer completamente.

O estágio inicial de formação do granuloma é marcado pela produção das citocinas IL-1, TNF- α e IFN- γ (DUSTIN et al., 1986), sendo IL-2 e IL-4 abundantes no granuloma experimental (YAMASHITA & BOROS, 1992). O TNF- α e a ICAM participam da ativação de linfócitos e, conseqüentemente da formação do granuloma (LUKACS et al., 1994).

A manutenção da reatividade granulomatosa (segunda fase), na qual o granuloma apresenta-se maior, há um predomínio de citocinas IL-4, que desempenha o principal papel regulador na formação do granuloma (YAMASHITA & BOROS, 1992; CHENSUE et al., 1993) e IL-5, que aumenta o recrutamento de eosinófilos, a proliferação e a diferenciação de células B (WEINSTOCK, 1992; SHER et al., 1990).

O terceiro estágio de reação granulomatosa, após a fase aguda da doença, compreende um período de imunomodulação, com secreção de citocinas por linfócitos TCD4+ específicos ativados que promovem a regulação do granuloma (WEINSTOCK & BLUM, 1987) com redução no seu diâmetro e conseqüentemente decréscimo na inflamação ao redor dos ovos (ANDRADE & WARREN, 1964).

Dados ainda controversos vêm sendo obtidos sobre o papel das células Th1 e Th2 e das citocinas secretadas por elas no desenvolvimento da resposta granulomatosa, após a deposição de ovos nos tecidos do hospedeiro (WYNN & CHEEVER, 1995).

Pesquisas evidenciaram o efeito tóxico da resposta Th2 na formação do granuloma, pois as citocinas produzidas associam-se a uma maior deposição de componentes da matriz extracelular do que a resposta Th1 (CHEEVER et al., 1994). Estudos em modelos murinos evidenciaram a ativação de macrófagos por citocinas Th2, aumentando a expressão de arginase com produção de prolina, aminoácido essencial na produção de colágeno, estando, assim, envolvidas na formação de granulomas e na fibrogênese. A IL-13 estimula os fibroblastos hepáticos a sintetizarem proteínas da matriz extracelular, aumentando, assim, a produção de tecido fibroso (CHEEVER et al., 1994).

Em contrapartida, estudos realizados em pacientes com hepatoesplenomegalia severa decorrente da esquistossomose detectaram altos níveis de IFN- γ e TNF- α acompanhados de baixos níveis de IL-5, sugerindo que as citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) relacionavam-se com a sintomatologia desses pacientes (MWATHA et al., 1998). Esses achados corroboram com dados obtidos por Brunet et al. (1997) em estudo realizado com camundongos deficientes em IL-4 infectados com *S. mansoni* os quais não foram capazes de desenvolver uma resposta Th2 efetiva e apresentaram morbidade e mortalidade elevadas. A patologia nesses animais foi atribuída ao aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios.

Hoffmann, Cheever e Wynn (2000) em seu trabalho demonstraram que tanto as respostas polarizadas Th2 quanto as respostas polarizadas Th1 são danosas, e atribuíram a IL-10 o papel de controlar a excessiva polarização Th1 e Th2 durante a infecção na esquistossomose murina. Em consonância aos dados encontrados, Malaquias e colaboradores (1997) constataram um aumento na resposta proliferativa de PBMC em pacientes infectados crônicos intestinais, em cultura, após o bloqueio da ação da IL-10, com anticorpos monoclonais, sugerindo a importância desta citocina em modular a resposta tipo 2 em pacientes crônicos assintomáticos. Esses autores, ao avaliar o papel da IL-10 na formação do granuloma *in vitro* utilizando PBMC, de pacientes de diferentes formas clínicas, incubadas com *beads* recobertas por SEA verificaram que a cultura de PBMC de indivíduos agudos não resultou em alteração significativa do tamanho do granuloma, porém, na cultura de PBMC de indivíduos com a forma crônica intestinal houve um aumento do tamanho do granuloma, demonstrando que a citocina IL-10 tem importante papel no controle da morbidade da doença (FALCÃO et al., 1998).

Estudos experimentais têm revelado um papel da citocina IL-17 (RUTITZKY & STADECKER, 2006; ZHANG et al., 2015) e das células T regulatórias (Treg) na infecção pelo *Schistosoma*. Em modelo animal, Rutitzky & Stadecker (2006) demonstraram que a IL-17 associa-se à formação da fibrose hepática, pois ao tratarem camundongos com anticorpos anti-IL-17 neutralizantes constataram uma redução significativa da inflamação hepática.

Em relação às Treg, Fontenot et al. (2003) ao avaliarem o papel das células T reguladoras na esquistossomose observaram a redução do granuloma em sua presença (FONTENOT et al., 2003). No entanto, a correlação entre essas células e o volume reduzido dos granulomas ainda não está totalmente esclarecida (WILSON et al., 2007).

A imunologia da esquistossomose é multifatorial, influenciada por fatores internos e externos aos indivíduos infectados, sendo as diferentes manifestações clínicas relacionadas a um perfil de resposta diversificado. Assim, compreender essa imunidade e sua regulação torna-se relevante para o controle da doença e da morbidade associada a ela.

1.3 Vitamina D e Esquistossomose

Os avanços científicos relacionados ao estudo da vitamina D e suas funções evidenciaram sua interação direta sobre sistemas biológicos importantes e suas ações na homeostasia e nas doenças. Ocorre que estudos epidemiológicos revelaram uma generalizada deficiência e insuficiência dessa vitamina em diversas regiões do mundo, especialmente na Ásia, África e América Latina, o que pode predispor esses indivíduos a diversas doenças (HILGER et al., 2014). Nesse campo, podemos citar a esquistossomose, doença negligenciada, de relevância pública e também endêmica nesses continentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Nesse sentido, Ramos-Martínez et al. (2015), em um estudo de revisão, observaram que as funções dessa vitamina sobre o processo inflamatório apresentaram-se relevantes e podem auxiliar no controle das doenças parasitárias, abrindo possibilidades para uma aplicação terapêutica.

Poucos trabalhos avaliaram direta ou indiretamente a conexão entre a esquistossomose e a suplementação ou deficiência de vitamina D. Olsen e colaboradores (2003), na linha da avaliação nutricional relacionada à verminoses, verificaram o efeito da suplementação de multimicronutrientes (vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, folato, niacina, vitamina C, vitamina D, vitamina E, ferro, zinco, iodo, selênio) na infecção e re-infecção por distintos helmintos (*A. lumbricoides* (Linnaeus, 1758), *T. trichiura* (Linnaeus, 1771; Stiles, 1901), *S.mansoni*). Em seus resultados, observou-se que crianças que receberam

suplementação de micronutrientes exibiram redução significativa na contagem ovos por grama de fezes, bem como decréscimo na taxa de re-infecção por *S.mansoni* quando comparadas às crianças que receberam o placebo.

Nessa linha, Reilly e col (2012), em seu trabalho em humanos, verificaram a associação entre micronutrientes (Vitaminas A, D e Ferro) com a resposta imunológica contra o *Schistosoma haematobium*. Esses autores observaram que 67.2% dos participantes apresentavam deficiência em vit.D, bem como diminuição na produção de IL-4, chamando a atenção para esse dado que foi inesperado no estudo e que julgaram relevante pelas relações já demonstradas entre a vitamina D e sistema imune, bem como a importância do impacto desse achado na patologia.

Estudos em humanos demonstraram que a resistência à reinfecção por *Schistosoma* têm sido associada às respostas celulares do tipo 2 caracterizadas por eosinofilia, produção de imunoglobulina E específica (IgE) contra esquistossomos e citocinas como IL-4 e IL-5, enquanto a IgG4 específica contra vermes adultos foi associada à suscetibilidade à infecção (DUNNE et al., 1992; FITZSIMMONS et al., 2012; COLLEY & SECOR, 2014).

Em 1997 Snyman et al. verificaram que os indivíduos infectados pelo *S. haematobium* tratados com vitamina D apresentaram uma aumento médio de 5.5% nos linfócitos circulantes e de 28% na vacuolização de eosinófilos. Quando a administração do calcitriol foi combinada com o tratamento com Praziquantel observou-se uma aumento médio de 213% nos níveis de IgE e 170% de elevação nos níveis médios para IgG.

Em camundongos infectados pelo *S. japonicum* tratados com calcipotriol (análogo da vitamina D) observou-se uma redução significativa na fibrose hepática e na área de granulomas hepáticos em comparação aos controles não tratados (HE et al., 2018).

Todos estes achados indicam à importância de se entender a complexa relação entre o metabolismo e as funções da vitamina D com a imunidade e resistência/susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni*.

2. JUSTIFICATIVA

A vitamina D vem sendo estudada em relação aos seus efeitos sobre patologias autoimunes, inflamatórias e infecciosas devido as suas funções de estímulo e modulação do sistema imunológico. Trabalhos vêm demonstrando resultados positivos e significativos no combate a uma variedade de doenças quando esta vitamina é utilizada como componente terapêutico principal ou como potencializadora da resposta imune quando conjugada a fármacos (BARRAT et al., 2002; DANIEL et al., 2008; HEWISON, 2010; KAY et al., 2015; CLARCK et al., 2016; BORA et al., 2018). Pesquisas direcionadas as parasitoses sugerem o uso da vitamina D como relevante na abordagem terapêutica (RAMOS-MARTÍNEZ et al., 2015).

A esquistossomose é uma das doenças tropicais negligenciadas e ainda acomete milhões de pessoas (240 milhões/ano) em 54 países em desenvolvimento. Para seu controle e eliminação são necessárias, além da abordagem clínica do paciente, medidas de educação em saúde e sanitárias, o que depende de políticas públicas e investimento do Estado, dificultando a resolução no enfrentamento da patologia. Somado a esses apontamentos, as limitações na eficácia do único medicamento disponível, bem como a ausência de vacina agregam as lacunas na abordagem da parasitose (MESSERLI et al., 2009; SAH et al., 2015; COHEN et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; ABOU-EL-NAGA et al., 2019).

Desse modo, a Vitamina D emerge como aliada no enfrentamento à enfermidade, devido as suas ações sobre o sistema imunitário, a potencialização da imunidade quando associada a alguns fármacos, ao seu baixo custo e fácil acessibilidade, efeitos adversos somente em altíssimas concentrações e raros casos de hiperssensibilidade (DEEB et al., 2007; HEWISON, 2010; MARQUES et al., 2010; CASTRO, 2011).

Portanto, como hipótese do trabalho propõe-se que a dieta suplementada em vitamina D isoladamente ou em associação com doses subcurativas de Praziquantel, seria capaz de auxiliar na redução dos efeitos deletérios da esquistossomose, associados ao número de ovos retidos no fígado e intestino, carga parasitária e área de granuloma hepático.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar os efeitos da dieta suplementada em Vitamina D na infecção experimental pelo *S. mansoni* e na eficácia do tratamento com doses subcurativas de Praziquantel.

Objetivos específicos

1. Estabelecer protocolo de suplementação de vitamina D capaz de promover alterações séricas de seu metabolito ativo;
2. Avaliar o impacto da suplementação de Vitamina D sobre o desenvolvimento e sobrevivência do *S. mansoni*;
3. Avaliar o impacto da suplementação de Vitamina D sobre níveis séricos de citocinas e anticorpos induzidos pela infecção experimental com *S. mansoni*;
4. Avaliar o impacto da dieta suplementada em Vitamina D na patologia hepática induzida pela infecção pelo *S. mansoni*;
5. Avaliar o impacto da dieta suplementada em Vitamina D na eficácia do tratamento com doses subcurativas de Praziquantel.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os animais selecionados para esse estudo foram camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, Specific Pathogen Free (SPF), com idades entre 4 a 6 semanas, provenientes do biotério de produção (BIOT) do Instituto René Rachou (IRR). Durante o período experimental, esses animais foram mantidos no biotério de experimentação (BIOTEX) do IRR com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos de experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Fiocruz, sob a licença nº LW18/18 em anexo.

4.2 Ração Especializada

Na fase 2 do procedimento experimental foi introduzida dieta especializada, Ração AIN93M, pellet, em diferentes concentrações de vitamina D - controle 1000UI/Kg e suplementada 10000UI/kg - advindas da Prag Soluções.

Tabela 1. Composição da ração AIN93M das dietas controle e suplementada

Nutrientes	Dietas	
	Padrão AIN-93M	Suplementada AIN-93M
Caseína	140	140
Amido de Milho	465,7	465,7
Sacarose	100	100
Maltodextrina	155	155
Óleo de soja	40	40
Celulose	50	50
Mistura de minerais ¹	35	35
Mistura de vitaminas ²	10	10
Cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Vitamina D ₃	1000UI	10000UI
Valor calórico total (Kcal)	3850	3850
Carboidratos (% de calorias)	76	76
Proteínas (% de calorias)	14	14
Lipídios (% de calorias)	10	10

¹Mistura de minerais de acordo com as recomendações da dieta AIN-93M.

²Mistura de vitaminas de acordo com as recomendações da dieta AIN-93M.

Fatores de conversão: carboidratos 4 kcal/g, proteínas 4 kcal/g, lipídios 9 kcal/g

4.3 Cepas LE de *Schistosoma mansoni*

A cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) do *Schistosoma mansoni* utilizada na infecção dos animais foi fornecida pelo Moluscário do Instituto René Rachou, onde o ciclo do parasito é mantido por passagem no caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e Hamster. As cercárias foram obtidas através da exposição dos caramujos infectados à luz artificial por 1 a 2 horas.

4.4 Protocolo Experimental

O experimento consistiu na utilização de modelo animal devido à ausência de métodos alternativos para responder à pergunta desse projeto, já que envolve a interação entre funções de diferentes sistemas do organismo. Na pesquisa avaliou-se o efeito da dieta suplementada de vitamina D sobre o desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*, seu efeito sobre o sistema imunológico, bem como sobre eficácia do tratamento com doses subcurativas de Praziquantel. Foram coletadas amostras de fezes destes animais em pontos diferentes do protocolo experimental para futuras análises de microbiota. O material coletado foi congelado para futura análise de metagenômica. Foi realizada uma padronização do protocolo de suplementação por dieta (Etapa 1) e após padronização foi realizado o protocolo experimental (Etapa 2) seguindo a estratégia experimental descrita na Figura 10. Foi realizado um ensaio independente com 12 animais em cada grupo experimental, exceto no grupo controle do tratamento que era formado por 6 animais.

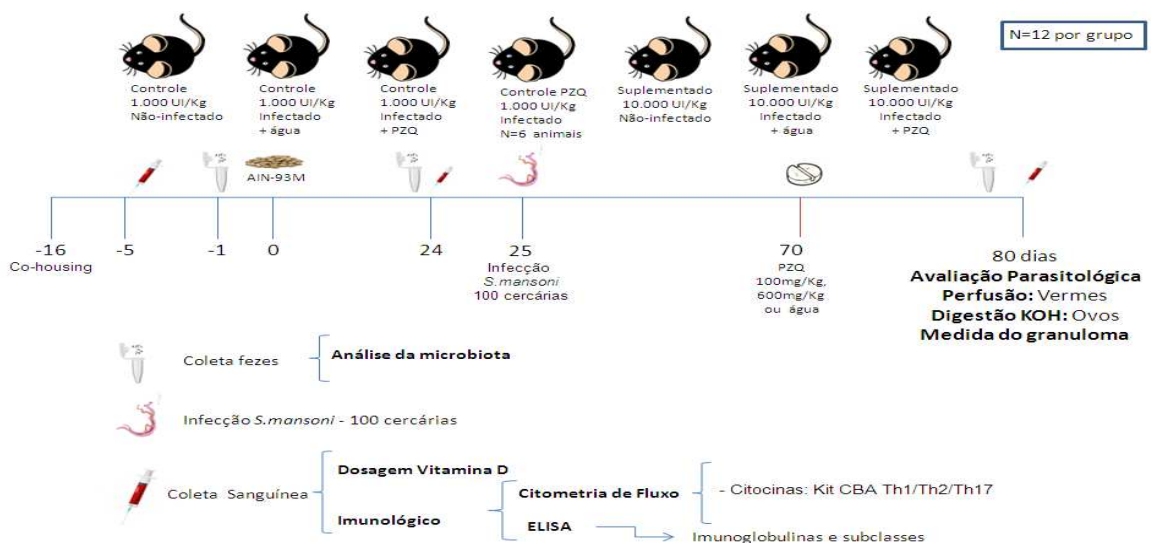


Figura 9. Desenho experimental

Para estabelecimento de um padrão de microbiota, entre os dias -16 a -1 dias (fase 1) a cada 4 dias os animais de cada gaiola eram colocados juntos com animais provenientes de outras gaiolas de forma que ao final dos 15 dias todos os animais tivessem convivido entre si por no mínimo 4 dias. Ao final desse período, os animais foram distribuídos randomicamente para um dos sete grupos experimentais. O fornecimento da dieta (fase 2) ocorreu por meio da Ração AIN93M, pellet, com dosagem de vitamina D manipulada (1000UI/Kg ou 10000UI/Kg). Em todos os grupos de experimentação os animais iniciaram a dieta no tempo zero. Quando os níveis de vitamina D do grupo suplementado (10000UI/Kg) atingiram elevação significativa dos valores séricos de vitamina D em relação ao grupo controle (1000UI/Kg), os animais foram infectados por via percutânea com 100 cercárias do *Schistosoma mansoni*. As coletas de sangue nos dias -5, 24 e 79 foram realizadas para avaliar o impacto da dieta sobre fatores solúveis como: citocinas, anticorpos e vitamina D sérica. A administração do praziquantel ocorreu por gavagem, quarenta e cinco dias após a infecção, com subdoses do medicamento na concentração de 100mg/Kg/dose. Como controle positivo do tratamento, um grupo de 6 animais foi tratado com a dose curativa do Praziquantel 600mg/Kg/dose. Para realização futura de análise da microbiota coletou-se, individualmente, as fezes frescas dos animais nos tempos -1, 24, 79 dias de experimentação. Aos 55 dias após a infecção (dia 80 do protocolo experimental), esses animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e perfundidos para determinação do impacto da dieta sobre o desenvolvimento do parasito e eficácia do fármaco utilizado no tratamento da doença.

4.5 Monitoramento animal

Durante todo o procedimento experimental, os animais do estudo foram acompanhados/monitorados duas vezes por semana para verificação das condições gerais e detecção de sinais de dor e/ou sofrimento, e uma vez por semana para determinação de peso corpóreo. Os sinais clínicos avaliados consistiram em 11 itens: perda de pelo, alteração na motilidade, perda de peso (%), postura de guarda, contração nasal, contração da bochecha, rotação da orelha, piloereção, automutilação, alteração nos olhos e redução significativa no consumo de alimento. Essas observações foram compiladas em uma planilha, sendo que cada item recebeu uma pontuação que resultou em score final para cada animal, permitindo a identificação de gravidade das alterações de sanidade animal e identificação da necessidade de uso de analgésico ou eutanásia, evitando assim sofrimento do animal. Para cada item

avaliado durante monitoramento animal foi atribuída uma pontuação de 0 a 2 (0 – ausente, 1 – moderado, 2 – grave). As pontuações obtidas foram somadas e o resultado final enquadrado em uma das faixas a seguir, sendo a pontuação máxima 22:

0 - ausente

1 a 9 - leve

10 a 18 - moderado

19 a 22 - grave

Os animais que apresentaram pontuação entre 10 a 22 foram tratados com o analgésico Carprofeno (5mg/Kg), a cada 24 horas até a cessão dos sinais. O ponto final humanitário para esses murinos foi a perda de peso superior a 20%. Os dados foram registrados cronologicamente durante todo o experimento, de modo direto, por meio de planilha de monitoramento (anexa) e anotação de dados personalizados para esses protocolos.

4.6 Infecção percutânea

Os animais foram infectados com cercárias do *S. mansoni* quando os níveis séricos de vitamina D do grupo suplementado estavam significativamente superiores ao grupo controle. Para a realização da infecção, um dia antes do procedimento, os camundongos foram depilados na região abdominal para exposição de uma área da pele para infecção. Após a remoção dos pêlos os camundongos foram mantidos em gaiolas sem maravalha. No momento da infecção, os animais foram anestesiados com Xilazina (na dosagem de 5mg/kg) e Ketamina (100mg/Kg), via intraperitoneal, sendo posteriormente, imobilizados com o abdômen voltado para cima sobre uma mesa através da fixação de suas patas à mesa por tiras de esparadrapo. Sobre o abdômen de cada camundongo foi presa uma placa de acrílico retangular, perfurada no centro, onde foram depositados 200µl de uma solução contendo aproximadamente 100 cercárias da cepa LE (Belo Horizonte, Brasil) do *S. mansoni*. Após o período de 1 hora, o esparadrapo e a placa de acrílico foram retirados e os camundongos realocados em suas gaiolas. Somente no dia seguinte retornaram as gaiolas contendo maravalha. Todo o procedimento foi realizado dentro da cabine de fluxo laminar para manter os animais em condições SPF.

