

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DE SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ISADORA BONFANTE

**Potencial imunoterapêutico da proteína SmCyp do *Schistosoma mansoni*
via polarização de macrófagos**

São Carlos - SP

2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DE SAÚDE
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ISADORA BONFANTE

**Potencial imunoterapêutico da proteína SmCyp do *Schistosoma mansoni*
via polarização de macrófagos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal de
São Carlos (UFSCar) como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Cynthia Aparecida de Castro

São Carlos - SP

2025

RESUMO

O estudo da interação parasito-hospedeiro, como entre *Schistosoma mansoni* e o homem, é fundamental para o desenvolvimento de imunoterapias que visem amenizar a gravidade de infecções crônicas associadas à obesidade, como o diabetes tipo 2, ou para o estímulo do sistema imune em doenças autoimunes e câncer, bem como para busca de novas vacinas. Um dos mecanismos de evasão dos sistemas imunológico característico da infecção do *S. mansoni* é o direcionamento da resposta imune de Th1 (inflamatória) para Th2 (anti-inflamatória). Arelado a isso, ocorre a mudança do perfil de ativação de macrófagos, passando de classicamente ativados (M1), ligados ao perfil inflamatório, para alternativamente ativados (M2), que contribuem com uma atenuação da resposta inflamatória. Esse caráter regulatório vem sendo explorado a fim de identificar moléculas promissoras para o desenvolvimento de terapias que reduzam a inflamação crônica, além de contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação de vacinas contra a esquistossomose. Neste trabalho, foi avaliado o potencial imunomodulador da proteína recombinante SmCyp na polarização de macrófagos. Essa proteína é da família de ciclofilinas, conhecidas pela sua interação com o sistema imune e função regulatória. Para isso, foi realizada a padronização de polarização de macrófagos da linhagem de macrófagos murinos J774A.1 para os fenótipos M1 e M2, com análise morfológica por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) e confirmação pela determinação quantitativa de citocinas pró e anti-inflamatórias. Em seguida, foram conduzidos ensaios com a proteína recombinante SmCyp nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL e incubadas por 24 e 48 horas, a fim de avaliar seu potencial modulador em macrófagos. Foi investigada sua influência na viabilidade celular por meio de ensaio MTT e vermelho neutro, além da produção indireta de óxido nítrico (NO- *nitric oxide*) e do perfil de marcadores inflamatório e anti-inflamatório, por meio das dosagens das citocinas TNF- α , IL-6 e IL10, utilizando a técnica ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*). Os resultados indicaram que a SmCyp, nas concentrações testadas, não alterou a viabilidade celular, tanto em 24 horas quanto em 48 horas. Em 24 horas, foi observado aumento de TNF- α , com valores próximos ao perfil M1, mas sem estimular a liberação de IL-6 ou NO, sugerindo um possível potencial imunomodulador. Com base nos resultados obtidos, a SmCyp, nas concentrações e tempo avaliados, mostrou um potencial de modulação imune moderado, com indução de produção de TNF- α em 24 horas, mas sem impacto significativo na produção de óxido nítrico ou nas citocinas IL-6 e IL-10. Esses achados são cruciais para aprofundar a compreensão das complexas interações entre parasita e hospedeiro, assim como do possível papel da SmCyp na resposta imune.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Macrófagos M1/M2; SmCyp; Imunomodulação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Resumo da estrutura metodológica para o estudo da proteína SmCyp.....	12
Figura 2- Imagem de macrófagos J774A.1 sob efeitos de indutores por 24h.....	17
Figura 3- Níveis de IL-6 (a), TNF- α (b) e IL-10 (c) em sobrenadantes de cultura de macrófagos M0, M1 e M2.....	18
Figura 4- Viabilidade celular (%) de células da linhagem J774A.1 por 24 e 48h com os controles e tratamentos com proteínas totais e SmCyp.....	19
Figura 5- Morfologia celular dos macrófagos J774A.1 por microscopia óptica em microscópio invertido Axiovert 40 CFL (Zeiss) em aumento final de 100x.....	20
Figura 6- Níveis de IL-6 de sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h.....	21
Figura 7- Níveis de TNF- α de sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h.....	22
Figura 8- Níveis de IL-10 de sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h.....	22
Figura 9- Quantificação indireta de NO em sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Obtenção das proteínas.....	11
3.2 Cultivo celular	11
3.3 Padronização de polarização dos macrófagos	11
3.4 Ensaio de proliferação celular com MTT	12
3.5 Ensaio de proliferação celular com vermelho neutro	13
3.6 Morfologia	14
3.7 Detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	14
3.8 Dosagem de óxido nítrico	15
3.9 Análise estatística	16
4 RESULTADOS.....	17
4.1 Padronização da polarização dos macrófagos - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..	17
4.2 Padronização da polarização dos macrófagos - Perfil de citocinas.....	17
4.3 Viabilidade celular.....	18
4.4 Morfologia Celular	19
4.5 Citocinas	20
4.6 Óxido Nítrico.....	22
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