4.7 Coletas Sanguíneas

As amostras sanguíneas foram coletadas, em cabine de fluxo laminar, pela via submandibular, em quantidade de 200µl, com o auxílio de uma lanceta 4mm, nos tempos -5, 9, 24 e 79 dias de procedimento experimental. Esse material foi centrifugado a 3220 xg por 7 minutos para obtenção do soro que foi armazenado a -70°C.

4.8 Dosagem de Vitamina D

Para a dosagem de Vitamina D foi utilizado o método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), kit DRG-25-OH Vitamina D 96 Ts ELISA (DRG, USA), seguindo o manual de procedimentos do fabricante. Resumidamente, em uma placa sensibilizada com um anticorpo monoclonal anti-25 (OH) D dispensamos 25µl dos padrões com concentrações pré-determinadas de Vitamina D, dos soros e dos controles, adicionamos 50 µl de reagente desnaturante e em seguida os incubamos a 37°C por 30 minutos. Após esse intervalo foram pipetados nas amostras 100 µl da solução neutralizante e posteriormente 200µl da solução conjugada de trabalho encontrada no kit, mantendo essa mistura a 37°C por 60 min., seguindo com a lavagem das placas por 4 vezes com solução própria. Após a lavagem adicionou-se solução de revelação, incubada por 15 min., e posteriormente acrescentou-se a solução de parada. Procedeu-se a leitura da placa a 450nm. A determinação das concentrações séricas do metabólito 25(OH)D, que representa sua forma circulante de maior quantidade com meia-vida de duas semanas foi realizado pelo Ajuste de Curvas de 4 Parâmetros Logístico, realizados no software GraphPad Prisma 8.0 (San Diego, Ca, USA).

4.9 Determinação dos níveis de anticorpos específicos para antígenos do *S. mansoni*

A resposta humoral específica para antígenos do parasito foi determinada por ELISA utilizando-se os anticorpos anti-IgG, anti-IgG1, anti IgG2c de camundongo conjugado a HRP. Para a realização do ELISA, placas de microensaio de 96 poços (Maxsorp-Nunc) foram sensibilizadas com 5µg/mL de SWAP, em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6 por 12 a 16 horas à 4°C. Após a etapa de adsorção do antígeno à placa e posterior etapa de lavagem (4X) com PBST20 (phosphate-buffered saline e Tween 20), as placas foram bloqueadas por 2 horas à 37°C com 300µL por poço de PBST20 acrescentado com 10% de soro fetal bovino. Após

nova etapa de lavagem, foram adicionadas às placas 100 microlitros de cada amostra de soro em duplicata na diluição 1:400 para análise de IgG e IgG1 e 1:200 para IgG2c em PBST20. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Depois de novamente lavadas para retirar os anticorpos não ligados ao antígeno, a interação antígeno-anticorpo foi detectada por anticorpos (100µl/poço) anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2c de camundongos conjugados à peroxidase, diluídos 1:10.000 em PBST20. A incubação da placa com os anticorpos de detecção foi realizada à temperatura ambiente por 1 hora. Após mais uma etapa de lavagem foi realizada a revelação pela adição de 100µL/ poço do substrato tetrametilbenzidina-TMB. A revelação foi interrompida pela adição de 50µL/ poço de ácido sulfúrico a 5%. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplacas (ThermoFisher Scientific, USA).

4.10 Avaliação do perfil de citocinas

O perfil de citocinas circulantes foi determinado pela quantificação de citocinas séricas utilizando o Kit CBA Th1/Th2/Th17 mouse (BD Pharmigem, USA) que quantifica as seguintes citocinas: Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), Interferon- γ (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-17A (IL-17A) e Interleucina-10 (IL-10). Foi utilizado o protocolo do fabricante com algumas alterações. Resumidamente, alíquotas de 25µL de cada amostra, dos padrões de citocinas (diluição seriada de 5000pg/mL a 20pg/mL) e do controle negativo do kit foram incubadas com 20µL da mistura das sete microesferas de captura (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α) e 17µL do reagente de detecção conjugado a PE, em placas de cultura celular de 96 poços, fundo em “U”, por 3 horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a incubação, as microesferas foram lavadas com 160µL tampão de lavagem e centrifugadas a 1055 x g a 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 200µL de tampão de lavagem foram adicionados para ressuspensão das esferas e posterior aquisição das amostras no FACSVerse. Foi utilizado o software FACSSuite e o Calibrate Beads da BD com o objetivo de ajustar o equipamento. Para cada amostra processada foram adquiridos 2100 eventos dentro de região pré-estabelecida (300 eventos por parâmetro testado). O cálculo dos níveis de citocinas foi realizado com a utilização do software FCAP Array (BD Pharmingen, USA). O limite de detecção de cada citocina é de: IL-2 (0,1 pg/mL), IL-4 (0,03 pg/mL), IL-6 (1,4 pg/mL), IL-10 (16,8pg/mL), IL-17 (0,8 pg/mL), IFN- γ (0,5 pg/mL) e TNF- α (0,9pg/mL).

4.11 Coletas das Fezes

Com o objetivo de avaliar a interação entre microbiota, vitamina D e esquistossomose foram coletadas fezes de cada animal individualmente nos tempos -1, 24, 79 dias do experimento, em ambiente estéril. Após a coleta, essas amostras foram congeladas a -20° para posterior análise da microbiota.

4.12 Tratamento com doses subcurativas de Praziquantel

Aos 45 dias após a infecção foi administrada uma dose subcurativa do fármaco de escolha para tratamento da esquistossomose, o Praziquantel (PZQ), na dosagem de 100 mg/Kg aos animais desses grupos e 600mg/Kg aos murinos do grupo controle da medicação. O fármaco foi administrado por via enteral, gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago por meio de uma agulha especial para gavagem, permitindo a injeção do líquido diretamente no estômago dos animais. Os comprimidos de PZQ foram pesados, macerados e diluídos em água, levando-se em conta o cálculo do fator de correção (considerando-se apenas o princípio ativo, excluindo-se o excipiente), respeitando o volume de 2 ml para cada 100g de peso corporal.

4.13 Perfusão dos animais

Com objetivo de verificar a carga parasitária, aos cinquenta e cinco dias após a infecção, foi realizada a perfusão do sistema porta-hepático com solução salina 0,85% e 50 U/L heparina. Após a eutanásia por descolamento cervical, o procedimento foi realizado com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), sendo a solução salina 0,85% heparinizada injetada na aorta descendente, permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas, recuperando-se os vermes presentes, segundo a técnica descrita por Pellegrino e Siqueira (1956). Os vermes recuperados foram contados com auxílio de uma lupa, separando-os em machos e fêmeas. Depois da perfusão, fígado e intestino dos animais foram retirados para posterior digestão utilizando KOH 10%, a fim de avaliar o número de ovos contido nesses órgãos. Além disso, uma parte do fígado de cada animal foi armazenada em formalina 4% para posterior avaliação histopatológica.

4.14 Contagem do número de ovos e avaliação histopatológica

Durante o procedimento de perfusão foram retirados o fígado e o intestino de cada camundongo, com o intuito de determinar o número de ovos presos no fígado e intestino e granulomas hepáticos. Os órgãos foram pesados e acondicionados em tubos cônicos contendo solução de KOH 10% por 16 horas, a 4°C. No dia seguinte, foram incubados à 37°C durante trinta minutos em banho-maria. Após a digestão dos órgãos, o produto digerido foi centrifugado por cinco minutos a 900 xg, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em salina 0,85%. Esta etapa foi repetida por três vezes. Após a última centrifugação o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de salina 0,85% e o número de ovos foi contado com o auxílio de um microscópio de luz. Foram realizadas três contagens de 10 µL da solução de cada órgão a fim de se determinar o número de ovos por grama de órgão. Uma porção do fígado, retirada na perfusão foi fixada com formalina 4%, desidratada em concentrações crescentes de etanol, clarificados com xilol, impregnados em parafina e seccionados por micrótomo em cortes de 5mm, os quais foram corados com Hematoxilina e Eosina. Para determinação da área dos granulomas hepáticos foram selecionados granulomas com a presença de um único ovo, no estágio exudativo-produtivo, 100 por grupo, sendo aproximadamente 10 por animal. A área desses granulomas foi determinada por morfometria utilizando o software de análise de imagens AxionVision 3.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). A área total de cada granuloma foi expressa em micrômetros quadrados (μm^2).

4.15 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, Ca, USA). Os testes empregados foram selecionados conforme a distribuição dos dados analisados pelo teste de Shapiro-Wilke. A partir desses resultados verificamos a equivalência de variância aplicando o teste de Brown-Forsythe para dados não-paramétricos e o teste de Bartlett para distribuição normal. Diante dessas análises, para dados paramétricos que apresentaram equivalência de variância e que continham mais de duas variáveis foram realizados ANOVA, One-way ou Two-way, seguido por comparações múltiplas de Sidak ou Dunnett; na presença de duas variáveis foi utilizado o teste T de student. Na ausência de equivalência de variância os testes T Student (paramétricos) e Mann-Whitney (não-paramétrico) foram utilizados, sendo o valor de p ajustado de acordo com o número de

comparações realizadas.

5. RESULTADOS

5.1 Padronização do protocolo experimental - Etapa 1

A padronização da dieta de suplementação de vitamina D foi necessária para verificar se a dieta de escolha seria capaz de induzir alterações séricas de vitamina D, bem como para estabelecer o momento em que os animais seriam infectados. Para tanto, acompanhamos o peso, consumo de ração, comportamento animal e dosagens séricas dessa vitamina em um total de 16 animais - 8 dieta controle e 8 dieta suplementada - distribuídos randomicamente para cada grupo.

A análise do comportamento animal com as alterações observadas nos grupos encontra-se resumida na **Tabela 2**. Cinco camundongos exibiram perda de peso (1 do grupo controle e 4 do grupo dieta suplementada) apenas na primeira semana do protocolo. Nenhuma variação significativa de peso foi observada a partir da segunda semana até o final do experimento. Em ambos os grupos controle e suplementado houve uma redução no consumo de ração na primeira semana de dieta modificada. O score máximo atingido durante esse período foi 1 ponto para cada animal em um máximo de 22 (**Tabela 2**).

Tabela 2. Monitoramento comportamental dos animais no período de padronização.

	Grupos	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana	Score Mediana (IC 95%)
Perda de pelo	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Alteração na motilidade	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Perda de peso	Controle	S ₁	N	N	N	0,5
	Suplementado	S ₄	N	N	N	0,5
Postura de guarda	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Contração nasal	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Contração da Bochecha	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Rotação da orelha	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Piloereção	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Automutilação	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Alteração nos olhos	Controle	N	N	N	N	0
	Suplementado	N	N	N	N	0
Redução significativa no consumo de alimento	Controle	S ₈	N	N	N	1
	Suplementado	S ₈	N	N	N	1

N – ausência de sintoma ou sinais

S- presença de sintomas ou sinais

Números subscritos se referem à quantidade de animais que apresentaram o sinal ou sintoma.

Os camundongos foram pesados uma vez por semana e avaliados quanto ao ganho ou perda de peso (variação do peso). Os dois grupos (controle e suplementado) apresentaram até a segunda semana variação de peso divergente. Inicialmente, enquanto os animais do grupo controle apresentaram ganho de peso em relação ao tempo 0 (T0), nos animais do grupo suplementado notamos uma manutenção do peso corpóreo. Na semana subsequente essas relações se alteraram, os animais suplementados apresentaram ganho de peso em relação a T0 e os animais do grupo controle não apresentaram alteração ponderal quando comparados à semana anterior. Após esse período observamos que a curva para esses animais se mostrou semelhante até o final do experimento. Na análise geral, apesar das oscilações, os camundongos apresentaram ganho de peso ao final do protocolo quando comparado com o peso inicial. Na semana 4 foram observadas diferenças significativas de peso em relação ao peso do T0 (Figura 11).

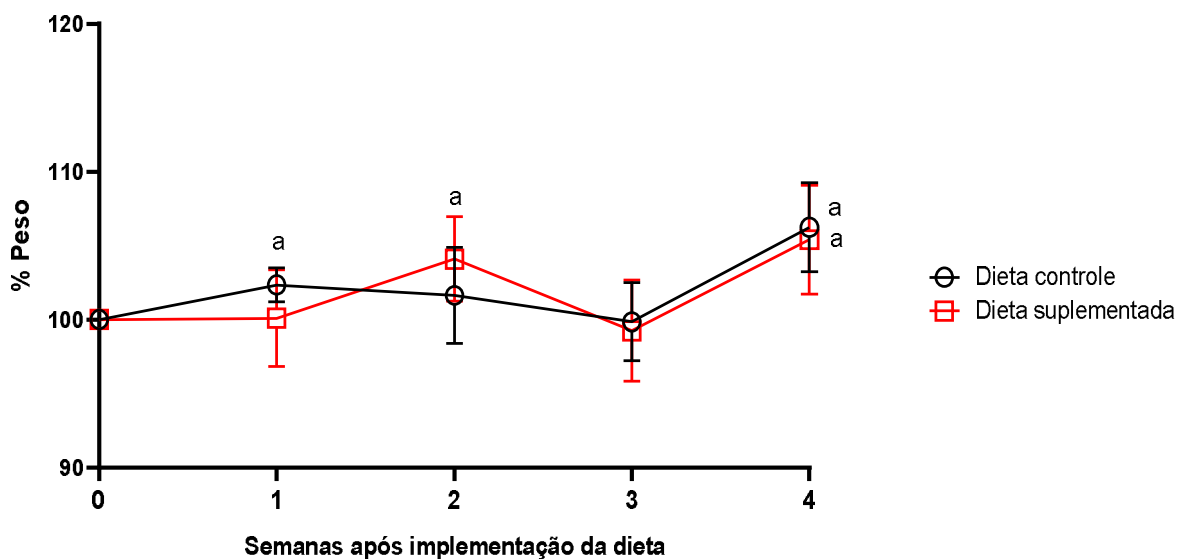


Figura 10. Variação do peso dos animais submetidos à dieta controle e suplementada. O eixo y representa a média do percentual de variação de peso do grupo controle (preto) e suplementado (vermelho) ao longo das 4 semanas do protocolo experimental. A letra a refere-se às diferenças estatísticas em relação ao tempo 0: grupo controle: $p=0,0097$ (primeira semana) e $p=0,0021$ (quarta semana); grupo suplementado: $p=0,0237$ (segunda semana) e $p=0,0143$ (quarta semana). Os dados estão apresentados como médias \pm desvio padrão para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Conforme demonstrado na figura 12, o consumo de ração entre os dois grupos (controle e suplementado) foi similar ao longo de todo o protocolo experimental. Contudo, ao avaliarmos essa variável por grupo (controle ou suplementado), após o período de adaptação na primeira semana notamos um aumento estatisticamente significativo nessa ingestão alimentar na segunda semana para ambas as dietas (controle e suplementada). Esse fato

observado não se manteve até o final das quatro semanas nos animais, sendo uma redução significativa no consumo, verificada nos grupos submetidos a ambas as dietas nas terceira e quarta semana quando comparadas a segunda.

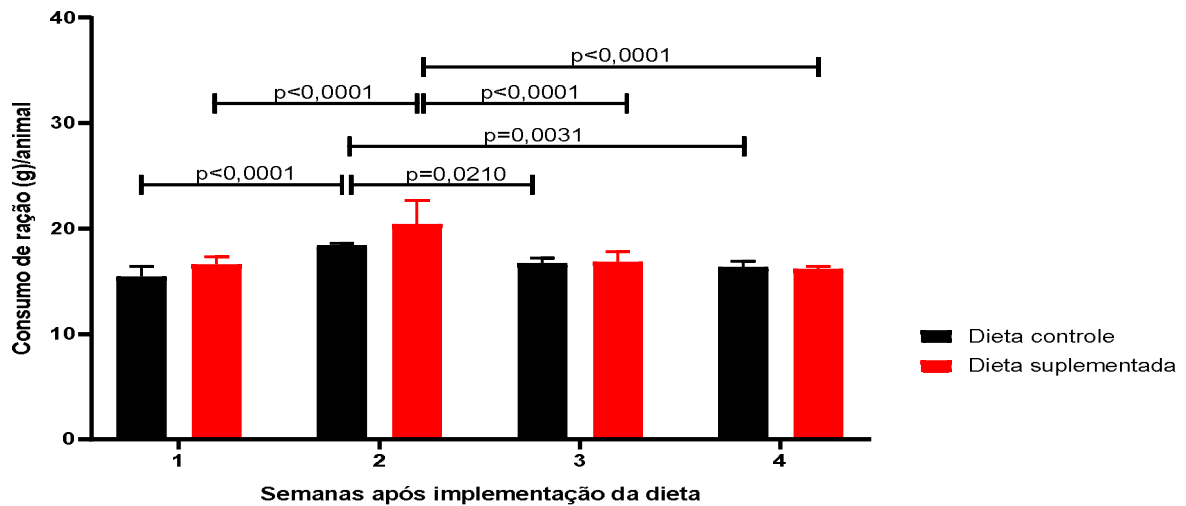


Figura 11. Consumo de ração dos grupos controle e suplementado durante a padronização. O consumo foi calculado subtraindo-se a quantidade de sobra da semana subsequente da quantidade ofertada na semana anterior para cada gaiola, posteriormente dividindo esse valor final pelo número de animais em cada microisolador. As barras representam o consumo médio de ração +/- desvio padrão no grupo controle (preto) e no grupo suplementado (vermelho) ao longo das 4 semanas do protocolo de padronização. A análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Sidak, com $p < 0,05$. As diferenças significativas encontram-se apontadas no gráfico.

As dosagens séricas de vitamina D (25OH) foram realizadas nos tempos 0, 9 e 24 dias após a implementação da dieta. No tempo 0, não observamos diferenças significativas entre os grupos, o que era esperado pois a coleta de soro coincide com a introdução da dieta controle ou da dieta suplementada. Dez dias após a introdução da dieta suplementada, ainda não foram notadas diferenças significativas nos níveis séricos de vitamina D entre os animais do grupo controle e suplementado. Após 25 dias de introdução da dieta suplementada observamos diferenças significativas nos níveis séricos de vitamina D entre esses grupos (controle e suplementado) (Figura 13). Verificamos também diferença significativa nas dosagens de vitamina D ao longo do tempo para o grupo suplementado entre os tempos 0 e 24 (Figura 13). O experimento durou 25 dias, momento em que foram detectadas alterações significativas nos níveis séricos de Vitamina D entre o grupo controle e o suplementado e dessa forma estabelecemos a dieta com 10.000UI/kg de vitamina D como dieta padrão para suplementação e também estabelecemos o dia 25 após consumo de dieta suplementada como momento de infecção pelo *S. mansoni*.

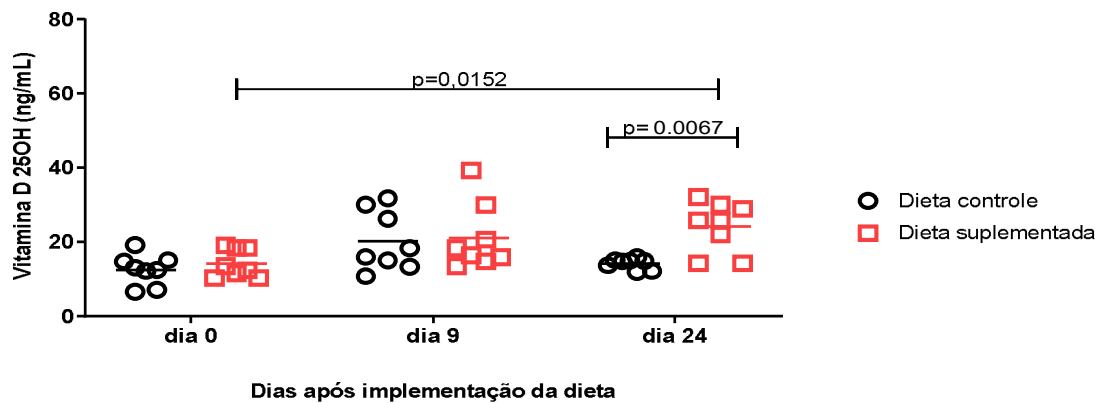


Figura 12. Concentração sérica de vitamina D nos grupos submetidos à dieta controle e suplementada. As dosagens séricas de vitamina D foram realizadas a partir dos soros, obtidos de amostras de sangue coletadas dos animais do grupo controle (8) e suplementados (8), pelo método de ELISA, Kit DRG Vitamina D 25OH nos dias 0, 9 e 24 após introdução da dieta. O eixo y representa os valores em ng/mL de vitamina D sérica. A média de concentração de vitamina D para cada grupo está representada pela linha no gráfico. Diferenças estatísticas utilizando Two-way ANOVA, seguida do pós-teste de Sidak estão apontadas no gráfico, $p < 0,05$.