As moléculas derivadas de helmintos, como o *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum*, vêm sendo estudadas quanto ao seu potencial imunomodulador e investigadas a fim de avaliar a possibilidade de serem candidatas ao desenvolvimento de imunoterapias para doenças inflamatórias crônicas e agudas, além de vacinas (Alves *et al.*, 2020; Morais, 2018; Hussarts *et al.*, 2015; Shiels *et al.*, 2020).

Mais de dois bilhões de pessoas estão infectadas com parasitas, sendo os helmintos responsáveis pela maioria dos casos. As infecções são causadas por uma grande variedade de helmintos transmitidos pelo solo, e doenças como esquistossomose e filariose ainda são prevalentes em algumas regiões do mundo, sendo classificadas como doenças tropicais negligenciadas. A esquistossomose, por exemplo, é prevalente em áreas tropicais rurais, em comunidades carentes e com falta de saneamento básico (OMS, 2023).

As infecções por helmintos configuram um problema persistente e amplamente reconhecido na saúde pública mundial, motivando esforços direcionados ao combate, prevenção e tratamento das doenças associadas. A infecção por esses parasitas pode causar consequências graves ao hospedeiro, mas há muitos casos em que não se manifestam sinais clínicos ou há períodos assintomáticos. Isso pode estar relacionado a processos de coevolução devido a relação parasita-hospedeiro, nos quais o parasito consegue manter sua permanência no hospedeiro sem ser detectado, por meio da modulação do seu sistema imune (Wiria *et al.*, 2012; Guigas; Molofsky, 2015).

Foi observado que, em países desenvolvidos, onde há controle e baixa prevalência desse tipo de infecção por helmintos, os índices de doença alérgicas, autoimunes e metabólicas são mais elevados, sugerindo que pode haver algum fator de proteção promovido pelo parasitismo contra o desenvolvimento dessas doenças (Guigas; Molofsky, 2015).

Está bem estabelecido que os helmintos estimulam a resposta Th1 no início da infecção; posteriormente, essa resposta é suprimida e substituída pela resposta imune do tipo Th2. As células Th1 e Th2 são subtipos de células T CD4+ auxiliares, fundamentais para o sistema imune adaptativo em respostas a infecções. A diferenciação de Th1 é induzida principalmente pela interleucina-12 (IL-12), com liberação de citocinas inflamatórias como o interferon gamma (IFN- γ), (IL-2) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), promovendo a ativação de macrófagos para o perfil inflamatório (M1) e inibição de Th2 por IFN- γ . Já a diferenciação das células Th2 é induzida principalmente por IL-4 e IL-13 com a produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-

10 e IL-13, além de estimular a produção de anticorpos, eosinófilos e resposta contra parasitas. Esse padrão de liberação de citocinas, especialmente pela IL-4, também induz a polarização de macrófagos, mas para um subtipo anti-inflamatório (M2), com a inibição da resposta Th1 pela ação da IL-10 principalmente (Romagnani, 1996).

No caso do *Schistosoma mansoni*, entre a quarta e quinta semana após a infecção, a resposta imune está em seu estado agudo, predominantemente direcionada ao perfil Th1. Ao redor da oitava semana, a resposta imune está fortemente polarizada para Th2, com o aumento de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, além da elevação dos níveis de IgE circulante e de células B e T regulatórias. Esse cenário também está atrelado à presença das citocinas IL-10 e do fator de crescimento transformador β (TGF- β), os quais também contribuem para a regulação dessa resposta (Hussaarts *et al.*, 2015; Magalhães *et al.*, 2004).

A interleucina IL-10 é especialmente importante na transição do perfil Th1 para Th2, pois inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios, como o IFN- γ e TNF- α (Macdonald; Araujo; Pearce, 2002). Além disso, a IL-10 suprime a ativação de células T e a diferenciação de células dendríticas (DC), enquanto promove a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, o que está associado à regulação do equilíbrio entre respostas Th1 e Th2 (Tang *et al.*, 2018).

Os macrófagos são células efetoras do sistema imune inato que desempenham papéis cruciais na defesa e manutenção da homeostase tecidual. Essas células reconhecem, fagocitam e eliminam patógenos e células apoptóticas, atuando na resolução da inflamação e contenção de danos teciduais (Brancewicz *et al.*, 2025). Esse tipo celular apresenta alta plasticidade funcional, transitando em um espectro de polarização, de classicamente ativados (M1) aos alternativamente ativados (M2). Essa reprogramação celular é finamente regulada por sinais microambientais, que ativam cascatas de sinalização intracelulares para as alterações celulares (Chen *et al.*, 2023).

Os macrófagos do tipo classicamente ativado (M1), típico de respostas Th1, é induzido por INF- γ e o lipopolissacarídeo (LPS), que atuam via Toll-like receptor 4 (TLR4) e subsequente ativação da via canônica do NF- κ B (Qin *et al.*, 2005). Esse perfil inflamatório se caracteriza por uma grande liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β . Por outro lado, a polarização para o fenótipo M2, característica de um cenário imunorregulador associado à resposta Th2, é induzida predominantemente pela IL-4, que, ao se ligar ao receptor IL-4R e atuar em conjunto com a IL-13, ativa o transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (STAT6), uma via essencial para a polarização de macrófagos M2 (Waqas; Ampem; Röszer,

2019). As citocinas presentes nesse cenário são IL-10 e TGF- β que também contribuem para a polarização M2 via STAT 3 e SMAD, respectivamente, além de favorecerem, indiretamente, a expressão de PPAR- γ , um receptor fundamental para a manutenção desse fenótipo (Brancewicz *et al.*, 2025; Zhao, 2023).

Como dito anteriormente, os macrófagos são células centrais na manutenção da homeostase tecidual. Contudo, a ativação excessiva ou sustentada por um longo período de tempo pode resultar em danos teciduais. Vale ressaltar que, além de suas funções fisiológicas, esses fagócitos desempenham papéis relevantes em doenças inflamatórias e metabólicas, como o diabetes tipo 2 (DM2) associado à obesidade. Nessa condição, tecidos com alterações metabólicas, como o hepático e o adiposo, apresentam um recrutamento aumentado de macrófagos, mediado por citocinas produzida localmente (Lee; Lam, 2018).

Estudos indicam que esse processo de infiltração e inflamação do tecido adiposo possui como molécula-chave o óxido nítrico (NO), que interfere no metabolismo celular e promove a polarização para M1 (Palmieri; McGinity, 2020). Esse fenótipo inflamatório expressa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável por catalisar a reação de conversão de L-arginina em NO. Em contextos de inflamação ou estresse oxidativo, esse mediador compromete a via PI3K/AKT, essencial à ação insulina e à homeostase glicêmica (Fite; Abou-Samra; Seyoum, 2015).

As doenças endócrino-metabólicas vêm recebendo atenção crescente no meio científico, com estudos voltados para suas etiologias, estratégias de prevenções e abordagens terapêuticas, especialmente acerca do diabetes e da obesidade. O DM2 é uma disfunção metabólica crônica, progressiva e multifatorial, caracterizada por hiperglicemia, resistência a insulina e deficiência relativa ou absoluta na sua produção. É uma doença frequentemente associada a estilos de vida inadequados e a obesidade, envolvendo um estado inflamatório crônico de baixo grau, com tendência ao desenvolvimento de complicações, tais como a dislipidemia, hipertensão, disfunção endotelial, doenças cardiovasculares, cegueira, nefropatia e amputações (SBD, 2023; Goyal, 2023; Wensveen *et al.*, 2015; Breitsameter *et al.*, 1994).