5.2 Avaliação do efeito da suplementação com vitamina D sobre a infecção pelo *S. mansoni* e sobre o tratamento com Praziquantel – Etapa 2

Com o intuito de verificar o impacto da suplementação com vit.D sobre a infecção pelo *S. mansoni* e sobre o tratamento com doses subcurativas de praziquantel, avaliamos os animais quanto ao comportamento dos animais, variação de peso, o consumo de ração, a carga parasitária, a medida de área do granuloma hepático, perfil de citocinas sérica e anticorpos produzidos em resposta a infecção.

O resumo das alterações observadas no comportamento dos camundongos encontra-se descrito na **Tabela 3**. Trinta e um animais apresentaram perda de peso e foram pontuados quanto essa variável, sendo 14 deles dos grupos controles (NI (6), IF+H₂O (5) e IF+PZQ (3)) e 17 dos grupos suplementados (NI (2), IF+H₂O (10) e IF+PZQ (5)). Essa variação foi observada apenas na primeira semana após implementação da dieta. Dois animais (1 controle IF+H₂O e 1 suplementado IF+H₂O) apresentaram alterações nos olhos nas duas últimas semanas de experimento. Além disso, nove animais do grupo controle não infectado (NI) apresentaram perda de pelo nas três últimas semanas do protocolo experimental (semana 10 a 12) (**Tabela 3**). Na quinta semana, quarenta e oito animais infectados (24 controles e 24 suplementados) apresentaram redução significativa no consumo de ração. O mesmo ocorreu na 11ª semana, após o tratamento quando 12 animais do grupo controle infectado tratado reduziram a ingestão alimentar. O score máximo atingido por alguns animais durante o período experimental foi 1 ponto em um máximo de 22 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Monitoramento Animal de todos os Grupos experimentais.

Variáveis	Grupos	Semana										Score Médiana (IC)					
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª		11ª	12ª			
Perda de pelo	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S ₉	S ₉	1	
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Alteração na motilidade	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Perda de peso	Controle	Não Infectado	S ₄	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
		Infectado	S ₅	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
	Suplementado	Não Infectado	S ₃	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
		Infectado	S ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
Postura de guarda	Controle	Não Infectado	S ₉	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
		Infectado	S ₅	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
	Suplementado	Não Infectado	S ₃	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
		Infectado	S ₂	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
Contração nasal	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Contração da Bochecha	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0

N – ausência de sintomas ou sinais

S – presença de sintomas ou sinais

Número sobrescrito se referem à quantidade de animais que apresentaram o sinal ou sintomas.

Tabela 3, continuação. Monitoramento Animal de todos os grupos experimentais.

Variáveis	Grupos	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana	5ª Semana	6ª Semana	7ª Semana	8ª Semana	9ª Semana	10ª Semana	11ª Semana	12ª Semana	Score Mediana (IC)	
Contração da Bochecha	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Rotação da orelha	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Piloereção	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Automutilação	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Alteração nos olhos	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0,5
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0
Redução significativa no consumo de alimento	Controle	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0	
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
	Suplementado	Não Infectado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1
		Infectado	Não Tratado	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0

N - ausência de sintoma ou sinais

S - presença de sintomas ou sinais

Números subscritos se referem à quantidade de animais que apresentaram o sinal ou sintoma.

O acompanhamento do peso dos animais evidenciou diferenças na variação de peso. Após a implementação da dieta notamos um ganho ponderal em ambos os grupos até a quarta semana, sendo esse significativo em relação ao tempo inicial nos animais do grupo controle a partir da terceira semana e nos animais do grupo suplementado a partir da segunda. Observamos após a infecção com cercárias do *S.mansoni* uma manutenção do peso em todos os grupos experimentais até a quinta semana. Os animais não infectados continuaram ascendendo na curva de variação de peso, o que não foi notado nos animais infectados submetidos a ambas as dietas. Após a sexta semana, todos os grupos permaneceram em curva crescente até o momento do tratamento por volta da décima primeira semana. Apesar das oscilações observadas ao longo do protocolo experimental, não observamos diferenças significativas de variação do peso entre os grupos (Figura 14). Em todos os grupos houve um ganho significativo de peso ao longo do tempo quando comparados ao peso inicial (Figura 14 - letras a (controle) e b (suplementado)).

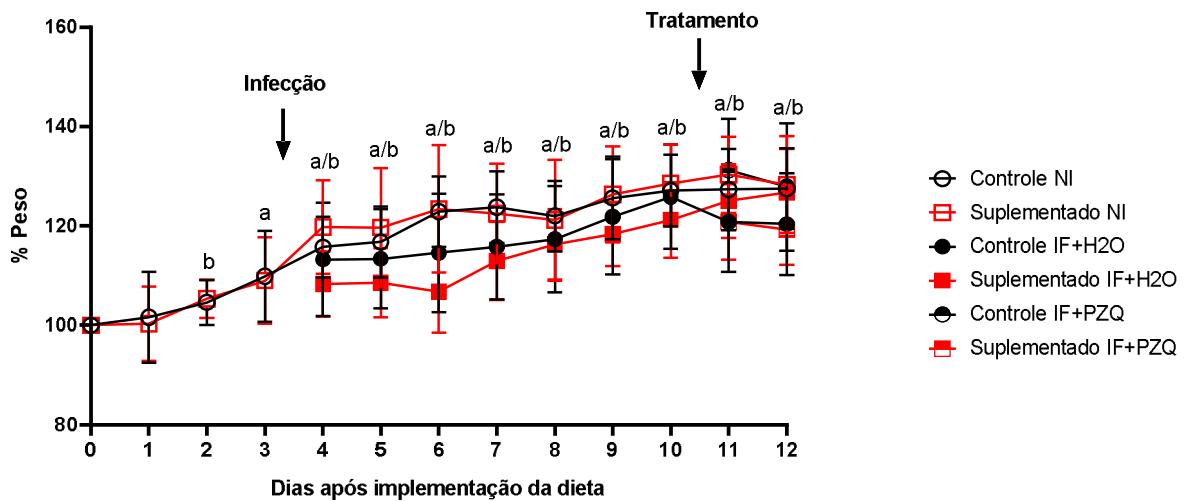


Figura 13. Variação de peso dos animais durante protocolo experimental. O eixo y representa a média do percentual de variação de peso dos grupos não-infectado, infectado não tratado e infectado tratado com PZQ a 100mg/Kg, de ambas as dietas (controle e suplementada) ao longo das 12 semanas do protocolo experimental. As letras a (controle) e b (suplementado) refere-se às diferenças estatísticas em relação ao tempo 0: grupo controle: da terceira até a 12 semana os valores de p foram respectivamente $p=0,0009$, $p<0,0001$, $p=0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$; grupo suplementado: segunda semana, exceto 3ª, até a 12ª semana os valores de p foram respectivamente: $p=0,0099$, $p=0,0506$, $p=0,0003$, $p=0,0021$, $p=0,0009$, $p=0,0002$, $p=0,0014$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p<0,0001$. Os dados estão apresentados como médias +/- desvio padrão para cada grupo. A análise estatística foi realizada utilizando Two-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

Na Figura 15 podemos observar que o consumo de ração apresentou algumas oscilações durante todo o período avaliado. Essas diferenças notadas na ingestão de ração

quando significativas encontram-se representadas no gráfico pelas letras a. Nas primeiras semanas de adaptação houve aumento significativo na ingestão alimentar no grupo submetidos a suplementada em relação aos animais submetidos à dieta controle. Ao final da 3ª semana, uma parte dos animais foi submetida à infecção. Na 7ª semana do experimento, observou-se um maior consumo de ração pelo grupo submetido à dieta suplementada e infectado. Na 9ª semana observou-se uma maior ingestão de ração nos grupos de animais infectados em relação aos não infectados em ambas as dietas. Na 10ª semana este perfil se manteve apenas nos animais alimentados com dieta controle. Ao final da 10ª semana uma parte dos animais foi submetida ao tratamento e observamos no gráfico que os animais tratados alimentados com a dieta controle apresentaram aumento significativo na ingestão alimentar quando comparados com os animais alimentados com dieta controle não infectados e infectados. De uma maneira geral nas semanas 11 e 12 um aumento de consumo de ração foi observado nos animais alimentados com a dieta suplementada. Essas diferenças entre os grupos não seguiu um padrão entre animais infectados e não infectados, tratados e não tratados, no entanto em muitos dos momentos avaliados os animais alimentados com a dieta suplementada consumiram mais ração do que os animais do grupo controle.

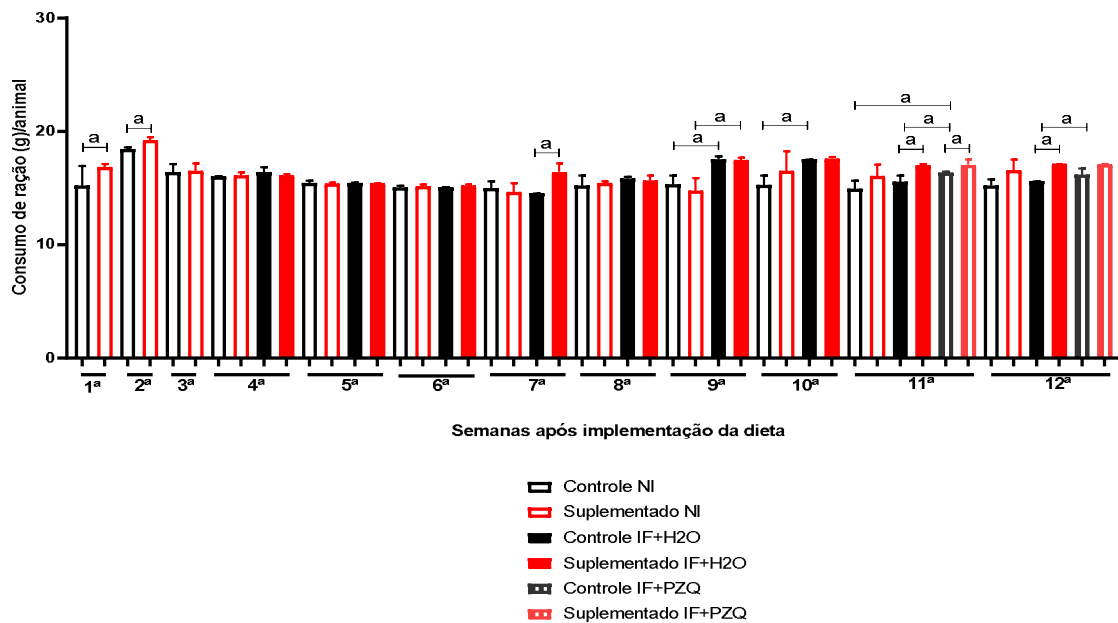


Figura 14. Consumo de ração dos grupos controle e suplementado durante o experimento. O consumo foi calculado subtraindo-se a quantidade de sobra da semana subsequente da quantidade ofertada na semana anterior para cada gaiola, posteriormente dividindo esse valor final pelo número de animais em cada microisolador. A estatística utilizada foi o Teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 99%. As barras representam as medianas +/- erro padrão. As letras a representam as diferenças significativas entre os grupos: 1ª semana CNI x SNI: $p=0,0002$; 2ª semana CNI x SNI: $p<0,0001$; 7ª semana CIF+H2O x SIF+H2O: $p=0,0028$; 9ª semana CNI x CIF+H2O: $p<0,0001$ e SNI x SIF+H2O: $p=0,0001$; 10ª semana CNI x CIF+H2O: $p=0,0001$; 11ª semana CIF+H2O x SIF+H2O: $p<0,0001$, CIF+PZQ x SIF+PZQ: $p<0,0001$, CNI x CIF+H2O: $p<0,0001$ e CIF+H2O x CIF+PZQ: $p<0,0001$; 12ª semana CIF+H2O x SIF+H2O: $p<0,0001$, CIF+H2O x CIF+PZQ: $p<0,0001$.

A dieta foi implementada no tempo 0 e as dosagens séricas de vitamina D (25OH) foram realizadas nos tempos 0, 25 e 80 dias. Assim como verificado na padronização, no tempo 0 não observamos diferenças significativas entre os grupos, pois a coleta de soro coincide com a introdução ou não da dieta suplementada. Como esperado, notamos essas alterações significativas nas concentrações séricas de vit.D no grupo suplementado comparada ao grupo controle vinte e cinco dias após a introdução da dieta. Essa diferença significativa nos níveis de vitamina D continuou sendo observada aos 80 dias após introdução da dieta, independente dos animais terem ou não recebido tratamento com o praziquantel. (Figura 16).

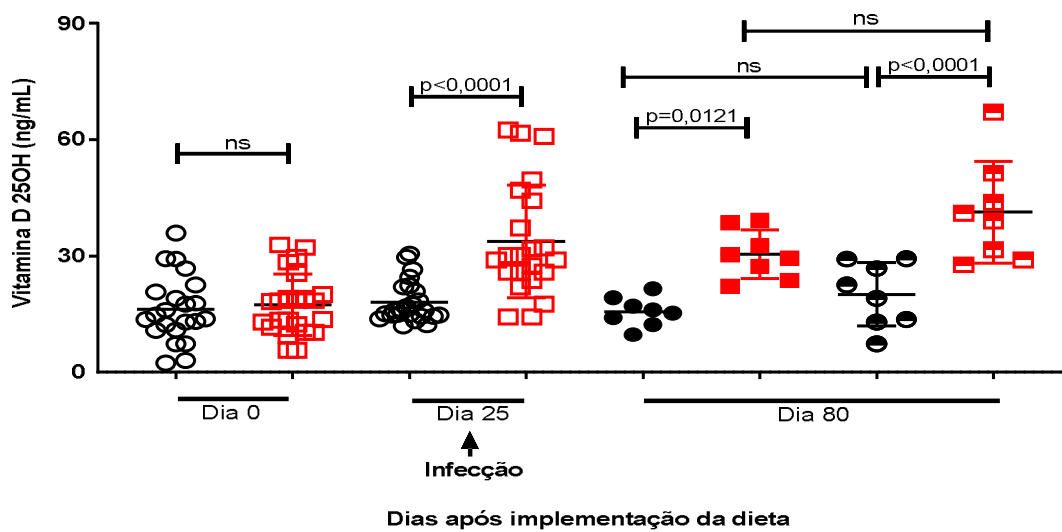


Figura 15. Concentração sérica de vitamina D nos animais controle e suplementado infectados não tratados e tratados. As dosagens séricas de vitamina foram realizadas nos soros obtidos de amostras de sangue coletadas dos animais dos grupos dieta controle (circulo) e suplementada (quadrado), antes da infecção (símbolo aberto) infectado (fechado) e infectado e tratado com 100mg/Kg de PZQ (semi-aberto), pelo método de ELISA, Kit DRG Vitamina D 25OH nos dias 0, 24 e 80 após introdução da dieta. O eixo y representa os valores em ng/mL de vitamina D sérica. A média de concentração de vitamina D para cada grupo está representada pela linha no gráfico. Diferenças estatísticas utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-Teste Sidak encontram-se apontadas no gráfico.

Em relação ao número de vermes recuperado na perfusão do sistema porta hepático observamos uma redução significativa na quantidade vermes total (figura 17A), vermes machos (Figura 17B) e vermes fêmeas (Figura 17C) nos grupos tratados quando comparados aos grupos não tratados para ambas as dietas controle e suplementada. O tipo de dieta oferecido aos animais não impactou na sobrevivência dos vermes, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entres os grupos controle infectado e suplementado infectado (Figura 17).

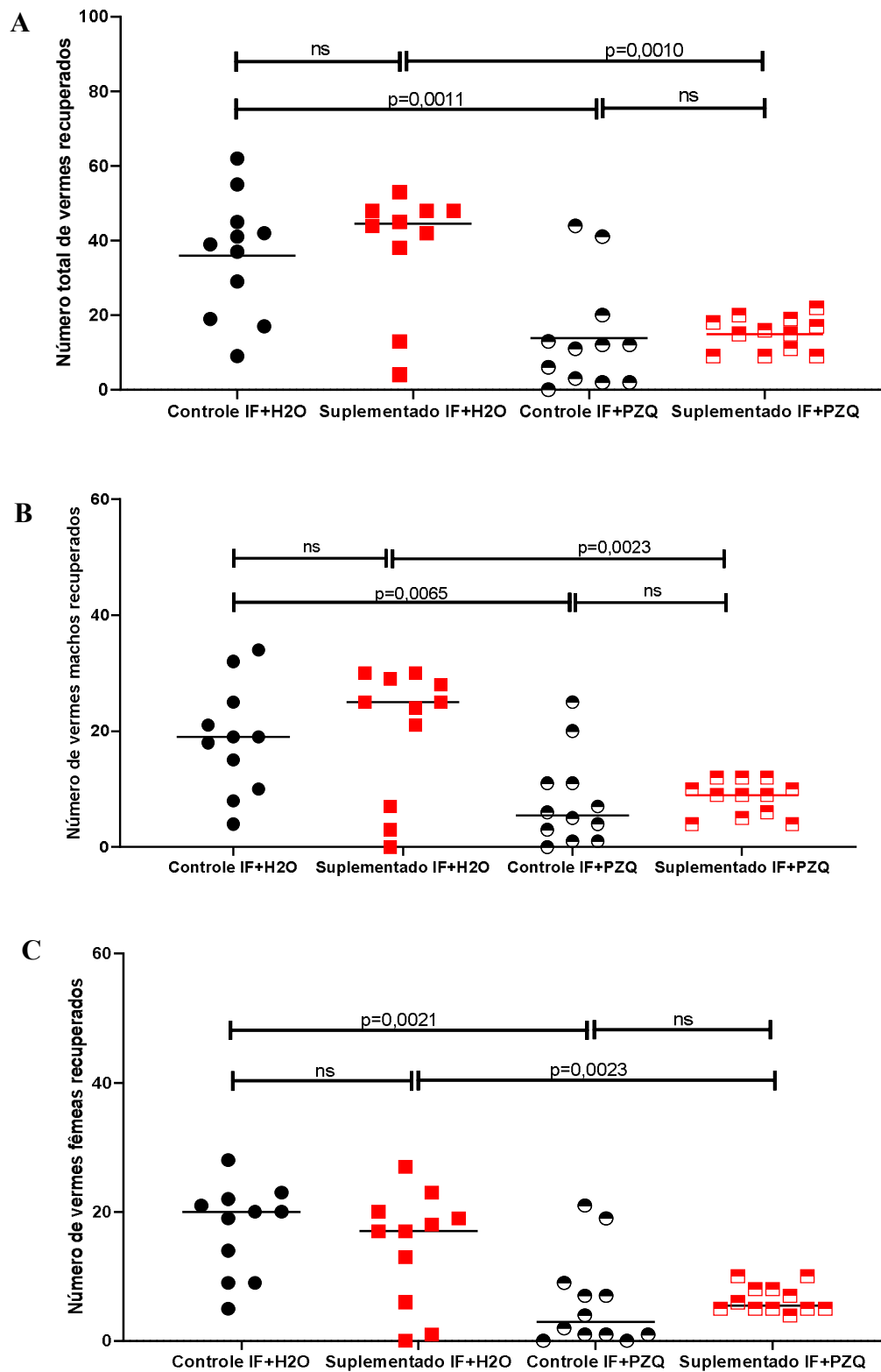


Figura 16. Número de vermes total (A), machos (B) e fêmeas (C) recuperados nos camundongos dos grupos experimentais. Aos cinquenta e cinco dias após a infecção, doze animais de cada grupo infectado, não tratados e tratados (100mg/Kg de PZQ) de ambas as dieta controle e suplementada foram perfundidos para recuperação de vermes presentes no sistema porta hepático de cada animal. As linhas representam as medianas do número de vermes recuperados para cada grupo. Diferenças estatísticas observadas no teste de Mann-Whitney com nível de significância de 99% estão apontadas nos gráficos.

Tanto no intestino (Figura 18 A) quanto no fígado (Figura 18B), quando comparados os dados dos animais não tratados e tratados de ambas as dietas (controle e suplementada) verificamos redução significativa na quantidade de ovos por grama de órgão, exceto no intestino dos animais do grupo submetido à dieta suplementada, onde não observamos diferenças significativas entre os animais tratados e não tratado. Porém, não observamos um impacto da dieta no número de ovos preses no fígado e intestino dos animais, uma vez que não forma observadas diferenças significativas entre animais infectados submetidos à dieta controle ou suplementada (Figura 18).

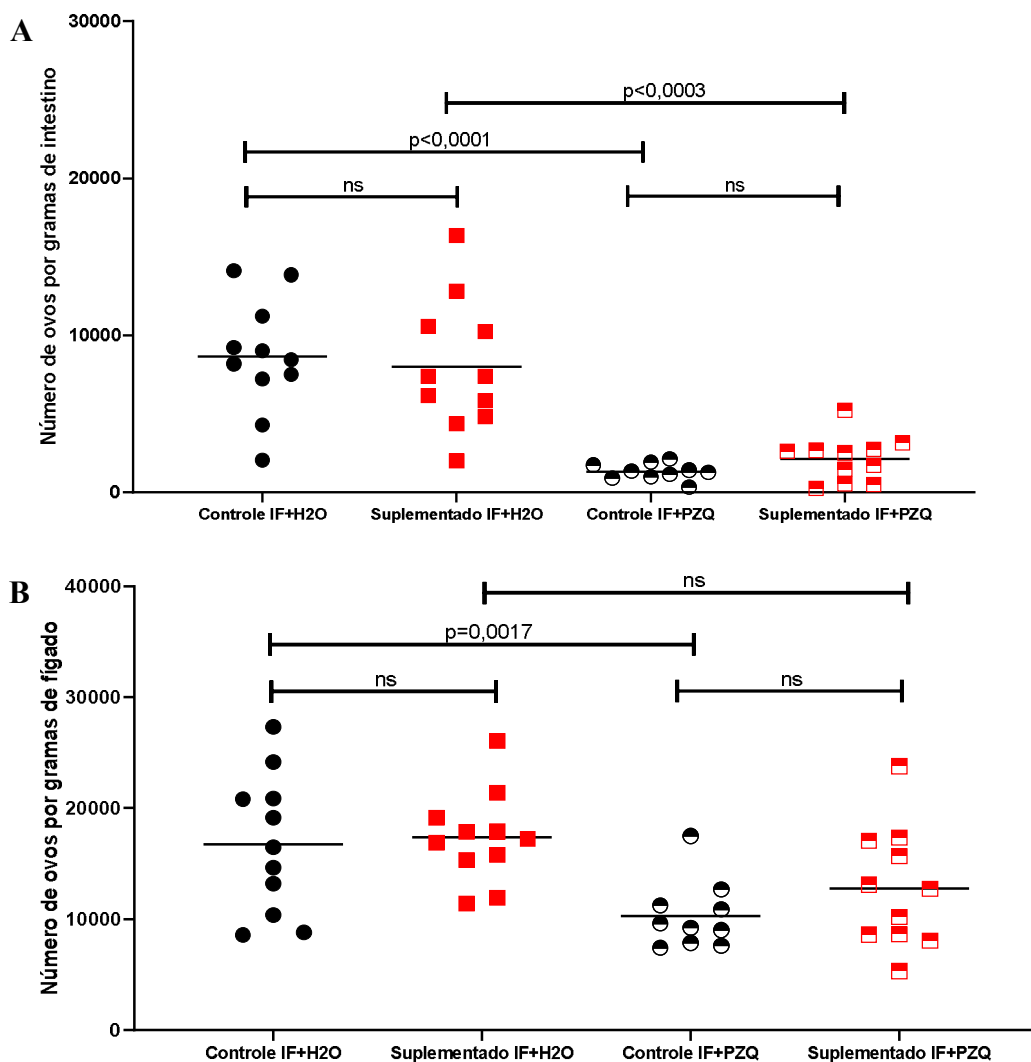


Figura 17. Número de ovos presentes no intestino (A) e fígado (B) dos animais infectados não tratados e tratados. Durante o procedimento de perfusão, o intestino e o fígado de cada animal dos grupos: dieta controle infectado, dieta controle infectado e tratado (100mg/Kg de PZQ), dieta suplementada infectados ou dieta suplementada infectado e tratado (100mg/Kg de PZQ) foram retirados, pesados e imersos em solução de KOH 10% para digestão. Após esse procedimento, o número de ovos foi contado com auxílio de um microscópio de luz. Cada símbolo representa o número de ovos/grama de órgão de um animal do grupo, a linha representa o valor médio observado no grupo. Diferenças significativas entre os grupos utilizando o teste Teste T Student, com nível de significância de 99% estão apontadas no gráfico.

Compondo a análise parasitológica, para verificar o impacto da suplementação sobre a formação e regulação do granuloma hepático, foi realizada a medida da área de granulomas em estágio exsudativo-produtivo em cortes histológicos do fígado de cada animal. Uma diminuição significativa da área dos granulomas foi observada nos animais submetidos à dieta suplementada quando comparado ao grupo submetido à dieta controle (Figura 19).

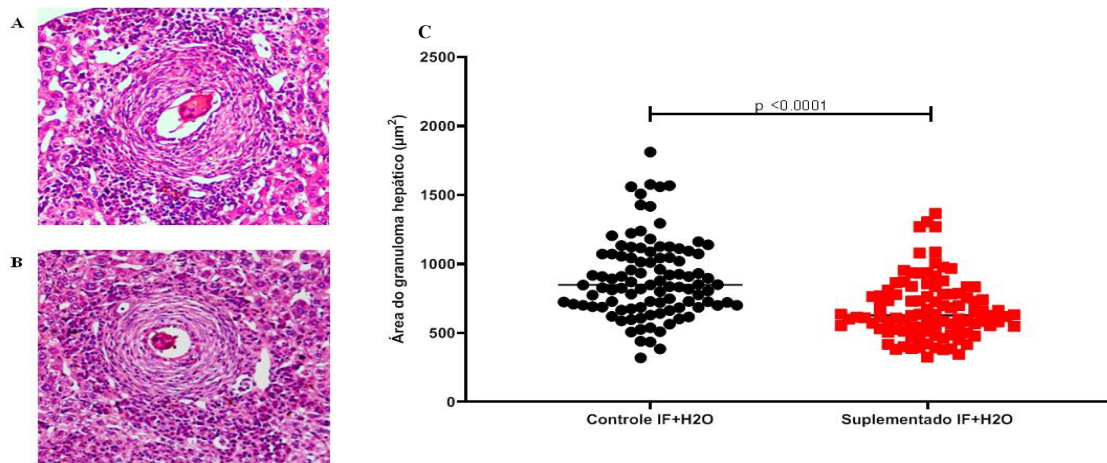


Figura 18. Medida da área do granuloma hepático de animais controle e suplementado infectados e não tratados. Para calcular as medidas da área de granuloma, na fase exsudativo-produtivo, foram coletados pedaços dos fígados de 11 animais controles e 11 animais suplementados, com média de 10 granulomas por animal (110 /grupo), ao final do experimento, após a perfusão. Imagens representativas de cortes histológicos de animais submetidos à dieta controle (A) ou suplementada (B) no aumento de 10x. Em (C) estão representadas as áreas em μm^2 de cada granuloma mensuradas no software Zeiss AxionVision 3.0 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Diferenças significativas entre os grupos, utilizando o Teste de Mann-Whitney, estão apontadas no gráfico. A linha representa a mediana das áreas dos granulomas em cada grupo.

Para a avaliação do perfil de resposta Th1/Th2/Th17 utilizamos soros de 8 animais de cada grupo e quantificamos as citocinas séricas utilizando a metodologia de CBA. Conforme esperado os níveis de citocina sérica nos animais não infectados ficaram abaixo do limite de detecção do kit, exceto para TNF- α (Figura 20), independente da dieta a qual o animal foi submetido (Figuras 20 a 26). Não observamos diferenças significativas nos níveis TNF- α , (Figura 20) IL-4 (Figura 21) e IL-2 (Figura 22) entre os animais submetidos à dieta controle ou suplementada. Em relação aos níveis séricos de IL-10 (Figura 23), IL-17 (Figura 24), IFN- γ (Figura 25) e IL-6 (Figura 26) produzidos em resposta à infecção, uma maior produção destas citocinas foi observada nos animais submetidos à dieta controle em relação aos animais submetidos à dieta suplementada. Após o tratamento, não foram observadas diferenças nos níveis séricos de citocinas entre os grupos submetidos à dieta controle ou suplementada (Figuras 20 a 26).

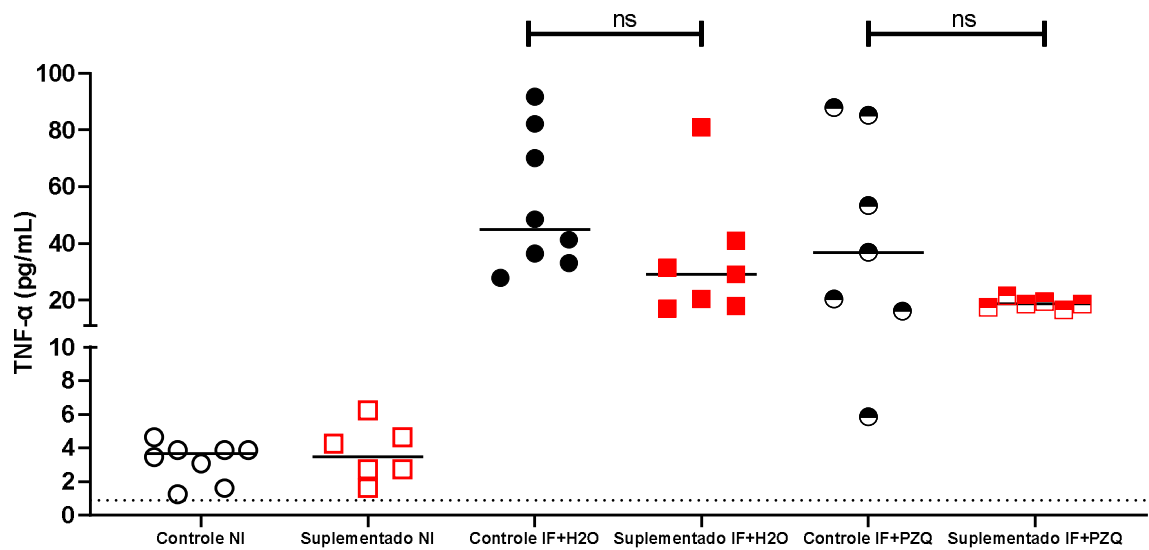


Figura 19. Produção de TNF- α em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

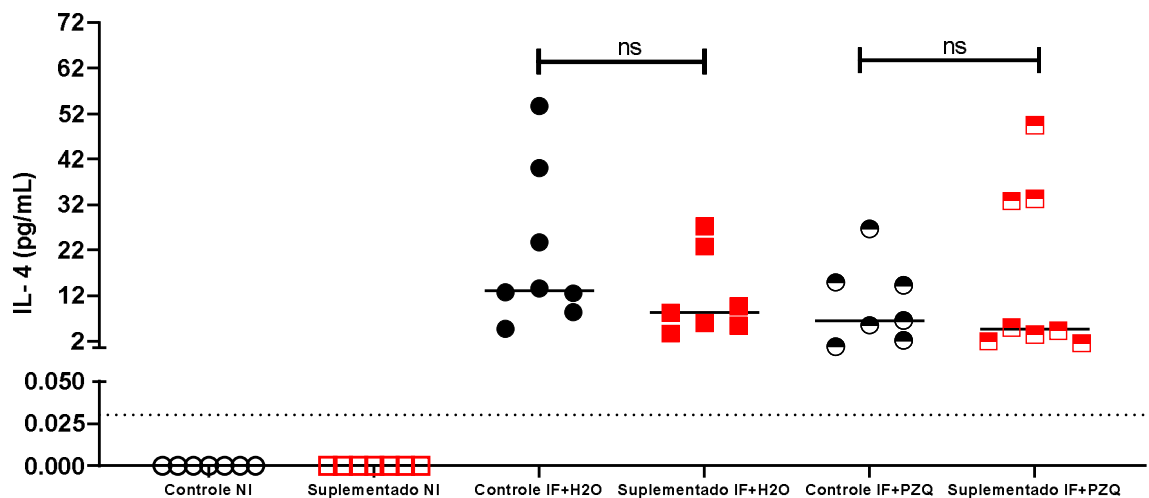


Figura 20. Produção de IL-4 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

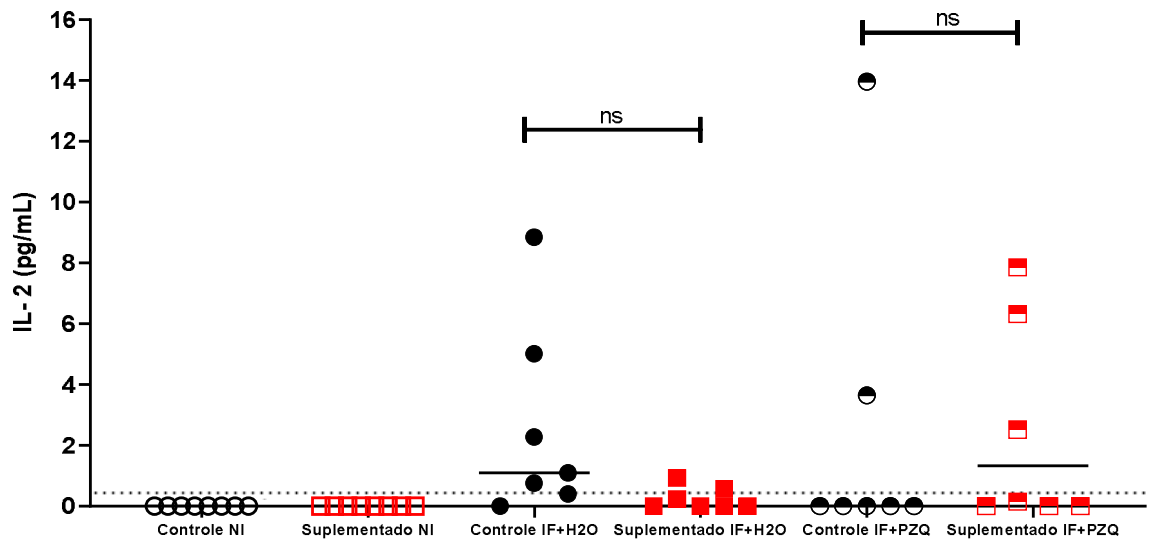


Figura 21. Produção de IL-2 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

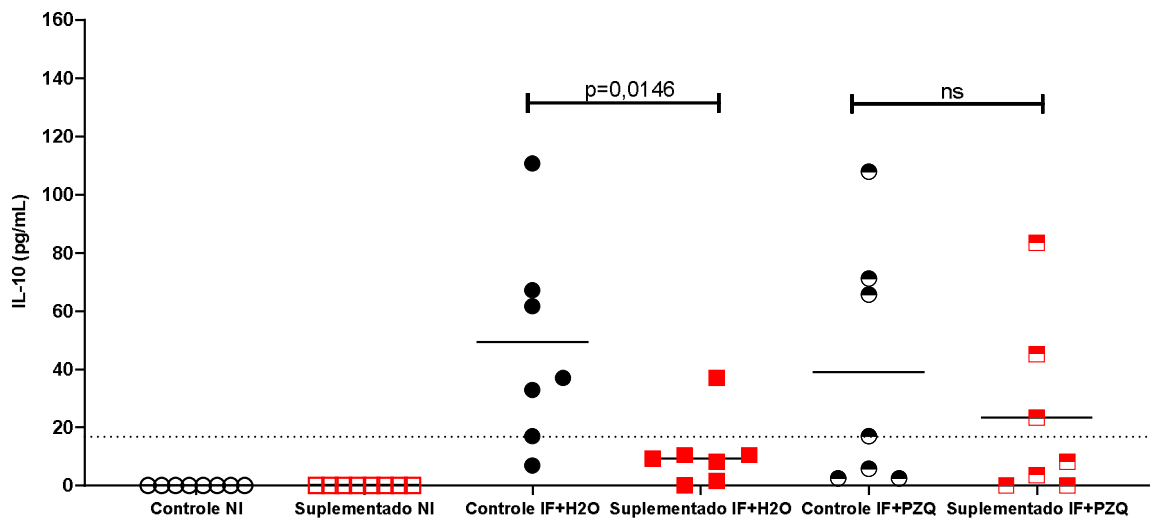


Figura 22. Produção de IL-10 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

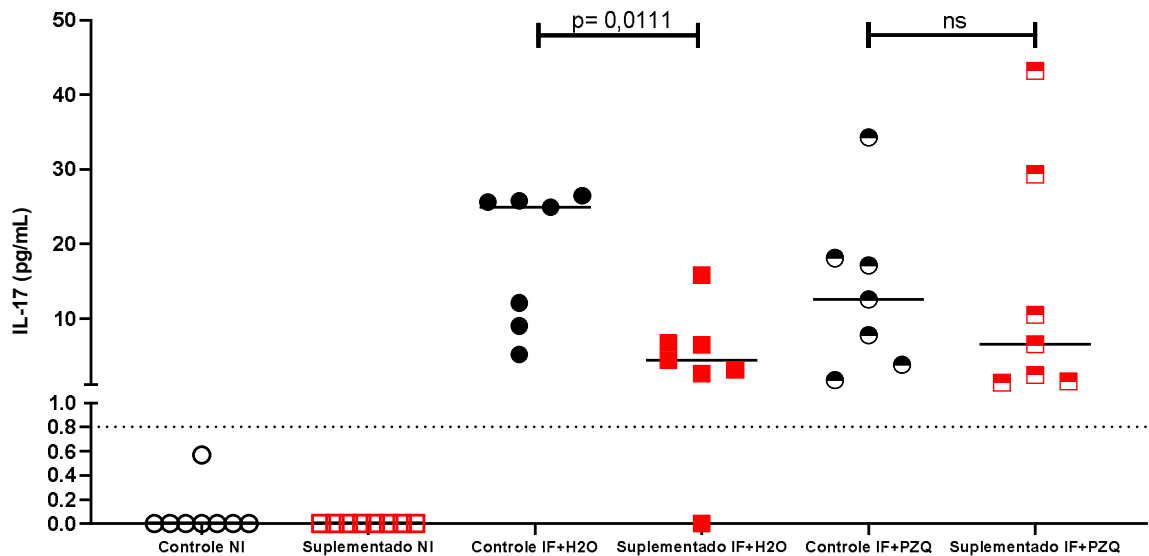


Figura 23. Produção de IL-17 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