Na obesidade, o tecido adiposo atua como um órgão endócrino, sendo os adipócitos as células especializadas responsáveis em operar funções endócrinas, metabólicas e imunológicas. Diante de um aporte calórico cronicamente elevado, as células especializadas aumentam em número e volume, gerando um estresse metabólico contínuo (Castro *et al.*, 2016). Esse cenário é propício a ativação de vias inflamatórias, onde os adipócitos passam a secretar citocinas pró-inflamatórias, adipocinas, ácidos graxos livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) e

nitrogênio (ERNs). Esses fatores favorecem a resistência à insulina por mecanismos parácrinos/autócrinos e afetam órgãos como fígado e músculos, comprometendo o metabolismo da glicose via TLR4, TNFR1 e IL-6R. (Hotamisligil *et al.*, 1995; Kristianssen; Mandrup-Poulsen, 2005; Luca; Olefsky, 2006).

Dessa forma, a obesidade pode levar à resistência à insulina, disfunção das células β e ao DM2, caracterizando um quadro de inflamação crônica de baixo grau, resultantes das disfunções metabólicas prolongadas. Tal estado inflamatório contribui para complicações como doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD), retinopatia, doenças cardiovasculares e nefropatia (Rohm *et al.*, 2022). Nesse contexto, a inflamação tem sido reconhecida como um fator de risco importante para a fisiopatologia do DM2, dada sua estreita relação com os mecanismos de resistência à insulina (Wang *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2017).

Nesse cenário, é amplamente conhecido o papel central dos macrófagos na homeostase, na mediação da inflamação e nos processos de reparo tecidual. Essas células têm um papel central nesse processo inflamatório, sendo intensamente recrutadas para tecidos com alteração da atividade metabólica, como o adiposo e hepático – fenômeno observado tanto na obesidade quanto no DM2 (Lumeng; Saltiel, 2011). Nestas condições, impulsionados por citocinas inflamatórias e, em razão de sua plasticidade fenotípica, observa-se um aumento expressivo na infiltração e polarização de macrófagos para M1 (Gordon *et al.*, 2014; Kraakman *et al.*, 2014). Portanto, o microambiente tecidual alterado fornece as condições para ocorrer um desequilíbrio entre a proporção de M1 e M2, em que o fenótipo M1 se sobressai em relação ao M2. Nesse sentido, alguns estudos investigam a interação entre a infecção do *Schistosoma spp.* e seu potencial efeito protetor em doenças metabólicas pela indução da mudança no perfil M1 para M2. Um dos pontos que favorecem esse evento é o microambiente imunológico predominantemente Th2, com o aumento de citocinas anti-inflamatórias, expansão de células T reguladoras (Tregs) e diminuição da resposta Th1 (Tang *et al.*, 2018).

Amer *et al.* (2023) investigaram, em modelo *in vivo*, a relação entre a infecção por *Schistosoma mansoni* e o desenvolvimento do diabetes tipo 1 e 2. Os resultados mostraram uma relação complexa, tendo em vista que a fibrose hepática foi mais acentuada e a carga parasitária foi maior para o grupo com as condições de DM2 e obesidade, acompanhadas por níveis elevados de citocinas inflamatórias e regulatórias. Apesar disso, observou-se uma melhora na resistência à insulina.

Diversas moléculas derivadas de helmintos têm sido avaliadas quanto ao seu potencial

imunomodulador. Haeberlein *et al.* (2017), por exemplo, analisaram a glicoproteína IPSE/alfa-1 e os antígenos derivados dos ovos (SEA) do *S. mansoni* e sua interação com células do sistema imune, que induziram células B e T regulatórias. A proteína Sm16 de *Schistosoma mansoni* foi testada em macrófagos em modelo *in vitro*, demonstrando uma função inibitória na ativação clássica de macrófagos (M1) (Sanin; Mountford, 2015).