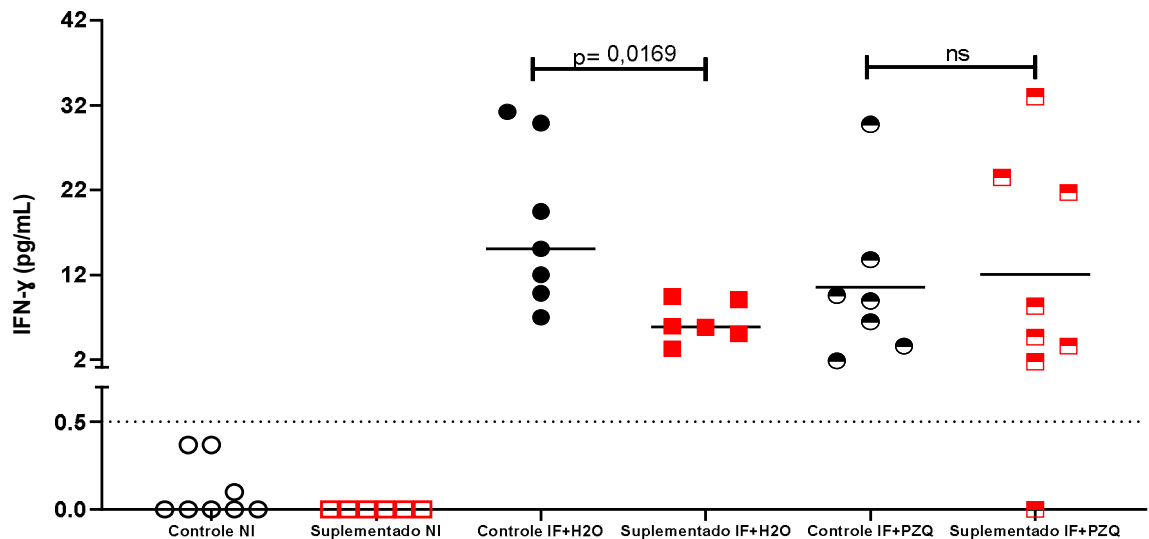


Figura 24. Produção de IFN- γ em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a média do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de T de Student, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

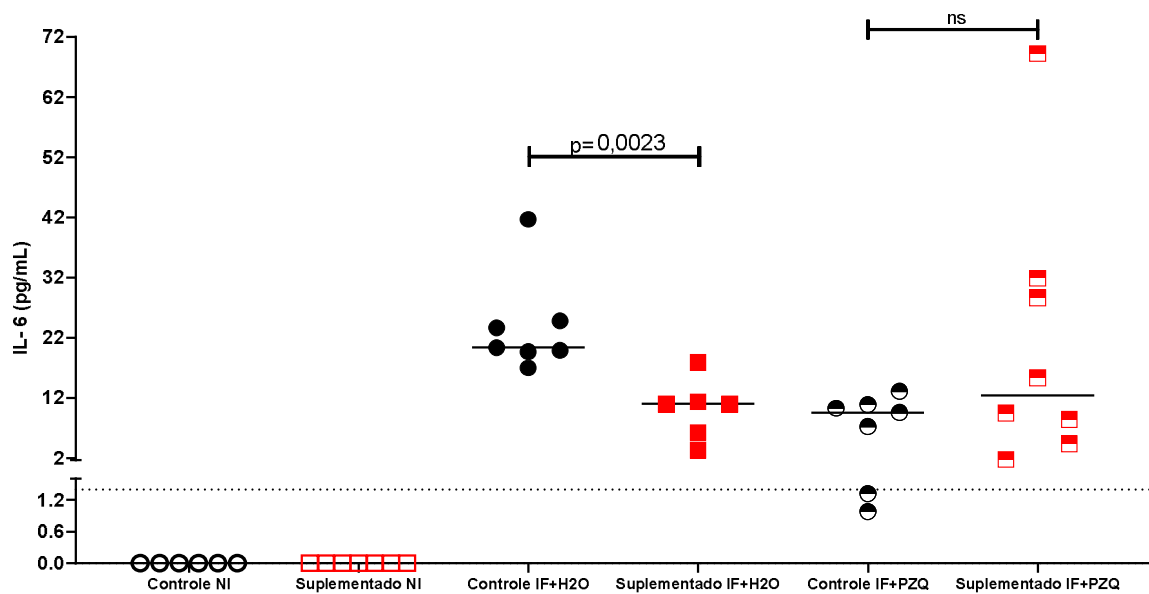


Figura 25. Produção de IL-6 em animais não infectados, infectados tratados e não tratados submetidos às dietas controle e suplementada. Para as análises da produção das citocinas foram selecionados 8 animais de cada grupo. Os soros destes animais foram obtidos ao final do experimento (80 dias após início da dieta), antes da perfusão do sistema porta hepático. Cada símbolo representa concentração de citocina sérica e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 98%, as diferenças estatísticas encontradas estão apontadas no gráfico. Os outliers, identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise. A linha tracejada aponta o limite de detecção do teste para esta citocina.

A resposta humoral representada no gráfico corresponde aos dados do ponto final do experimento (Tempo 80). Na análise verificamos produção significativa de IgG, IgG1 e IgG2c específicas para SWAP nos animais infectados quando comparados aos não infectados, em ambas as dietas controle e suplementada. Observamos redução significativa dos níveis de IgG2c anti-SWAP no grupo submetido à dieta suplementada infectado e não tratado comparado ao seu controle (dieta controle infectado não tratado) (Figura 27 C). Para as demais classes de imunoglobulina, não observamos diferenças entre os grupos infectados submetidos às diferentes dietas (Figura 27 A e B). Também não foram observadas diferenças nos níveis de IgG, IgG1 e IgG2c anti-SWAP entre os animais infectados e infectados e tratados submetidos a ambas as dietas (Figura 27).

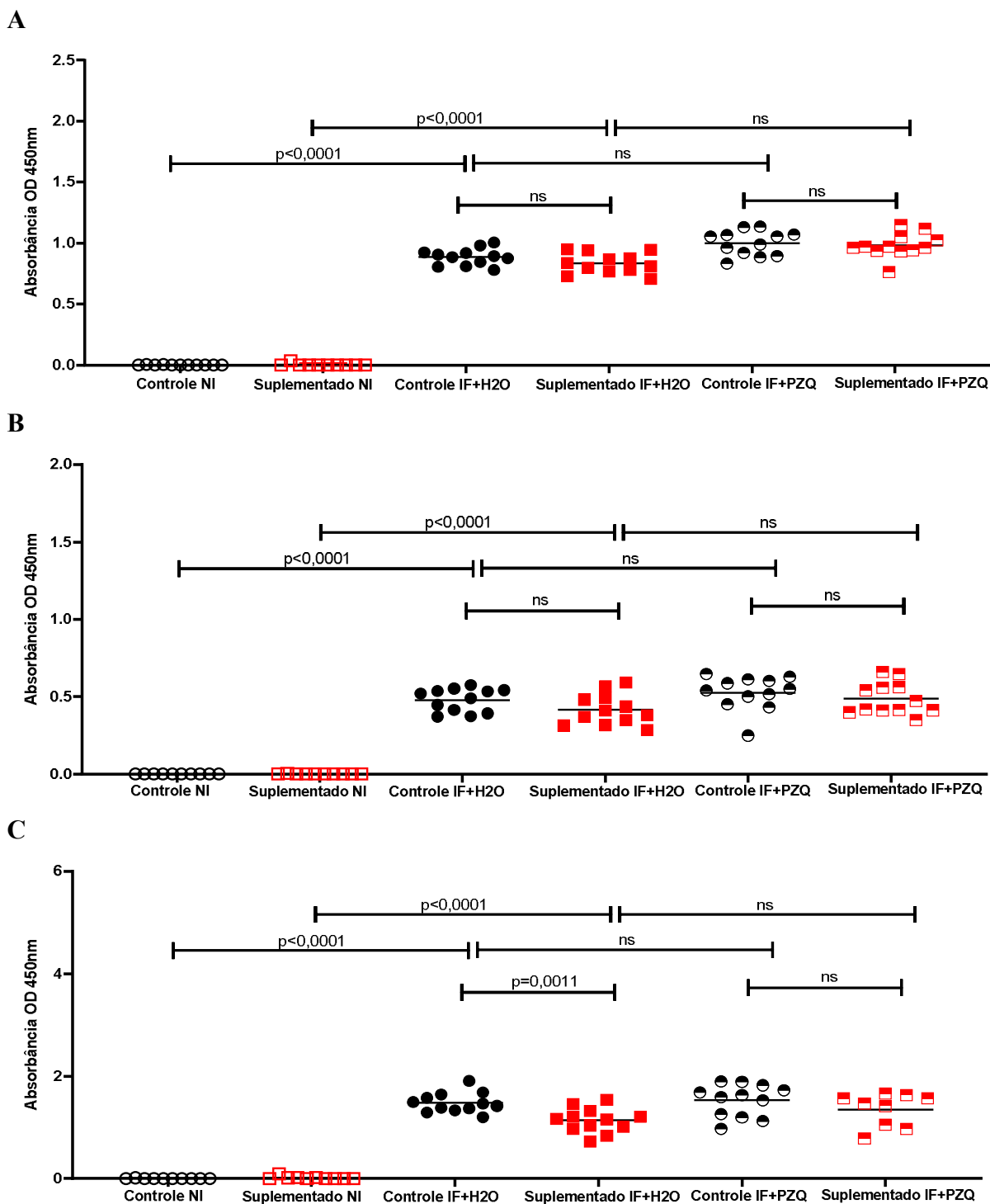


Figura 26. Análise da resposta humoral de IgG (A), IgG1 (B) e IgG2c (C) anti-SWAP nos animais submetidos as dietas controle e suplementada. A produção desses anticorpos foi avaliada 80 dias após a implementação da dieta, ponto final do experimento, a partir do soro de 12 animais por grupo. Cada símbolo representa o valor de absorbância obtido para cada animal e a linha representa a mediana do grupo. Para análise estatística foi utilizado o Teste de Mann-Whitney, com nível de significância de 99%. Diferenças estatísticas significativas estão apontadas no gráfico. Os outliers identificados pelo teste de ROUT foram retirados da análise.

6. DISCUSSÃO

A vitamina D interage diretamente sobre tecidos biológicos importantes, o que a torna relevante no estado saudável e nas doenças. A literatura tem demonstrado *in vitro* e *in vivo* resultados positivos de sua aplicação em distintas patologias, bem como para auxiliar a tratamentos e fármacos (BARRAT et al., 2002; DANIEL et al., 2008; SRINIVAS et al., 2009; HEWISON, 2010). Dados epidemiológicos apontam para quadros de hipovitaminose D em diversas regiões do mundo, principalmente Ásia, África e America Latina (PALACIOS et al., 2014; HILGER et al., 2014; HOLICK, 2017; ANTONIO et al., 2018). A esquistossomose compreende a patologia de maior impacto entre as helmintoses, sendo endêmica nos continentes de maior incidência para a hipovitaminose D (SAH et al., 2015; COHEN et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além disso, estudos evidenciaram a ação da vit. D na modulação do sistema imune, direcionando a uma resposta Th2, perfil esse de resposta característico em pessoas resistentes a re-infecção por *S.mansoni* (FITZSIMMONS et al., 2012). No entanto, a relação entre a vitamina D e a esquistossomose é pouco estudada.

Diante disso, neste trabalho buscamos compreender o impacto da suplementação com vitamina D sobre a sobrevivência do *Schistosoma* e a patologia da doença, assim como seu efeito adjuvante no tratamento com doses subcurativas de praziquantel. Para tanto, camundongos C57BL6, Livres de Patógenos Específicos (Specific Pathogen Free) foram selecionados para o trabalho devido à suscetibilidade da linhagem a esquistossomose, bem como pelo referencial de dosagens séricas de vitamina D já apresentadas na literatura em estudos prévios para esses animais (CHEEVER et al., 2002 ; STADECKER et al., 2004; MATHIEU et al., 2001; ELLAM et al., 2014).

A primeira etapa do projeto consistiu em padronizar um modelo de suplementação com vitamina D capaz de promover alterações séricas de seu metabolito ativo e também estabelecer o momento para realização da infecção desses animais com o parasito. Nessa fase avaliamos o comportamento animal, o peso, o consumo de ração e as dosagens séricas de vitamina D. A próxima etapa consistiu na execução do protocolo experimental em que se avaliou o comportamento animal, o peso, o consumo de ração, as dosagens séricas de vitamina D, carga parasitária em animais tratados e não tratados, níveis séricos de citocinas e de anticorpos e a patologia hepática.

O comportamento animal consiste em um marcador determinante e que pode influenciar o direcionamento e os resultados do trabalho experimental proposto, pois animais

em condições de estresse, dor ou sofrimento produzem respostas biológicas/fisiológicas que podem alterar os dados da pesquisa, além de impactar o bem estar animal, que deve ser prezado em qualquer experimento que utilize animais como meio (ANDRADE et al., 2002; DALE et al., 2010). O monitoramento animal compreendeu itens descritos na literatura e em diretrizes do CONCEA (ANDRADE et al., 2002; DALE et al., 2010; CONCEA, 2016). No período de padronização, dos itens de comportamento animal avaliados, dois apresentaram alteração: a perda de peso e redução no consumo de ração. Na primeira semana desta etapa, houve perda de peso não superior a 20% por alguns animais, o que não foi observado posteriormente. No protocolo experimental também foi observada essa perda ponderal inicial não superior a 20% na primeira semana, sendo presente novamente após a infecção e o tratamento, porém em todos os grupos houve ganho de peso significativo quando comparados ao ponto inicial do experimento. Além disso, esse dado refletiu-se quase que igualmente entre animais controles e suplementados, sendo a quantidade de 14 e 17 camundongos, respectivamente. A adaptação à dieta requer um período, que varia por animal, linhagem, espécie, idade, entre outros (ANDRADE et al., 2002; CONCEA, 2016). Nesse projeto haviam camundongos em diferentes idades (4 a 6 semanas), com diferença entre aqueles que já se alimentavam por dieta sólida e aqueles que iniciavam nesse tipo de alimentação, o que pode explicar essa perda de peso pelos camundongos, em consonância com a literatura (ANDRADE et al., 2002; CHORILLI et al., 2007). Na segunda etapa do projeto, quando avaliamos o impacto da dieta sobre a infecção e tratamento, também foi identificado, nas 3 últimas semanas, perda de pelo em 9 animais do grupo controle não infectado. Na observação foi possível notar que essa perda referiu-se ao *barbering* compreendido como manifestação de comportamento de dominância dentro de uma ninhada em um mesmo ambiente, como possível forma de organizar-se hierarquicamente a sociedade dentro de uma caixa/gaiola (PINTO, 2012). Além desses itens, nessa etapa, nas duas últimas semanas foi observada alteração nos olhos em 2 animais, um do grupo controle IF+H₂O e um do grupo suplementado IF+H₂O. Segundo a literatura, a infecção por *S.mansoni* principalmente a forma hepatoesplênica induz hipertensão portal e conseqüentemente alterações na circulação sanguínea sistêmica, e dessa forma impacto na microcirculação oftalmológica (SALOMÃO, 1995; REMIGIO et al., 2009). Associa-se a isso, a possibilidade da migração e alojamento de ovos na retina e nervos relacionados à estrutura ocular (SALOMÃO, 1995; LUNA DE SAMPAIO, 2005; CELINO et al., 2015). Remigio et al. (2009), ao realizar avaliação histológica e histomorfométrica da retina de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni* na forma hepatoesplênica encontrou alterações oculares em 4% do total dos animais

infectados comparados aos animais controles. Isso demonstra consonância ao verificado em nosso experimento. Observamos também, tanto no período de padronização como no protocolo experimental, redução significativa no consumo de ração em pontos específicos ao longo do tempo: após um pico de consumo na 2ª semana, no período subsequente a infecção e após o tratamento. Essas variáveis foram notadas para todos os grupos em ambas as dietas. Devido a esses achados tanto na análise por grupo quanto entre grupos, não atribuímos a redução do consumo à dieta ofertada, mas a fatores como adaptação à ração, infecção e tratamento (ANDREWS et al., 1980; FIORE et al., 1996; ANDRADE et al., 2002; CIOLI E PICA-MATTOCCIA, 2003).

O acompanhamento do peso é uma variável que nos permite verificar a adequação do modelo experimental e expor as condições gerais dos animais, uma vez que as alterações das dietas constituem itens que podem impactar na saúde dos camundongos e também induzir o estresse nos animais. Na avaliação da variação de peso (ganho ou perda ponderal), os animais de ambos os grupos, no período de padronização da dieta, apresentaram pequenas oscilações nas duas primeiras semanas, seguidos por uma convergência nos dados na 3ª semana, e ascensão da curva ponderal até o final do protocolo experimental. Na etapa 2, os animais de todos os grupos experimentais (NI, IF+H₂O, IF+PZQ – controle e suplementado) apresentaram redução pequena ou moderada dessa variável, não superior a 20%, em pontos específicos da análise ponderal relacionada a alteração/implementação da dieta, ao período pós-infecção e a administração do medicamento, porém esse decréscimo na variação do peso não significou perda ponderal comparada ao valor que os animais apresentavam ao início do experimento. Conforme a literatura, era esperado que os animais infectados por *S.mansoni* perdessem peso devido a infecção (ANDREWS et al., 1980; ZANOTTI-MAGALHÃES et al., 1995; FIORE et al., 1996), porém esse fato somente foi observado pontualmente e se associou à redução de consumo da dieta observado neste período. Em nosso trabalho acompanhamos o peso semanalmente durante 55 dias após infecção, o que não foi observado em outros estudos que avaliaram essa variável ao final de 50 dias ou após 18 semanas de infecção. O ganho de peso observado em todos os grupos ao final do protocolo experimental era esperado e é inerente ao desenvolvimento fisiológico dos animais, pois ao iniciarmos a pesquisa, as idades variavam entre 4 a 6 semanas de vida e ao finalizarmos o protocolo os animais apresentavam idades entre 18 a 20 semanas.

O modelo de escolha de suplementação de vitamina D foi pela oferta da ração AIN93M, peletizada, *ad libitum*, desse modo todos os animais receberam a ração especializada, com as concentrações de vitamina D modificadas. Estudos prévios

demonstraram ser a AIN93 um alimento adequado, completo e bem balanceado para roedores, sendo utilizada em pesquisas científicas (REEVES et al., 1993; BIANCHINI et al., 2015). O consumo de ração após a primeira semana de adaptação a dieta mostrou-se com pequenas oscilações não significativas estatisticamente entre os grupos ao longo da fase de padronização. Esse dado demonstra a aceitabilidade e adequação da dieta quanto ao cheiro, sabor, textura, mesmo no período de infecção, minimizando o insucesso do modelo, pois algumas linhagens e espécies são muito sensíveis às alterações alimentares (ANDRADE et al., 2002). No período experimental houve momentos pontuais de redução significativa nessa ingestão alimentar que coincidiu com a adaptação a dieta, o período pós-infecção e pós-tratamento. Tal fato não deve ser atribuído à ração, mas ao quadro infeccioso que devido as suas repercussões nos animais podem induzir a alterações comportamentais como uma redução no apetite (ANDREWS et al., 1980; FIORE et al., 1996) e também ao tratamento que pode apresentar efeitos colaterais como náuseas, vômitos e dores abdominais (ANDREWS et al., 1980; CIOLI E PICA-MATTOCCIA, 2003). Notamos também diferenças entre os grupos na análise por semana, porém essas distinções não seguiram um padrão sendo, portanto, característico de cada animal e cada grupo avaliado.

A dieta suplementada ofertada aos animais foi capaz alterar significativamente os níveis séricos de vitamina D nos tempo 25 e 80 quando comparados ao tempo 0, tanto no etapa de padronização (tempo 25) quanto no etapa experimental (tempo 25 e 80), corroborando com dados da literatura que verificaram alterações sistêmicas da vitamina D ao avaliar o efeito da suplementação com essa vitamina em modelo murino por meio da utilização de ração enriquecida (WILLIAMSOM et al., 2017; YUMOL et al., 2018). Em relação à alteração das concentrações séricas dessa vitamina frente à esquistossomose mostrou-se que a infecção não impactou significativamente a produção de vitamina D, apesar de um dos órgãos mais acometidos pela doença, o fígado, consistir em órgão importante na ativação e metabolismo dessa vitamina.

Diante do sucesso na padronização do modelo de suplementação com vitamina D e da verificação de alteração sérica de um de seus metabólitos ativos, partimos para a avaliação do impacto da vitamina D na infecção experimental por *S.mansoni*, por meio das análises da carga parasitária, patologia hepática, produção de citocinas e anticorpos em resposta a infecção e tratamento.

Em relação à carga parasitária, especificamente número de vermes recuperados do sistema porta-hepático, não houve diferença significativa entre os animais infectados submetidos à dieta controle ou suplementada. O mesmo ocorreu na análise dos ovos retidos

no fígado e no intestino desses animais. Esses achados corroboram o estudo de He et al. (2018) que ao avaliarem a participação do receptor de vitamina D (VDR) na infecção pelo *Schistosoma japonicum* não observaram diferença significativa entre os grupos controle e suplementado com análogo da vit.D quanto ao número de vermes e número de ovos retirados no fígado. Em nosso trabalho, como esperado, observamos diferenças na carga parasitária entre animais tratados e submetidos a ambas as dietas, demonstrando a eficácia do tratamento, ainda que em doses subcurativas frente à patologia (DA SILVA et al., 2017). No entanto, não observamos diferenças significativas de carga parasitária entre os grupos tratados nas diferentes dietas, demonstrando que a suplementação com Vitamina D não tem efeito aditivo ou sinérgico ao tratamento com praziquantel.