Para este trabalho, foi utilizada a proteína recombinante SmCyp (Ciclofilina A) do *Schistosoma mansoni* para avaliar seu potencial de polarização de macrófagos. Essa proteína pertence ao grupo das ciclofilinas, um grupo de isomerases envolvidas no dobramento de proteínas e regulação do sistema imune. A ciclofilina A é expressa durante diferentes estágios do desenvolvimento do helminto, incluindo as fases de cercárias e verme adulto, fases de contato direto com o hospedeiro definitivo (Bugli *et al.*, 1998; Floudas *et al.*, 2017).

A SmCyp pode ser encontrada em diferentes regiões do parasita, como tegumento, porções musculares, epitélio intestinal e interior do verme, o que a torna uma proteína elegível ao estudo relacionado a imunomodulação, uma vez que ela interage com o sistema imune do hospedeiro. Além disso, sua semelhança estrutural com ciclofilinas humanas pode favorecer o seu mecanismo de evasão, corroborando para sua elegibilidade ao estudo (Bugli *et al.*, 1998).

Estudos anteriores demonstraram potencial imunomodulador dessa proteína. Floudas *et al.* (2017) observaram, em ensaios *in vitro*, que proteína recombinante SmCyp do *S. mansoni* modula a função de células dendríticas, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, em um estudo *in vivo* com a SmCyp do *S. japonicum*, foi evidenciada a indução de uma resposta Th2, com aumento significativo na produção de IL-4, reforçando seu perfil imunomodulador (Li *et al.*, 2013).

No contexto da vacinação contra a esquistossomose, foram feitos testes *in vitro* para avaliar a alergenicidade e a capacidade de proteção de formulações contendo a SmCyp, em modelos *in vivo*. Os resultados indicam estímulo da resposta imune com modulação da área dos granulomas, redução da carga parasitária e produção de anticorpos expressiva contra um epítipo da SmCyp (Melo *et al.*, 2019).

Assim, considerando que há poucos estudos da proteína SmCyp e reconhecendo as diversas possibilidades ainda não exploradas quanto ao seu potencial terapêutico em diferentes contextos, o presente trabalho tem como objetivo analisar os efeitos da proteína recombinante SmCyp na polarização de macrófagos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da proteína recombinante SmCyp pertencente à família das imunofilinas do *Schistosoma mansoni* na polarização de macrófagos murinos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterização do modelo de polarização de macrófagos
- b) Avaliar a viabilidade celular de macrófagos sob exposição de diferentes concentrações da proteína SmCyp.
- c) Analisar a morfologia dos macrófagos tratadas com a SmCyp.
- d) Quantificar a concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-10) liberada pelos macrófagos incubados com a proteína SmCyp.
- e) Dosar a produção de óxido nítrico produzido pelas células expostas à proteína recombinante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das proteínas

Todo o processo de produção da SmCyp foi realizado pelo grupo de pesquisas de Biologia e Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto René Rachou- IRR (FIOCRUZ/MG), coordenado pela Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca, a qual gentilmente nos cedeu a proteína para avaliação. Já a Proteína Total do verme adulto (de *Schistosoma mansoni*) foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Silmara marques Allegretti, pesquisadora do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A extração das proteínas totais foi realizada empregando-se um tampão de extração contendo Tris-HCl, DTT, glicerol e inibidor de protease (Sigma).

3.2 Cultivo celular

A linhagem celular J774A.1 de macrófagos murinos foi cultivada em frascos de cultura de 75 cm² com meio DMEM alta glicose com L-glutamina suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) e 1 % Penicilina e Estreptomicina (10 mL/L). As células foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5 % CO₂ em atmosfera úmida. A cada 24 horas ou 48 horas o crescimento celular era observado, e o processo de subcultivo era realizado a cada 2 ou 3 dias antes de atingir 100 % de confluência. Para o subcultivo, as células foram lavadas com PBS e removidas mecanicamente com raspador de células. Todo o conteúdo do frasco foi transferido para tubo Falcon e submetido a centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio, e o volume de células redistribuído no frasco de cultura variava conforme o objetivo experimental.

3.3 Padronização de polarização dos macrófagos

A polarização dos macrófagos foi padronizada com o intuito de permitir uma avaliação comparativa adequada com os tratamentos da proteína SmCyp. As células murinas da linhagem J774A.1 foram plaqueadas na densidade de 10⁵ células/poço em placa de 12 poços e incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂, em incubadora com atmosfera úmida por 24 horas. Como controles experimentais, foram estabelecidos: um grupo M0 (células apenas com meio suplementado com SBF), um grupo com indução de perfil M1, tratado com INF- γ (5 ng/ml) e LPS (1 μ g/mL), e um grupo com indução para o perfil M2, tratado com IL- 4 (20 ng/mL) (Ribeiro *et al.*, 2022).

Os macrófagos M0, M1 e M2 foram preparados para uma caracterização ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar (LCE/DEMa/UFSCar). As células foram mantidas em M0 ou foram polarizadas para M1 e M2 por 24 e 48 horas, sendo então fixadas com paraformaldeído 4 % e lavadas duas vezes com PBS (1x). Em seguida, as células foram revestidas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50) (Ribeiro *et al.*, 2021). As imagens obtidas para cada fenótipo foram avaliadas qualitativamente quanto à morfologia e características ultraestruturais.

3.4 Ensaio de proliferação celular com MTT

Para avaliação da viabilidade, foram utilizados dois métodos com princípios distintos relacionados ao metabolismo celular e a integridade lisossomal. Após os tempos de incubação, os sobrenadantes foram coletados para os ensaios subsequentes (Figura 1).

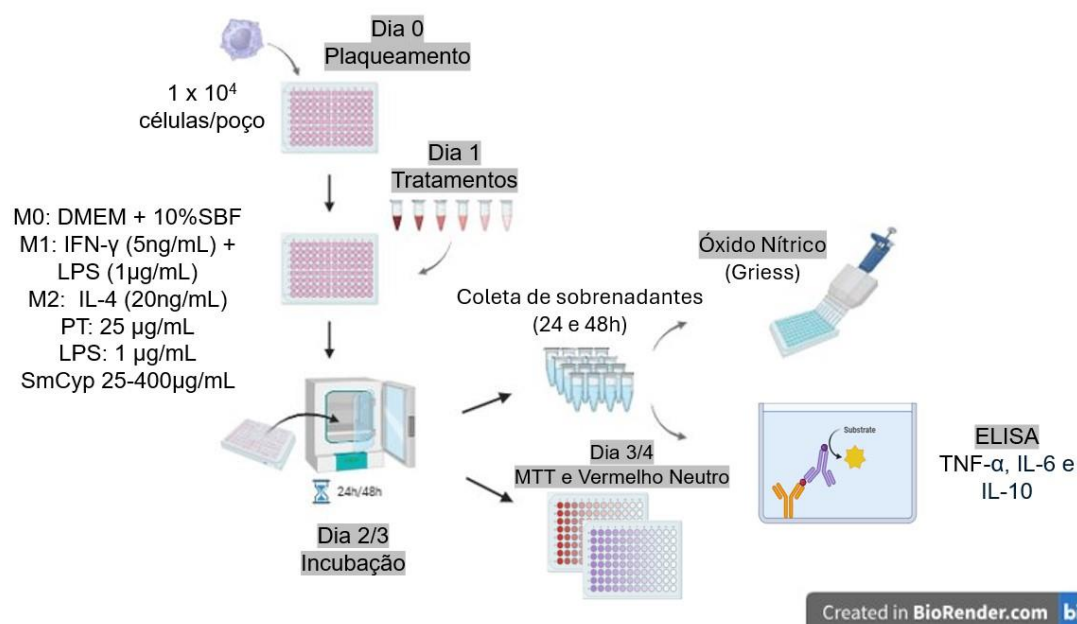


Figura 1. Resumo da estrutura metodológica para o estudo da proteína SmCyp.