Conforme aponta a literatura, a vitamina D é moduladora da resposta imune. Direciona a resposta para um perfil Th2 e induz a diferenciação de Treg resultando em uma redução das citocinas do perfil Th1 e Th17 (BOONSTRA et al., 2001; KHOO et al., 2011; STERLING et al., 2012; ZAHRAN et al., 2018). Nossos resultados mostraram que na avaliação de citocinas séricas, IL-10, IL-17, IFN- γ e IL-6 encontravam-se significativamente reduzidas no grupo suplementado infectado e não tratado quando comparado aos animais submetidos à dieta controle. Boonstra et al. (2001), no estudo *in vitro* com células T de camundongos, analisaram o efeito da vitamina D sobre populações de células T e observaram que essa vitamina afeta a polarização das células Th, inibindo Th1 (produção de IFN- γ), aumentando o desenvolvimento das células Th2 (produção de IL-4, IL-5 e IL-10). Nesse sentido, pesquisas identificaram esses eventos *in vivo* em animais assim como em humanos. Daniel et al. (2008), na análise do efeito da vitamina D, bem como sua associação aos corticosteroides em camundongos com colite induzida observaram uma diminuição na expressão de marcadores relacionados a resposta Th1, enquanto marcadores Th2 como IL-4 e GATA3 estavam aumentados. O calcitriol, em particular, promoveu perfis reguladores de células T, indicado por um aumento acentuado de IL-10, TGF β e CTLA-4. Além disso, a análise de IL-12p70 principal citocina produzida por células dendríticas responsável por uma diferenciação das células Th1 revelou uma redução significativa. Em humanos, Roffe-Vazquez et al. (2019) ao realizarem estudo longitudinal em portadores com Insuficiência Cardíaca verificaram uma correlação positiva entre a concentração sérica de 25 (OH) D e a ingestão de alimentos ricos em vitamina D e uma correlação inversa entre os níveis de 25 (OH) D e a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-17A. Em contrapartida, nossos estudos mostraram uma redução significativa de IL-10 no soro de camundongos infectados que consumiram a dieta suplementada para vitamina D. Além disso, não foram observadas diferenças significativas

nos níveis séricos de IL-4 e IL-2 entre os animais alimentados com dieta controle e com suplementada com Vitamina D.

Em relação à produção de citocinas na esquistossomose, estudos relacionaram o agravamento da patologia à persistência de um estado pró-inflamatório marcado pelo aumento de citocinas do tipo Th1, como interferon (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (RUTITZKY et al., 2006; PEARCE et al., 2002; SILVA et al., 2008; FERNANDES et al., 2014). Mwatha et al. (1998) constataram que pacientes com hepatoesplenomegalia grave decorrente da esquistossomose exibiam altos níveis de IFN- γ e TNF- α acompanhados de baixos níveis de IL-5. Alguns trabalhos também demonstraram que as citocinas IL-10 e IL-13 encontram-se fortemente associadas com as formas graves de fibrose (DE JESUS et al., 2004). Em nosso trabalho, observamos redução significativa de IL-10, IL-17, IL-6 e IFN- γ no grupo suplementado não tratado, o que contribuiu para quadros menos graves da patologia. Nos grupos dos animais tratados, comparados os controles e suplementados, não observamos diferenças significativas em relação a todas as citocinas avaliadas no estudo, apesar dos níveis de citocina ainda serem maiores do que o observado em animais não infectados. Isso pode ter ocorrido devido ao tratamento acontecer 2 semanas antes desta dosagem, e este intervalo curto ter contribuído para que estas citocinas ainda fossem encontradas em níveis e significativos no soro.

As alterações encontradas no perfil de citocinas, em nosso estudo, podem explicar, em parte, a diminuição da área dos granulomas hepáticos nos animais alimentados com dieta suplementar. Neste complexo mecanismo de regulação de granuloma na esquistossomose, He et al. (2018) apontaram o papel de microRNAs na regulação da expressão de VDR em células hepáticas estreladas e seu efeito no aumento da fibrose hepática. No contexto da infecção pelo *Schistosoma japonicum*, estes autores demonstraram que o IFN- γ desempenha um papel importante ao regular a produção do micro-RNA-351, ao mesmo tempo em que esta citocina aumenta a expressão de VDR nestas células. Além disso, o trabalho demonstra, assim como observado em nosso estudo, que a suplementação com um análogo da vitamina D foi capaz de regular a área dos granulomas hepáticos. Portanto, dada a diminuição da concentração sérica de IFN- γ nos animais suplementados, seu real envolvimento na regulação do granuloma precisa ser melhor explorada. No entanto, estudos mostram que a vitamina D regula a expressão dos seus receptores VDR (WIESE et al., 1992; ARBOUR et al., 1993; ZELLA et al., 2006; KHUNDMIRI et al., 2016). Kaègi et al. (2018), ao avaliarem o papel do fosfato dietético, FGF23 e 1,25 (OH) 2D₃ na regulação das enzimas metabolizadoras de vitamina D

em tecidos renais e extrarrenais de camundongos observaram que a suplementação com seu metabolito ativo (calcitriol) induziu ao aumento de enzimas da via de ativação nos rins, assim como a expressão de receptores de VDR. Dados da literatura corroboram com os verificados no trabalho de Kaègi e extrapolam esses achados, demonstrando que o aumento da biodisponibilidade de vitamina D, induz ao aumento na expressão de VDR e nas enzimas da cascata de metabolização dessa vitamina também em outros órgãos e tecidos (WIESE et al., 1992; ARBOUR et al., 1993; ZELLA et al., 2006; KHUNDMIRI et al., 2016).

Rutitzky & Stadecker (2006) demonstraram que a IL-17 associa-se à patologia fibrótica, pois ao tratarem camundongos com anticorpos anti-IL-17 neutralizantes, constataram uma redução significativa da inflamação hepática. Em consonância, Zhang et al. (2015) constataram que a IL-17A contribui para a patogênese da fibrose hepática na esquistossomose murina, possivelmente pela ativação de células estreladas hepáticas e pelo estímulo à liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Além disso, citocinas como IFN- γ , IL-6, IL-2 e IL-17 apresentavam-se aumentados nos quadros mais graves desta verminose (FERNANDES et al., 2014). Em pacientes com esquistossomose foram observados níveis significativos de IL-6, TNF- α e TGF- β , citocinas pro-fibróticas, correlacionado aos quadros graves de fibrose.

Verificamos também que camundongos infectados e infectados e tratados, tanto do grupo controle quanto do grupo suplementado, foram capazes de produzir anticorpos IgG, IgG1, IgG2c contra antígeno de verme adultos (SWAP) de *S.mansoni* após a infecção, no entanto, os níveis de IgG2c nos animais suplementados infectados foram significativamente mais baixos nos animais submetidos à dieta suplementada em relação aos animais alimentados com dieta controle. Estudos anteriores investigaram os efeitos da vitamina D nas células imunes adaptativas humanas e mostraram a presença do receptor VDR, bem como das enzimas ativadoras dessa vitamina nas células T e B (LEMIRE et al., 1984). Essa vitamina impede a proliferação e diferenciação de células B e, portanto, reduz a secreção de imunoglobulinas (LEMIRE et al., 1984; SHAYGANNEJAD et al., 2018). Além disso, segundo a literatura, a troca de isotipo das imunoglobulinas, dentre outros fatores, relaciona-se à presença de citocinas específicas. Assim, a produção dos isotipos IgG1 e IgG2c associam-se a produção de IL-4 e IFN- γ , respectivamente, e por isso, o aparecimento destes isotipos pode inferir o direcionamento de uma resposta imune Th1 (IFN- γ – IgG2c) ou Th2 (IL-4 – IgG1) (BARR et al., 2009; STAVNEZER, 1996). Nossas análises séricas de citocinas evidenciaram nos animais suplementados não tratados e infectados uma redução significativa

de IFN- γ quando comparados ao controle. Sendo que esta produção reduzida de IFN- γ pode se relacionar aos baixos níveis de IgG2c, observados nestes animais.

Portanto, a suplementação com vitamina D influenciou na produção de citocinas e anticorpos, reduziu a área dos granulomas hepáticos, sem impactar nas variáveis comportamentais animais, na carga parasitária e no tratamento com praziquantel. Os mecanismos envolvidos nesses procesos sobre sistema imune e patologia hepática na esquistossomose ainda precisam ser esclarecidos.

7. CONCLUSÃO

A dieta suplementada com vitamina D a 10.000UI/kg foi capaz de alterar os níveis séricos dessa vitamina em camundongos sem afetar as variáveis comportamentais animais. Essa suplementação também não impactou a sobrevivência do *Schistosoma mansoni* e nem, tampouco, exerceu qualquer efeito adjuvante ao tratamento com doses subcurativas de praziquantel. No entanto, ela impactou na produção de citocinas inflamatórias, (citar quais) resultando em níveis significativamente mais baixos destas citocinas em resposta à infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Esta modulação da resposta inflamatória pode estar associada à diminuição na área dos granulomas hepáticos observados nos animais alimentados com dieta suplementada. Portanto, a suplementação com vitamina D exerce um efeito benéfico sobre a patologia hepática sem afetar a sobrevivência do parasito no hospedeiro e a eficácia do tratamento com o praziquantel, podendo ser uma ferramenta auxiliar na terapia de pacientes com esquistossomose. Entretanto, ensaios clínicos ainda precisam ainda ser realizados para confirmar este efeito em humanos.

8. PERSPECTIVAS

As próximas etapas do projeto consistem na identificação da microbiota intestinal presente nas fezes dos animais do estudo e posterior análises de correlação entre microbiota, concentrações séricas de vitamina D, carga parasitária, perfil de citocinas e níveis de imunoglobulinas antes e após o tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABOU-EL-NAGA, I. F. et al. Biological and proteomic studies of *Schistosoma mansoni* with decreased sensitivity to praziquantel. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 66, n. 101341, 2019.
- ADAMS, J. S. et al. Vitamin D in defense of the human immune response. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1117, p. 94-105, 2007.
- ADAMS J. S.; HEWISON, M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of the innate and adaptive immunity. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.** v. 4, n. 2, p. 80-90, 2008.
- AGUILAR-JIMENEZ, W.; ZAPATA, W.; RUGELES, M. T. Antiviral molecules correlate with vitamin D pathway genes and are associated with natural resistance to HIV-1 infection. **Microbes. Infect**, v. 18, p. 510–516, 2016.
- AIREY, F. S. Vitamin D as a remedy for lupus vulgaris. **Med. World**, v. 64, p. 807–810, 1946.
- ALLEN J. E.; WYNN, T. A. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 5, 2011.
- ALMEIDA, A. C. F. et al. Do all infants need vitamin D supplementation? **PLoS One**, v. 13, n. 4, 2018.
- ALTIERI, B. et al. Vitamin D testing: advantages and limits of the current assays. **Eur J Clin Nutr.**, v. 6, 2020.
- AMARAL, K. B. et al. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS One**. v. 12, n. 9, 2017.
- AMARAL, R. F. do. **Vitaminas-d2-d3**. Disponível em: <https://robertofrancodoamaral.com.br/blog/wp-content/uploads/2014/01/vitaminas-d2-d3.png>. Acesso em: 13/12/2019.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação[online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books<<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 21/12/2019.
- ANDRADE, Z. A. **A patologia da esquistossomose humana**. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 547, 2008.
- ANDRADE, Z. A.; WARREN, K. S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 53-57, 1964.

- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n.11, p. 656-63, 2009.
- ANDREWS, P.; DYCKA J.; FRANK, G. Effect of praziquantel on clinical-chemical parameters in healthy and schistosome-infected mice. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 74, n. 2, p. 167-77, 1980.
- ANTONIO, J. et al. Deficiência da Vitamina D e Doenças Cardiovasculares. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ – Brasil. **International Journal of Cardiovascular Sciences.**, v. 31, n. 4, p. 422-432, 2018.
- ARBOUR, N. C.; PRAHL, J. M.; DELUCA, H. F. Stabilization of the vitamin D receptor in rat osteosarcoma cells through the action of 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Mol Endocrinol.**, v. 7, p.1307–1312, 1993.
- ARDISSONE, A. N. et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.
- ARGIRO, L. et al. Induction of a protective immunity against *Schistosoma mansoni* with ovalbumin-coupled Sm37-5 coadsorbed with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or IL-12 on alum. **Vaccine**, v.17, p. 13–8, 1999.
- ARNSON, Y.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y. Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. **Ann Rheum Dis.**, v. 66, n. 9, p. 1137-42, 2007.
- ARRIETA, M. C. et al. The intestinal microbiome in early life: health and disease. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 427, 2014.
- ARTIS, D.; GRENCIS, R. K. The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. **Mucosal Immunol**, v. 1, n. 4, p. 252–264, 2008.
- ASHENAFI, S. et al. Daily Nutritional Supplementation with Vitamin D₃ and Phenylbutyrate to Treatment-Naïve HIV Patients Tested in a Randomized Placebo-Controlled Trial. **Nutrients**, v. 1011, n. 1, 2019.
- AZRIELANT, S.; SHOENFELD, Y. Vitamin D and the Immune System. **Isr Med Assoc J.** v. 19, n. 8, p. 510-511, 2017.
- BAEKE, F. et al. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation. **J Immunol.**, v. 186, n. 1, p. 132-42, 2011.
- BAKDASH, G. et al. Intradermal application of vitamin D3 increases migration of CD14⁺ dermal dendritic cells and promotes the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. **Hum Vaccin Immunother.**, v. 9, n. 2, p. 250-8, 2013.
- BARR, T. A. et al. B cell intrinsic MyD88 signals drive IFN γ production from T cells and control switching to IgG2c. **J Immunol.**, v. 183, n. 2, p. 1005-12, 2009.
- BARRAT, F. J. et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. **J Exp Med.**, v. 195, n. 5, p. 603-16, 2002.

- BASHIR, M. et al. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. **Eur J Nutr.**, v. 55, n. 4, p. 1479-89, 2016.
- BELKAID, Y.; HARRISON, O. J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. **Immunity**, v. 46, n. 4, p. 562-576, 2017.
- BELKAID, Y.; NAIK, S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. **Nat Immunol.**, v. 14, n. 7, p.646-53, 2013.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014.
- BHALLA, A. K. et al. Specific high-affinity receptors for 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 57, n. 6, p. 1308-10, 1983.
- BHALLA, A. K.; AMENTO, E. P.; KRANE, S. M. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. **Cell Immunol.**, v. 98, p. 311-22, 1986.
- BHATT, K. et al. 1,25 (OH)(2)D(3) treatment alters the granulomatous response in M. tuberculosis infected mice. **Sci Rep.**, v. 4, n. 6, 2016.
- BIANCHINI, C. et al. The generation of C-3 α epimer of 25-hydroxyvitamin D and its biological effects on bone mineral density in adult rodents. **Calcif Tissue Int.**, v. 96, n. 5, p. 453-64, 2015.
- BIKLE, D. D. Nonclassic actions of vitamin D. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 94, n. 1, 2009.
- BIKLE, D. D. Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 13, p. 3-19, 2012.
- BIKLE, D. D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. **Chem. Biol.**, v. 21, n. 3, p. 319-329, 2014.
- BILICI, M. E. et al. The effect of 2000 IU/day vitamin D supplementation on insulin resistance and cardiovascular risk parameters in vitamin D deficient obese adolescents. **Turk J Pediatr.**, v. 61, n. 5, p. 723-732, 2019.
- BOGLIOLO, L. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981.
- BISCHOFF, H. A. et al. In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human skeletal muscle tissue. **Histochem. J.**, v. 33, p. 19-24, 2001.
- BLOMBERG, J. M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Hum Reprod.**, v. 25, p. 1303-11, 2010.
- BLUNT, J. W.; DELUCA, H. F.; SCHNOES, H. K.. 25-Hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D3. **Biochemistry**, v. 7, n. 10, p. 3317-3322, 1968.
- BOONSTRA, A. et al. 1 α ,25- Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. **J Immunol.**, v. 167, n. 9, p. 4974-80, 2001.

- BORA, S. A. et al. The Gut Microbiota Regulates Endocrine Vitamin D Metabolism through Fibroblast Growth Factor 23. **Front Immunol.**, v. 9, p. 408, 2018.
- BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev.**, v. 29, n. 6, p. 726-76, 2008.
- BOUILLON, R.; OKAMURA, W. H.; NORMAN, A. W. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. **Endocr Rev.**, v. 16, n. 2, p. 200-57, 1995.
- BOUILLON, R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 13, n. 8, p. 466-479, 2017.
- BOURLON, P. M.; BILLAUDEL, B.; FAURE-DUSSERT, A. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas. **J Endocrinol.**, v. 160, n. 1, p. 87-95, 1999.
- BRUNET, L. R. et al. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **J Immunol.**, v. 159, p. 777-785, 1997.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 4, p. 163-76, 2009.
- CANTORNA, M. T. et al. Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 239, n. 11, p. 1524-30, 2014.
- CANTORNA, M. T. et al. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. **J Nutr.**, v. 130: p. 2648-52, 2000.
- CANTORNA, M. T.; WADDELL, A. The vitamin D receptor turns off chronically activated T cells. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1317, p. 70-5, 2014.
- CARLIER, Y. et al. Evaluation of circulating antigens by a sandwichradioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni* infected African parturients and their newborn children. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 29 p. 74-81, 1980.
- CARVALHO, A. T.; MARTINS FILHO, A. O.; OLIVEIRA, R. C. **A resposta imune na forma crônica da Esquistossomose mansoni.** In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 701-716, 2008.
- CASEY, C. F.; SLAWSON, D. C.; NEAL, L. Vitamin D supplementation in infants, children and adolescents. **American Family Physician.** Mar; v. 81, n. 6, p. 745 -48, 2010.
- CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, v. 55, n. 8, 2011.
- CATARINO, A. M.; CLARO, C.; VIANA, I. Vitamina D – Perspetivas Atuais. **Revista SPDV** ; v. 74, n. 4, 2016.
- CELINO, A. C. et al. Camada de fibras nervosas da retina em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica: análise por tomografia de coerência óptica. **Rev. bras.ofthalmol.**, v. 74, n. 2, 2015.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Schistosomiasis.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>. Acesso: 21/11/2019.

- CHANG, J. H. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of TH17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. **PLoS One**, v. 5, 2010.
- CHEEVER, A. W. et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 753-759, 1994.
- CHEEVER, A. W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. 97, p. 917-940, 2002.
- CHEEVER, A. W. et al. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 85-97, 1987.
- CHEN, T. L. et al. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone on rat osteoblast-like primary cell cultures: receptor occupancy and functional expression patterns for three different bioresponses. **Endocrinology**, v. 118, p. 250-259, 1986.
- CHENSUE, S. W. et al. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis: Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cells in vivo. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 1.391-1.400, 1993.
- CHIANG, C. M. et al. Effects of Vitamin D Supplementation on Muscle Strength in Athletes: A Systematic Review. **J Strength Cond Res.**, v. 31, n. 2, p. 566-574, 2017.
- CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.
- CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. **Physiological**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2016.
- CIOLI D, P. L. Praziquantel. **Parasitol Res.**, v. 90, Supp 1, p. 3-9, 2003.
- CLARK, S. A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 target cells in immature pancreatic islets. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p. 99-105, 1987.
- CLARK, A.; MACH, N. Role of Vitamin D in the Hygiene Hypothesis: The Interplay between Vitamin D, Vitamin D Receptors, Gut Microbiota, and Immune Response. **Front Immunol.**, v. 23, n. 7, p. 627, 2016.
- CLEMENTE, J. C. et al. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1258-70, 2012.
- COHEN, J. P. et al. Progress Report on Neglected Tropical Disease Drug Donation Programs. **Clinical Therapeutics.**, v. 38, n. 5, p. 1193-1204, 2016.
- COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 36, p. 347-357, 2014.
- CONCEA – Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações . **Normativas do CONCEA: para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica.** 3ª ed. E-book. Brasília, 2016. Disponível em:

- https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/publicacoes_concea.html. Acesso em 15/12/2019.
- COUSSENS, A. K. et al. Vitamin D accelerates resolution of inflammatory responses during tuberculosis treatment. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 109, n. 38, p. 15449-54, 2012.
- COUSSENS, A. K. et al. High-dose vitamin D3 reduces deficiency caused by low UVB exposure and limits HIV-1 replication in urban Southern Africans. **PNAS**, v. 112, p. 8052–8057, 2015.
- COUTINHO, E. M. et al. Manson's schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 359–366, 2010.
- D. JIN, S. et al. Lack of vitamin D receptor causes dysbiosis and changes the functions of the murine intestinal microbiota. **Clin. Ther.**, v. 37, p. 996–1009, 2015.
- DA SILVA, V. B. R. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3259–3277, 2017.
- DALE, J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature methods**, v. 7, n. 6, 2010.
- DANIEL, C. et al. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 324, p. 23–33, 2008.
- DAVOODI, F. et al. Modulation of vitamin D receptor and estrogen receptor by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ in T-47D human breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 54, p.147–153, 1995.
- DE JESUS, A. R. et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 98-105, 2002.
- DE LYRA, E. C. et al. 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃ serum concentration and breast tissue expression of 1 α -hydroxylase, 24-hydroxylase and Vitamin D receptor in women with and without breast cancer. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 100, n. 4-5, p. 184-92, 2006.
- DE 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.
- DEEB, K. K.; TRUMP, D. L.; JOHNSON, C. S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 9, p. 684-700, 2007.
- DOBSON, R. et al. Vitamin D supplementation. **Pract Neurol.**, v. 18, n. 1, p. 35-42, 2018.
- DOSSING, D. A.; STERN, P. H. Receptor activator of NF-kappaB ligand protein expression in UMR-106 cells is differentially regulated by parathyroid hormone and calcitriol. **J Cell Biochem.**, v. 95, n. 5, p.1029-41, 2005.
- DUNNE, D. W. et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 1483-94, 1992.

- DUNNE, D. W.; PEARCE, E. J. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 553–560, 1999.
- DUSTIN, M. L. et al. Induction by IL-1 and interferon-gamma, tissue distribution, biochemistry and function of a natural adhesion molecule (ICAM-I). **Journal of Immunology**, v. 137, p. 245-254, 1986.
- ELLAM, T. et al. Vitamin D deficiency and exogenous vitamin D excess similarly increase diffuse atherosclerotic calcification in apolipoprotein E knockout mice. **PLoS One**, v. 9, n. 2, 2014.
- EL-HAJJ FULEIHAN, G. Vitamin D Deficiency in the Middle East and Its Health Consequences. **In Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications**. Holick, M.F., Ed.; Humana Press: New York, NY, USA, p. 469–494, 2010.
- ELINAV, E. et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 745-57, 2011.
- ES - ENDOCRINE SOCIETY – USA. **The Endocrine Society’s Practice Guidelines also recommended treatment strategies for patients with vitamin D deficiency (2012)**. Disponível em: <https://www.endocrine.org/clinical-practice-guidelines>. Acesso em 10/02/2020.
- ETHIER, C. et al. Calcitriol Reduces Eosinophil Necrosis Which Leads to the Diminished Release of Cytotoxic Granules. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 171, n. 2, p. 119-129, 2016.
- EYLES, D. W. et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. **J Chem Neuroanat.**, v. 29, p. 21–30, 2005.
- FAIBISH, D. et al. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. **Bone**, v. 36, p. 6-12, 2005.
- FALCÃO, P. L. et al. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. **Parasit Immunol.**, v. 20, p. 447-454, 1998.
- FAUST, E. C.; JONES, C. A.; HOFFMAN, W. A. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III Biological studies, 2 – The mammalian phase of the life-cycle. **Puerto Rico J Pub Health & Trop Med.**, v. 10, p. 133-196, 1934.
- FAVEEUW, C. et al. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to Schistosoma mansoni glycoconjugates in mice. **J Immunol.**, v. 169, p. 906–12, 2002.
- FERNANDES, J. S. et al. Monocytesubsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Mediators Inflamm.**, n. 703653, 2014.
- FERRARI, T. C. A.; DRUMMOND, S.; REIS, M. G. **Neuroesquistossomose**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 807-820, 2008.
- FILHO, A. et al. Neuroesquistossomose mansônica. **Arq neuropsiquiatria**, v. 54, n. 2, p. 232-237, 1996.

FIORE, M. et al. *Schistosoma mansoni*: influence of infection on mouse behavior. **Exp Parasitol.**, v. 83, n. 1, p. 46-54, 1996.

FITZSIMMONS, C. M. et al. Progressive cross-reactivity in IgE responses: an explanation for the slow development of human immunity to schistosomiasis? **Infect. Immun.**, v. 80, p. 4264–4270, 2012.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 330-6, 2003.

FRANCINO, M. P. Early development of the gut microbiota and immune health. **Pathogens**, v.4, p.769–90, 2014.

FRASER, D. R.; KODICEK, E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite. **Nature** v. 288, p. 764, 1970.

FREZZA, T.F. et al. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.2, p. 209-214, 2007.

GARG, M. et al. The Effect of Vitamin D on Intestinal Inflammation and Faecal Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis. **J Crohns Colitis**. v. 12, n. 8, p. 963-972, 2018.

GARG, M. et al. Evaluation of a 12-week targeted vitamin D supplementation regimen in patients with active inflammatory bowel disease. **Clin Nutr.**, v. 37, n. 4, p. 1375-1382, 2018.

GLOBAL HEALTH DATA, 2016. **Dados sobre DALYs**. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>. Acesso em: 18/02/20.

GOMINAK, S. C. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a "pro-inflammatory" state associated with atherosclerosis and autoimmunity. **Med Hypotheses**, v. 94, p.103-7, 2016.

GONÇALVES, J. L. et al. **Bases do Sistema Imunológico associado à mucosa intestinal**. In: Oriá, RB, Brito, GAC. Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica. [online]. São Paulo: Editora Edgard Blucher, p. 370-388, 2016.

GRAY, R.; BOYLE, I.; DELUCA, H. F. Vitamin D metabolism: the role of kidney tissue. **Science**, v. 172, p. 1232, 1971.

GRENCIS, R. K.; HUMPHREYS, N. E.; BANCROFT, A. J. Immunity to gastrointestinal nematodes: mechanisms and myths. **Immunol Rev.**, v. 260, n. 1, p. 183–205, 2014.

GRIFFIN, M. D. et al. Dendritic cell modulation by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 98, p. 6800–5, 2001.

GURY-BENARI, M. et al. The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1231-1246, 2016.

- HAAS, W. et al. Schistosoma mansoni cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. **J Parasitol.**, v. 83, p. 1079-1085, 1997.
- HAAS, W. et al. Recognition and invasion of human skin by Schistosoma mansoni cercariae: the key-role of L-arginine. **Parasitology**, v.124, p. 153-167, 2002.
- HAUSSLER, M. R. et al. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 : genomic and non-genomic mechanisms. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, v. 25, n. 4, p. 543-59, 2011.
- HAUSSLER, M. R. et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. **Calcified Tissue International**, v. 92, n. 2, p. 77–98, 2013.
- HART, P. H.; GORMAN, S.; FINLAY-JONES J. J. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? **Nat Rev Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 584-96, 2011.
- HARRISON, J. R. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 Inhibits Transcription of Type I Collagen Genes in the Rat Osteosarcoma Cell Line ROS 17/2.8. **Endocrinology**, v. 125, n. 1, p. 327–333, 1989.
- HE, X. et al. MicroRNA-351 promotes schistosomiasis-induced hepatic fibrosis by targeting the vitamin D receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 115, n. 1, p.180-185, 2018.
- HEANEY, R. P. et al. Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. **Am J Clin Nutr.**, v. 77, p. 204-10, 2003.
- HEINE, G.; BEATE, M. H.; MARGITTA, W. Vitamin D_3 (VD) and retinoic acid (RA) inhibit IgE production in vitro from normal and atopic donors. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 109, n. 1, suppl. 1, p. 114, 2002.
- HERRERA, G. Vitamin D in massive doses as an adjuvant to the sulfones in the treatment of tuberculoid leprosy. **Int. J. Lepr.**, v. 17, p. 35–42,1949.
- HEWISON, M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v. 39, n. 2, p. 365-79, 2010.
- HILGER, J. et al. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. **Br J Nutr.**, v. 111, n. 1, p. 23-45, 2014.
- HIRAGUCHI, Y. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 upregulates functional C-x-C chemokine receptor type 4 expression in human eosinophils. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 158, Suppl. 1, p. 51-7, 2012.
- HODGKINSON, A. J. et al. Effect of the dietary delivery matrix on vitamin D_3 bioavailability and bone mineralisation in vitamin- D_3 -deficient growing male rats. **Br J Nutr.**, v. 119, n. 2, p. 143-152, 2018.
- 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. **J Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6406-16, 2000.

HOLICK, M. F. et al. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D₃ in skin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 76, n. 1, p. 107–114, 1977.

HOLICK, M. F. The vitamin D epidemic and its health consequences. **J Nutr.**, v. 135, n. 11, p. 2739-48, 2005.

HOLICK, M. F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr.**, v. 80, suppl. 6, p.1678-1688, 2004.

HOLICK, M. F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutr Rev.**, v. 66, suppl. 2, p. 182-94, 2008.

HOLICK, M. F. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. **Am J Clin Nutr.**, v. 79, n. 3, p. 362-71, 2004.

HOLICK, M. F. Vitamin D: a millennium perspective. **J Cell Biochem.**, v. 88, p. 296–307, 2003.

HOLICK, M. F. **Evolution, biologic function, and recommended dietary allowances for vitamin D.** In: Vitamin D: Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications. Totowa: Humana Press, v. 30, p. 1-16, 1999.

HOLLICK, M. F. Vitamin D: A Millenium Perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, p. 296-307, 2003.

HOLICK, M. F. **Vitamin D.** Em: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. Modern nutrition in health and Disease. 19. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 329-45, 1999.

HOLICK, M. F. **Vitamin D: Photobiology, metabolism, and clinical applications.** In: de Groot LC, ed. Endocrinology, p. 990-1011, 1995.

HOLICK, M. F. Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and clinical applications. **Bone**, v. 17, Supl.2, p. 107-11, 1995.

HOLICK, M. F. et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, p. 1153–1158, 2012.

HOLICK, M. F. Sunlight, ultraviolet radiation, vitamin D and skin cancer: how much sunlight do we need? **Adv Exp Med Biol.**, v. 810, p. 1-16, 2014.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency. **N Engl J Med.**, v. 357, p. 266–81, 2007.

HOLICK, M. F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Rev Endocr Metab Disord.**, v.18, n. 2, p. 153-165, 2017.

HOENDEROP, J. G.; NILIUS, B.; BINDELS, R. J. Calcium absorption across epithelia. **Physiol Rev.**, v. 85, p. 373-422, 2005.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; SPIRA, A.; HOLICK, M. F. Influence of vitamin D status and vitamin D3 supplementation on genome wide expression of white blood cells: a randomized double-blind clinical trial. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

HUGGINS, D. W. et al. Evolução clínica. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al. (editores). **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, p. 56-74, 1998.

INGRAM, R. J. et al. Penetration of human skin by the cercariae of *Schistosoma mansoni*: an investigation of the effect of multiple cercarial applications. **J. Helminthol.**, v. 77, p. 27 – 31, 2003.

IOM - INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. **Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. Catharine Ross, A.; Taylor, C. L., Yaktine, A. L., Eds.; The National Academy of Sciences: Washington, DC, USA, 2011.

JAMES, J.; WEAVER, V.; CANTORNA, M. T. Control of Circulating IgE by the Vitamin D Receptor In Vivo Involves B Cell Intrinsic and Extrinsic Mechanisms. **J Immunol.**, v. 198, n. 3, p. 1164-1171, 2017.

JAURÉGUIBERRY, S.; Paris, L.; Caumes, E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clin Microbiol Infect.**, v. 16, n. 3, p. 225-31, 2010.

JEFFERY, L. E. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. **J Immunol.**, v. 183, p. 5458–67, 2009.

JENKINS, T. P. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota. **Sci Rep.** v. 8, n. 1, 2018.

JONES, G.; SCHNOES, H. K.; DELUCA, H. F. Isolation and identification of 1,25-dihydroxyvitamin D2. **Biochemistry**, v. 14, n. 6, p. 1250–1256, 1975.

JONES, G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 88, p. 582–586, 2008.

JOSEPH, S. et al. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and wormtegument antigens are induced by treatment with praziquantel. **J Infect Dis.** v. 190, n. 4, p. 835-42, 2004.

JOSHI, S. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. **Mol. Cell. Biol.**, v. 31, p. 3653–3669, 2011.

KAËGI, L. et al. Regulation of vitamin D metabolizing enzymes in murine renal and extrarenal tissues by dietary phosphate, FGF23, and 1,25(OH)2D3. **PLoS One**, v. 13, n. 5, 2018.

KAWAMOTO, S. et al. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. **Immunity.**, v. 41, p. 152–165, 2014.

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

- KAY, et al. The PLOS Neglected Tropical Diseases Staff . Differences in the Faecal Microbiome in Schistosoma haematobium Infected Children vs. Uninfected Children. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, 2015.
- KIM, E. W. et al. Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against Mycobacterium leprae. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, n. 7, 2018.
- KHOO, A. L. et al. Vitamin D(3) down-regulates proinflammatory cytokine response to Mycobacterium tuberculosis through pattern recognition receptors while inducing protective cathelicidin production. **Cytokine**, v. 55, n. 2, p. 294-300, 2011.
- KHUNDMIRI, S. J.; MURRAY, R. D.; LEDERER, E. PTH and Vitamin D. **Compr Physiol.**, v. 6, n. 2, p. 561- 601, 2016.
- KUNDU, R. et al. Regulation of CYP27B1 and CYP24A hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells. **Eur. J. immunol.**, v. 44, n. 6, 1781-1790, 2014.
- LAMBERTUCCI, J. R. et al. Esquistossomose aguda: relato de cinco casos singulares. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 631-635, 1997.
- LAMBERTUCCI, J. R. et al. A esquistossomose in Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 20, p. 47-52, 1987.
- LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. **Esquistossomose Mansônica**. In: Coura, JR, (editor). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 931-46, 2005.
- LAPCHIK, V. B. V. et al. **Cuidados e Manejo de Animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 137-167, p.399-430, p. 549-561, 2010.
- LAZAR, V. et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. **Front Immunol.**, v. 9, n. 1830, 2018.
- LE MELLAY, V.; GROSSE, B.; LIEBERHERR, M. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 18, p. 11902-7, 1997.
- LEMIRE, J. M.; ARCHER, D. C. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Clin Invest.**, v. 87, p.1103–7, 1991.
- LEMIRE, J. M. et al. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. **J Clin Invest.**, v. 74, p. 657-61, 1984.
- LEMIRE, J. M. et al. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. **J Nutr.**, v.125, p. 1704–1708, 1995.
- LENZI, H. L. et al. Histoarchitecture of schistosomal granulomas development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; v. 93, supl. 1, p. 41-51, 1998.
- LENZI, H. L. et al. **Migração e desenvolvimento do Schistosoma mansoni no hospedeiro definitivo**. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi H. Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.85, 2008.

- LEVENTIS, P.; PATEL, S. Clinical aspects of vitamin D in the management of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 47, p. 1617-21, 2008.
- LEWIS, F. A.; TUCKER, M. S. **Schistosomiasis**. In: TOLEDO, R.; FRIED, B. (Eds.) *Digenetic Trematodes*. New York. Editora: Springer, p. 47-75, 2014.
- LI, Y. C. et al. Targeted ablation of the vitamin D receptor: An animal model of vitamin D-deficient rickets type II with alopecia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 9831– 9835, 1997.
- LI, Y. C. et al. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v.1-5, p. 89-90 , p. 387-92, 2008.
- LIANG, Y. S et al. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **J Helminthol.**, v. 84, n. 2, p. 202-7, 2010.
- LIU, P. T. et al. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. **J Immunol.**, v. 179, n. 4, p. 2060-3, 2007.
- LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther.**, v. 2, n. 17023, 2017.
- LOKE, P.; LIM, Y. A. Helminths and the microbiota: parts of the hygiene hypothesis. **Parasite Immunol.** , v. 37, n. 6, p. 314-23, 2015.
- LU, H. et al. Vitamin D-deficiency induces eosinophil spontaneous activation. **Cellular Immunology**, v. 322, n. 10, 2017.
- LUKACS, N. W. et al. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha inducible intercellular adhesion molecule-I. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 5.883-5.889, 1994.
- LUNA DE SAMPAIO, Vitor. **Perfil Oftalmológico Em Pacientes Com Esquistossomose Mansônica Na Cidade De Timbauba**. Dissertação apresentada na Universidade Federal de Pernambuco, 2005.
- MACIA, L. et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. **Nat Commun.**, v. 6, n. 6734, 2015.
- MCLAUGHLIN, L. et al. Vitamin D for the treatment of multiple sclerosis: a meta-analysis. **J Neurol.**, v. 265, n. 12, p. 2893-2905, 2018.
- MAEDA, S. S. et al. The effect of sun exposure on 25-hydroxyvitamin D concentrations in young healthy subjects living in the city of Sao Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1653–1659, 2007.
- MAIZELS, R. M. et al. Helminth parasites--masters of regulation. **Immunol Rev.**, v. 201, p. 89–116, 2004.
- MALAGUARNERA, L. Vitamin D and microbiota: Two sides of the same coin in the immunomodulatory aspects. **Int Immunopharmacol.**, v. 79, n. 106112, 2019.

- MALAQUIAS, L. C. et al. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand J Immunol.**, v. 46, p. 393-398, 1997.
- MALTA, J. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, p. 387, 1994.
- MANTIS, N. J.; ROL, N.; Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. **Mucosal Immunol.**, v. 4, n. 6, p. 603–11, 2011.
- MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 1, 2010.
- MARTIN, N. G. et al. Single high-dose oral vitamin D3 treatment in New Zealand children with inflammatory bowel disease. **Transl Pediatr.**, v. 8, n. 1, p. 35-41, 2019.
- MARTINEAU, A. R. et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 176, n. 2, p. 208-213, 2007.
- MARWAHA, R. K. et al. Vitamin D and bone mineral density status of healthy schoolchildren in northern India. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 82, p. 477–482, 2005.
- MASSHEIMER, V.; BOLAND, R.; DE BOLAND, A. R. Rapid 1,25(OH)₂-vitamin D3 stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridine-sensitive cAMP-dependent pathway. **Cell Signal.**, v. 6, n. 3, p. 299-304, 1994.
- MATHIEU, C. et al. In vitro and in vivo analysis of the immune system of vitamin D receptor knockout mice. **J Bone Miner Res.**, v. 16, p. 2057–2065, 2001.
- MATHIEU, C. Vitamin D and the immune system: Getting it right. **IBMS BoneKey**, v. 8, n. 4, p. 178–186, 2011.
- MATSUO, K. et al. Prevalence and risk factors of vitamin D deficiency rickets in Hokkaido, Japan. **Pediatr Int.**, v. 51, n. 4, p. 559-62, 2009.
- MBOW, M. et al. T - Helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 207, p. 186-195, 2008.
- McGUICKIN, M. A. et al. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nat Rev Microbiol.**, v. 9, p. 265–278, 2011.
- McLAUGHLIN, L. et al. Vitamin D for the treatment of multiple sclerosis: a meta-analysis. **J Neurol.**, v. 265, n. 12, p. 2893-2905, 2018.
- McMANUS, D. P. et al. Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, n. 13, 2018.
- MESSERLI, S. M. et al. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 167, p. 54–59, 2009.
- MILLER, W. L.; PORTALLE, A. A. Genetics disorders of vitamin D biosynthesis. **Pediatr Endocrinol.**, v. 28, n. 4, p. 825-40, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. **Esquistossomose**. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acesso em 15/09/2018.

_____. **Vigilância da Esquistossomose mansoni - Diretrizes técnicas**. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf. Acesso em 20/11/2019.

_____. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: Dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose**. Caderno 21. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008.

MIZWICKI, M. T.; NORMAN, A. W. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. **SciSignal.**, v.2, n. 75, 2009.

MOK, C. C. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: an update. **Expert Rev Clin Immunol.**, v. 5, p. 453-463, 2013.

MONTENEGRO, S. M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the crossregulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 1502–1514, 1999.