O primeiro ensaio de viabilidade foi o método colorimétrico com Tetrazolium 3 - (4,5 - dimetiliazol - 2 - il) 2,5 - difenilbromida (MTT) (Mossmann, 1983), um sal de coloração amarelada que é reduzido a cristais de formazan (cor violeta) por enzimas desidrogenases mitocondriais ativas. Assim, a viabilidade é inferida indiretamente a partir da atividade mitocondrial das células.

O cultivo celular foi feito em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células por poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com a proteína recombinante SmCyp nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Ademais, as células também receberam um tratamento de proteínas totais do verme adulto a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Essa concentração foi estabelecida a partir de ensaios realizados pelo grupo de pesquisa, nos quais foi observado que esta é uma concentração segura, sem impacto na viabilidade de macrófagos (Santos, 2021). Para o controle celular, as células foram cultivadas apenas com meio DMEM com 10 % de SBF e 1 % dos antibióticos estreptomicina e penicilina.

Após o período de 24 e 48 horas de exposição às diferentes concentrações, foi adicionado 100 μL de MTT (0,5 mg/mL) diluído em meio livre de SBF, seguido de incubação por 3 horas a 37 °C e 5 % CO_2 . Em seguida, o MTT foi removido e 100 μL de DMSO foi aplicado em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm (Fragelli *et al.*, 2018).

A porcentagem de viabilidade celular foi calculada para cada replicata biológica de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO} - \text{Branco}) \text{ Média do controle celular} \times 100$$

3.5 Ensaio de proliferação celular com vermelho neutro

Para verificar a viabilidade dos macrófagos da linhagem J774A.1 na presença da proteína recombinantes do *S. mansoni* por outro método, foi realizado o ensaio de citotoxicidade vermelho neutro, com tempos de exposição de 24 e 48 horas. Este ensaio é amplamente empregado para verificar a viabilidade estimada pela integridade lisossomal, isto é, pela capacidade de retenção do corante pelos lisossomos de células viáveis. Posteriormente, o corante é solubilizado e extraído, permitindo que a viabilidade seja estimada com base na absorbância determinada por espectrofotometria (Repetto *et al.*, 2008).

O cultivo celular foi feito em placas de 96 poços, com a concentração de 1×10^4 células/poço por um período de incubação de 24 horas. Em seguida, foi retirado o meio dos poços e foi substituído por meio com a proteína SmcCyp em concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, cada uma testada em triplicata, com incubação de 24 horas. O mesmo procedimento foi repetido para o tempo de 48 horas. Para o controle celular, as células foram

cultivadas com meio suplementado com 10 % de SBF e 1 % dos antibióticos estreptomicina e penicilina.

Após cada período de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x e foi adicionado 100 µL da solução de vermelho neutro (30 µg/ml diluído em meio livre de SBF) por poço. A incubação foi de 2 horas, ao abrigo da luz, em incubadora a 37 °C e 5 % CO₂. Posteriormente, o corante foi removido e substituído por uma solução de etanol 50 % e ácido acético 1 % na proporção 1:1. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) (Ates *et al.*, 2017).

3.6 Morfologia

Para análise morfológica por microscopia óptica, os macrófagos da linhagem celular J774A.1 foram cultivados na concentração de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços, seguindo o mesmo método descrito para o cultivo e incubação da proteína recombinante SmCyp descrito para o ensaio MTT. Após os períodos de 24 e 48 horas, as células foram observadas em microscópio óptico invertido Axiovert 40 CFL (Zeiss), com aumento final de 100x. As imagens obtidas foram feitas por meio de uma câmera acoplada ao microscópio do modelo LOD-3000 (Bio Focus) e analisadas qualitativamente no software Future WinJoe.

3.7 Detecção de citocinas pró e anti-inflamatórias

A dosagem de citocinas foi feita tanto para validar a polarização, quanto para investigar os efeitos da proteína de interesse. Para a avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e da citocina anti-inflamatória IL-10, as células de macrófagos da linhagem murina J774A.1 foram plaqueadas no dia 0.

No dia 1, o grupo M1 recebeu 5 ng/ml de IFN e 1 µg/mL de LPS para indução a polarização inflamatória, M2 recebeu 20 ng/mL de IL-4 para indução a polarização anti-inflamatória, o grupo com apenas LPS recebeu 1 µg/mL de LPS e as concentrações de SmCyp aplicadas foram de 50 e 25 µg/mL. Após 24 e 48 horas de incubação, os sobrenadantes foram coletados para realização do ensaio ELISA para detecção de citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α e da citocina anti-inflamatória/regulatória IL-10.