MÜLLER, K. et al. The role of monocytes and T cells in 1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated inhibition of B cell function in vitro. **Immunopharmacology**, v. 2, p. 121-128, 1991.

MWATHA, J. K. et al. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol.**, v. 160, n. 4, p. 1992-1999, 1998.

NAJA, R. P. et al. Chondrocyte-specific modulation of Cyp27b1 expression supports a role for local synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in growth plate development. **Endocrinology**, v. 150, n. 9, p. 4024-4032, 2009.

NEVES, J.; MARTINS, N. R.; Tonelli, E. Forma toxêmica da esquistossomose mansônica. Considerações diagnósticas em torno de 50 casos identificados em Belo Horizonte. **O Hospital**, v. 70, p. 1583-1603, 1966.

NEVEU, I. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. **Mol Brain Res.**, v. 24, p. 70–76, 1994.

NORMAN, A. W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr.**, v. 88, n. 2, p. 491S-499S, 2008.

OLIVEIRA-SEDIYAMA, C. M. et al. Lifestyle and vitamin D dosage in women with breast cancer. **Nutr Hosp.**, v. 33, n. 5, p. 584, 2016.

OLSEN, A. et al. Effects of multimicronutrient supplementation on helminth reinfection: a randomized, controlled trial in Kenyan schoolchildren. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 97, p. 109–114, 2003.

OOI, J. H.; CHEN, J.; CANTORNA, M. T. Vitamin D regulation of immune function in the gut: why do T cells have vitamin D receptors? **Mol Aspects Med.**, v. 33, n. 1, p. 77-82, 2012.

OPAS. **Relatório Quinquenal 2013-2017 do Diretor da Repartição Sanitária Pan-Americana**, 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/annual-report-2017/Portugues.html>. Acesso em: 10/01/2020.

OMS. **Trabalhando para superar o impacto global das doenças tropicais negligenciadas: Primeiro Relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas**, 2010. Organização Mundial da Saúde, Genebra.

OMS. **Esquistossomose**, 2016. Disponível <http://www.who.int/schistosomiasis/en> Acesso em 05/09/2019.

ONAL, H. et al. Is daily 400ge IU of vitamin D supplementation appropriate for every country: a cross-sectional study. **Eur J Nutr.**, v. 49, n. 7, p. 395-400, 2010.

PALACIOS, C.; GONZALEZ, L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 144, p. 138-45, 2014.

PALMER, M. T. et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the development of effector CD4 T cells. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 997–1004, 2011.

PAVELEY, R. A. et al. Fluorescent imaging of antigen released by a skin-invading helminth reveals differential uptake and activation profiles by antigen presenting cells. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 3, p. 528, 2009.

PEEHL, D. M. et al. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on primary cultures of human prostatic cells. **Cancer Res.**, v. 54, n 3, p. 805–810, 1994.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, p. 499-511, 2002.

PEILING, Y. et al. Influence of nutrition on infection and re-infection with soil-transmitted helminths: a systematic. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 229, 2014.

PELLEGRINO, J.; COELHO, P. M. Z. Schistosoma mansoni, wandering capacity of a worm couple. **JParasitol.**, v. 64, p. 181, 1978.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de Schistosoma mansoni em cobaias experimentalmente infectadas. **Rev. bras. Malar.**, v. 8, p. 589-97, 1956.

PENNA, G. et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Blood**, v. 106, p. 3490–3497, 2005.

PIEMONTE, L. et al. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol.**, v. 164, p. 4443–4451, 2000.

PINOT DE MOIRA, A. et al. Microgeographical and tribal variations in water contact and Schistosoma mansoni exposure within a Ugandan fishing community. **Trop Med Int Health**, v. 6, p. 724-735, 2007.

PINTO, W. B. V. R. Fenômeno de barbering: novos conceitos sobre um antigo problema. **RESBCAL**, v. 1, n. 3, p. 279-285, 2012.

- PRATA, A.; BINA, J. C. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (A study of 20 patients observed during a 5 years period). **Gaz. Med.**, 1968.
- PRATA, A. R.; COURA, Jr. **Fases e formas clínicas da esquistossomose mansoni**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 739-787, 2008.
- PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arq Bras Endocrinol Metab** [online]., v. 50, n. 1, p. 25-37, 2005. Acesso em: 10/01/2020.
- PRENTICE, A. Vitamin D deficiency: A global perspective. **Nutr. Rev.**, v. 66, p. 153–164, 2008.
- PRENTICE, A. et al. Vitamin D deficiency and its health consequences in Africa. **Clin. Rev. Bone Miner. Metab.**, v. 7, p. 94–106, 2009.
- PROSSER DE, J. G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. **Trends Biochem Sci.**, v. 29, p. 664-673, 2004.
- PROVVEDINI, D. M. et al. Manolagas. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. **Science**, v. 221, p. 1181–1183, 1983.
- QURASHI, S. A. et al. Effect of cholecalciferol supplementation on vitamin D status and cathelicidin levels in sepsis: A randomized, placebo-controlled trial. **Crit. Care Med.**, v. 43, p. 1928–1937, 2015.
- RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 277–280, 1995.
- RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. **Cell.**, v. 118, n. 2, p. 229-41, 2004.
- RAMOS-MARTÍNEZ, E.; GUTIERREZ-KOBEH, L.; VILLASEÑOR-CARDOSO, M. I. The role of vitamin D in the control of Leishmania infection. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 93, n. 5, p. 369-76, 2015.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.
- REILLY, L. et al. Association between Micronutrients (Vitamin A, D, Iron) and Schistosome-Specific Cytokine Responses in Zimbabweans Exposed to *Schistosoma haematobium*. **J Parasitol Res.**, v. 128628, 2012.
- REMIGIO, M. C. A. et al. Histological and histomorphometric evaluation of the retina of mice infected with *Schistosoma mansoni* in its hepatosplenic form. **Acta Cir. Bras.**, v. 24, n. 6, p. 502-506, 2009.
- RICH-EDWARDS, J.W. et al. Randomized trial of fortified milk and supplements to raise 25-hydroxyvitamin D concentrations in schoolchildren in Mongolia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 94, p. 578–584, 2011.

- RIGBY, W. F.; STACY, T.; FANGER, M. W. Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). **J Clin Invest.**, v. 74, p. 1451–1455, 1984.
- RIGBY, W. F. S. D.; FANGER, M. W. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Specific inhibition at the level of messenger RNA. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 1659–1664, 1987.
- ROFFE-VAZQUEZ, D. N. et al. Correlation of Vitamin D with Inflammatory Cytokines, Atherosclerotic Parameters, and Lifestyle Factors in the Setting of Heart Failure: A 12-Month Follow-Up Study. **Int J Mol Sci.**, v. 20, p. 22, 2019.
- ROCKELL, J. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of New Zealanders aged 15 years and older. **Osteoporos.**, v. 17, p. 1382–1389, 2006.
- RODRIGUEZ-CORTES, A. et al. Canine Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. **Sci Rep.**, v. 7, n. 1, p. 3346, 2017.
- ROMEU, M. K. et al. Effects of vitamin D on primary human skeletal muscle cell proliferation, differentiation, protein synthesis and bioenergetics. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 193. 105423, 2019.
- RUTITZKY, L.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J. **Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 6;98(23):13243-8.
- RUTITZKY, L.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 327-330, 2006.
- SACHAN, A. et al. High prevalence of vitamin D deficiency among pregnant women and their newborns in northern India. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 1060–1064, 2005.
- SAH, V. K. et al. Human schistosomiasis: A diagnostic imaging focused review of a neglected disease. **Radiology of Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p.150-157, 2015.
- SALOMÃO, M. R. **Alterações coriorretinianas em indivíduos de área hiperendêmica de esquistossomose.** Tese. Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.
- SANCHEZ, B. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. **J Neurosci Res.**, v. 87, p. 723–732, 2009.
- SASSI, F.; TAMONE, C.; D'AMELIO, P. Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. **Nutrients**, v. 10, p. 11, 2018.
- SCHLINGMANN, K. P. et al. Mutations in CYP24A1 and Idiopathic Infantile Hypercalcemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, p. 410–421, 2011.
- SCHUCH, N. J.; GARCIA, V. C.; LIGIA, A. M. Vitamina D e doenças endocrinometabólicas. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n. 5, 2009.
- SEDRANI, S. H. Low 25-hydroxyvitamin D and normal serum calcium concentrations in Saudi Arabia: Riyadh region. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 28, p. 181–185, 1984.

SHANAHAN, F. Physiological basis for novel drug therapies to treat the inflammatory bowel diseases: I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, p. 417–421, 2005.

SHAYGANNEJAD, V. et al. Vitamin D Intake, Serum Vitamin D Level, and Immunoglobulin G Level in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. **Int J Prev Med.**, v. 14, n. 9, p. 68, 2018.

SHER, A. et al. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proceedings National Academic Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 61-65, 1990.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol.**, v. 11, n. 11, p. 762-74, 2011.

SHIMADA, T. et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. **J Bone Miner Res.**, v. 19, n. 3, p. 429-35, 2004.

SIGMON, J. R.; Yentzer, B. A.; Feldman, S. R. Calcitriol ointment: a review of a topical vitamin D analog for psoriasis. **J Dermatolog Treat**, v. 20, p. 208-212, 2009.

SIMPSON, R. U.; Hershey, S. H.; Nibbelink, K. A. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 103, n.3-5, p. 521-524, 2007.

SINA, G. et al. Physiology, Nutrition and Metabolism. **Vitamin D supplementation of Canadian infants: practices of Montreal mothers**, v. 35, n. 3, p. 303-309, 2010.

SILVA, A.; SANTANA, L. B.; JESUS, A. R. **A resposta imune na forma aguda da Esquistossomose mansoni**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 687-700, 2008,

SNELLMAN, G. et al. Determining vitamin D status: a comparison between commercially available assays. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p.11555 , 2010.

SNYMAN, J. R. et al. Effects of calcitriol on eosinophil activity and antibody responses in patients with schistosomiasis. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 52, n. 4, p. 277-280, 1997.

SOUSA, J. R. et al. Efeito da suplementação com vitamina D em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 57, n. 5, p. 466-471, 2017.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de Interesse Parasitológico do Brasil**. Série Esquistossomose. 2ª ed., Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 1997.

SOUZA, R. P. et al. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

SRINIVAS, S.; FELDMAN, D. A phase II trial of calcitriol and naproxen in recurrent prostate cancer. **Anticancer Res.**, v. 29, p.3605–10, 2009 .

- STADECKER, M. J. et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 499-511, 2004.
- STAVNEZER, J. Immunoglobulin class switching. **Curr Opin Immunol.**, v. 8, n. 2, p. 199-205, 1996.
- STERLING, K. A. et al. The immunoregulatory function of vitamin D: implications in chronic kidney disease. **Nat Rev Nephrol.**, v. 22, n. 8, p. 403-412, 2012.
- STUMPF, W. E. et al. Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. **Science**, v. 206, n. 4423, p. 1188–1190, 1979.
- STUMPF, W. E. Vitamin D and the digestive system. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 33, n. 2, p. 85-100, 2008.
- SU, D. et al. Vitamin D signaling through induction of Paneth cells defensins maintains gut microbiota and improves metabolic disorders and steatosis in animal models. **Front. Physiol.**, v. 7, n. 498, 2016.
- SUDA, T.; DELUCA, H. F.; TANAKA, Y. Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats. **J Nutr.**, v. 100, p. 1049– 1052, 1970.
- SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation. **Endocr Rev.**, v. 13, p. 66–80, 1992.
- SUDA, T. et al. Vitamin D and bone. **J Cell Biochem**, v. 88, p. 259–266, 2003.
- SUTHERLAND, D. B.; SUZUKI, K.; FAGARASAN, S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. **Immunol Rev.**, v. 270, p. 20–31, 2016.
- TAHER, Y. A. et al. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates the beneficial effects of allergen immunotherapy in a mouse model of allergic asthma: role for IL-10 and TGF-beta. **J Immunol.**, v. 180, n. 5211–21, 2008.
- TAKAHASHI, N. et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. **Endocrinology**, v. 123, p. 2600–2602, 1988.
- TAYLOR, A. B.; STERN, P. H.; BELL, N. H. Abnormal regulation of circulating 25-hydroxyvitamin D in the Williams syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 306, p. 972–975, 1982.
- THAISS, C. A. et al. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host. Transcriptome Oscillations. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1495-1510, 2016.
- TLAMÇAMI, Z.; ER-RAMI, E. Schistosomiasis control: moroccan experience compared to other endemic countries. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 4, p. 329-332, 2014.
- TUCKER, M. S. et al. Determination and quantification of *Schistosoma mansoni* cercarial emergence from *Biomphalaria glabrata* snails. **J Parasitol.**, v. 100, n. 6, p. 778-83, 2014.
- VALADARES, T. E. et al. *Schistosoma mansoni*: Aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 23, n. 1, p. 6–11, 1981.

V. LAGISHETTY, A. V. et al. Vitamin D deficiency in mice impairs colonic antibacterial activity and predisposes to colitis. **Endocrinology**, v. 151, p. 2423–2432, 2010.

VAN DER AAR, A. M. et al. Vitamin D₃ targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 127, p. 1532–1540, 2011.

VAN DER MEI, I. A. et al. The high prevalence of vitamin D insufficiency across Australian populations is only partly explained by season and latitude. **Environ. Health Perspect.**, v. 115, p. 1132–1139, 2007.

VELDMAN, C. M.; CANTORNA, M. T.; DELUCA, H. F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 374, p. 334–338, 2000.

VERHAVE, G.; SIEGERT, C. E. Role of vitamin D in cardiovascular disease. **Neth JMed.**, v. 68, n. 3, p. 113-118, 2010.

VIETH, R.; CHAN, P. C.; MACFARLANE, G. D. Efficacy and safety of vitamin D₃ intake exceeding the lowest observed adverse effect level. **Am J Clin Nutr.**, v. 73, p. 288-94, 2001.

VISSER, M.; DEEG, D. J.; LIPS, P. Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study. **Amsterdam. J Clin Endocrinol Metab.**, v. 88, p. 5766-5772, 2003.

VOGESER, M. Quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v. 121, p. 565-573, 2010.

WACKER, M.; HOLICK, M. F. Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. **Dermatoendocrinol**, v. 5, n. 1, p. 51-108, 2013.

WANG, T. T. et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D₃ target genes. **Mol Endocrinol.**, v. 19, p. 2685-2695, 2005.

WANG, T. T. et al. Direct and indirect induction by 1,25 – dihydroxvitamin D₃ of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 4, p. 2227-2231, 2010.

WANG, T. T. et al. Cutting Edge: 1,25- Dihydroxyvitamin D₃ Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. **J Immunol.**, v. 173, p. 2909–2912, 2004.

WEINSTOCK, J. V. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the Schistosoma ova and the host. **Immunology Investigation**, v. 21, p. 455-475, 1992.

WEINSTOCK, J. V.; BLUM, A. M. Modulation of granulomatous inflammation in murine Schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosome ova: in vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cellular Immunology**, v. 108, p. 452-459, 1987.

WHITE, J. H. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. **Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 13, p. 21–29, 2012.

WHITING, S. J.; LANGLOIS, K. A.; Vatanparast, H.; Greene-Finestone, L.S. The vitamin D status of Canadians relative to the 2011 Dietary Reference Intakes: An examination in children and adults with and without supplement use. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 94, p. 128–135, 2011.

WHO. World Health Organization: **Schistosomiasis**. https://www.who.int/schistosomiasis/Schistosomiasis_2012-01.png?ua=1, 2014. Acesso em : 18/02/2020.

WITSCHI, A. K. et al. Effect of source and quantity of dietary vitamin D in maternal and creep diets on bone metabolism and growth in piglets. **J Anim Sci.**, v. 89, n. 6, p. 1844–1852, 2011.

WILLIAM, S. et al. Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1093–1100, 2001.

WILLIAMSOM, L. et al. High doses dietary vitamin D increases bone mass and strength in mice. **Bone Reports**, v. 6, p.44-50, 2017.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 85, p. 148–154, 2007.

WIESE, R. J. et al. Up-regulation of the vitamin D receptor in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ results from ligand-induced stabilization. **J Biol Chem.**, v. 267, p. 20082–20086, 1992.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr Opin Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995.

XIE, Z. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ -induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. **Immunology**, v. 152, p. 414–424, 2018.

YAMASHITA, T.; BOROS, D. L. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, v. 149, p. 3.659-3.665, 1992.

YANG, Y. et al. Effect of different doses of vitamin D supplementation on preterm infants - an updated meta-analysis. **J Matern Fetal Neonatal Med.**, v. 5, p. 1-10, 2017.

YOSHIZAWA, T. et al. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia, and growth retardation after weaning. **Nat Genet.**, v. 16, p. 391–396, 1997.

YUMOL, J. L. et al. Bone development in growing female mice fed calcium and vitamin D at lower levels than is present in the AIN-93G reference diet. **Bone Rep.**, v. 19, n. 8, p. 229-238, 2018.

ZAHRAN, A. M.; ZHARAN, K. M.; HETTA, H. F. Significant correlation between regulatory T cells and vitamin D status in term and preterm labor. **J Reprod Immunol.**, v. 129, p. 15-22, 2018.

ZANINELLI, D. **Vitamina D tem novos valores de referência**, 2017. Disponível em: <https://pebmed.com.br/vitamina-d-tem-novos-valores-de-referencia/>. Acesso em 16/12/2019.

ZHANG, R.; DUCY, P.; KARSENTY, G. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits osteocalcin expression in mouse through an indirect mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 110–116 10, 1997.

ZHANG, Y. et al. Lack of IL-17 signaling decreases liver fibrosis in murine schistosomiasis japonica. **Int Immunol.**, v. 27, n. 7, p. 317-325, 2015.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, p. 412-20, 1993.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, pesos corporal e das vísceras. **Revista de Saúde Pública**, v. 29, n. 4, p. 265-70, 1995.

ZELLA, L. A. et al. Enhancers located within two introns of the vitamin D receptor gene mediate transcriptional autoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Mol Endocrinol.**, v. 20, n. 6, p.1231±47, 2006.

Atividades Paralelas

Extração de DNA contido nas fezes

O isolamento do DNA de amostras de fezes foi obtido por meio da extração do material genético com o Kit MO BIO's PowerSoil DNA Isolation (Quiagen), seguindo as normas do fabricante. Resumidamente, as amostras foram depositadas em tubos contendo 60 µl do reagente C1 sendo agitadas levemente por 10 min. Em seguida foram adicionados aos tubos 250 µl da solução C2 e novamente agitadas no vórtex por 5 segundos e incubadas a 4 ° C por 5 minutos. Centrifugamos os tubos em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 xg e em seguida transferimos o sobrenadante para outro tubo, descartando o pellet. Foram acrescentados 200 µl da solução C3 e levadas ao vórtex brevemente. Incubar a 4 ° C por 5 minutos. Centrifugamos os tubos em temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 x g, descartamos o pellet e coletamos o sobrenadante em que adicionamos 1200 µl a solução C4 e vortex por 5 segundos. Dispensamos no tubo com filtro aproximadamente 600 µl desse sobrenadante e centrifugamos novamente a 10.000xg por 1 minuto em temperatura ambiente. Repetimos esse passo novamente com o restante do sobrenadante. Descartamos o líquido e adicionamos 500 µl da solução C5 e centrifugamos 2x à temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 x g. Descartamos o líquido e colocamos cuidadosamente o filtro rotativo em um tubo de coleta de 2 ml limpo. Em seguida, acrescentamos 40 µl da solução C6 ao centro da membrana branca do filtro e centrifugamos 2x à temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 x g. Descartamos o filtro e no tubo encontrou-se o DNA. Esse DNA extraído foi dosado no Nanodrop, sendo posteriormente armazenado a -20°C.

ANEXOS

Licença CEUA – LW18/18



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice- Presidência de Pesquisa e
Coleções BiológicasComissão de É
no Uso de Ani

LICENÇA

LW-18/18

Certificamos que o protocolo (P-5/18-3), intitulado "O Efeito da Vitamina D na Infecção Experimental pelo Schistosoma mansoni e na Eficácia do Tratamento com doses subcurativas de Praziquantel em Modelo Murino", sob a responsabilidade de CRISTINA TOSCANO FONSECA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 26/11/2022 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 216 Fêmeas de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s).

Rio de Janeiro, 26 de novembro de :

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
26/11/2018