A dosagem de citocinas foi realizada com os sobrenadantes da cultura celular da linhagem J774A.1 em placa de 96 poços em duplicata para cada condição de cada réplica biológica. No dia anterior ao ensaio, as placas foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-mouse IL-6, anti-mouse TNF- α e anti-mouse IL-10 diluídos em seus respectivos tampões e proporções indicados no kit. Para cada citocina, foram calculadas as quantidades de anticorpos de captura e enzima que seriam diluídos na solução diluente para a concentração indicada na bula.

Durante a sensibilização, 100 μ L da solução de anticorpos de captura foram aplicados em cada poço. As placas foram incubadas overnight a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com 300 μ L por poço com a solução de lavagem (0,05 % Tween 20 em PBS). Em seguida, foram adicionados 200 μ L de solução de bloqueio (Albumina 1 % em PBS) e as placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Depois, as placas passaram por mais 3 ciclos de lavagem com 300 μ L/poço.

Em seguida, foram aplicadas 50 μ L de amostras e a curva padrão, em duplicata. O branco recebeu apenas 50 μ L de albumina 1 % diluída em PBS 1x. As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e, no escuro, foram aplicados 100 μ L por poço dos anticorpos de detecção com suas respectivas enzimas, diluídos em solução diluente (PBS e albumina 1 %). Após incubação de uma hora e meia, em temperatura ambiente, as placas passaram por mais três ciclos de lavagem. Foi então adicionado 100 μ L de substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) preparado a partir da solução A e B (1:1) do kit para reação enzimática. A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M por poço. A leitura de absorbância foi feita a 450 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) (Crowther, 2001).

3.8 Dosagem de óxido nítrico

Para determinação indireta do óxido nítrico, foi feita a dosagem de nitrito (NO⁻²) por meio do método baseado na reação de Griess. O nitrito é uma forma oxidada do óxido nítrico e, para sua detecção (Saltzman, 1954; Green, 1982). Foram utilizados os sobrenadantes da cultura celular sob as mesmas condições mencionadas para o MTT.

Os sobrenadantes resultantes da incubação por 24 e 48 horas com as proteínas do *S.*

mansoni, proteínas totais do verme, LPS e controle negativo com meio DMEM suplementado com SBF foram coletados para o ensaio. Foi feita uma curva de nitrato com NaNO_2 com as concentrações de 0,8 μM a 200 μM . Após a distribuição das amostras em uma placa de 96 poços, foi aplicada a solução de Griess (naftil-etilenodiamina (NED) 1 %, Sulfanilamida 1 % e ácido fosfórico 2,5 %) no mesmo volume da amostra e, após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 554 nm (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer) (Magalhães *et al.*, 2018; Fragelli *et al.*, 2021).

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas de todos dados experimentais dos ensaios deste trabalho foram feitas utilizando o teste ANOVA para dados considerados paramétricos pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov no GraphPad Prism versão 8. Os dados foram corrigidos pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram definidos como estatisticamente significativos. Os resultados estão expressos como a média \pm desvio padrão. Os dados são representativos de pelo menos três experimentos independentes, feitos em triplicata metodológica.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da polarização dos macrófagos - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica das células da linhagem J774A.1 em um período de 24 horas de incubação com os indutores de M1 e M2 um controle M0 mostrou que há diferenças morfológicas entre os grupos. No grupo de macrófagos M0, sem indutores, foi possível observar duas morfologias diferentes: mais arredondados, em formato fusiforme (Figura 2a-d) e bipolares. Na Figura 2b-e estão ilustrados os aspectos morfológicos predominantes do grupo dos macrófagos M1 com formato mais alongado e fusiforme com projeções citoplasmáticas esticadas nos polos. O grupo induzido a polarização M2, de modo geral, foi caracterizado como células arredondadas com pouco ou sem extensões citoplasmáticas.

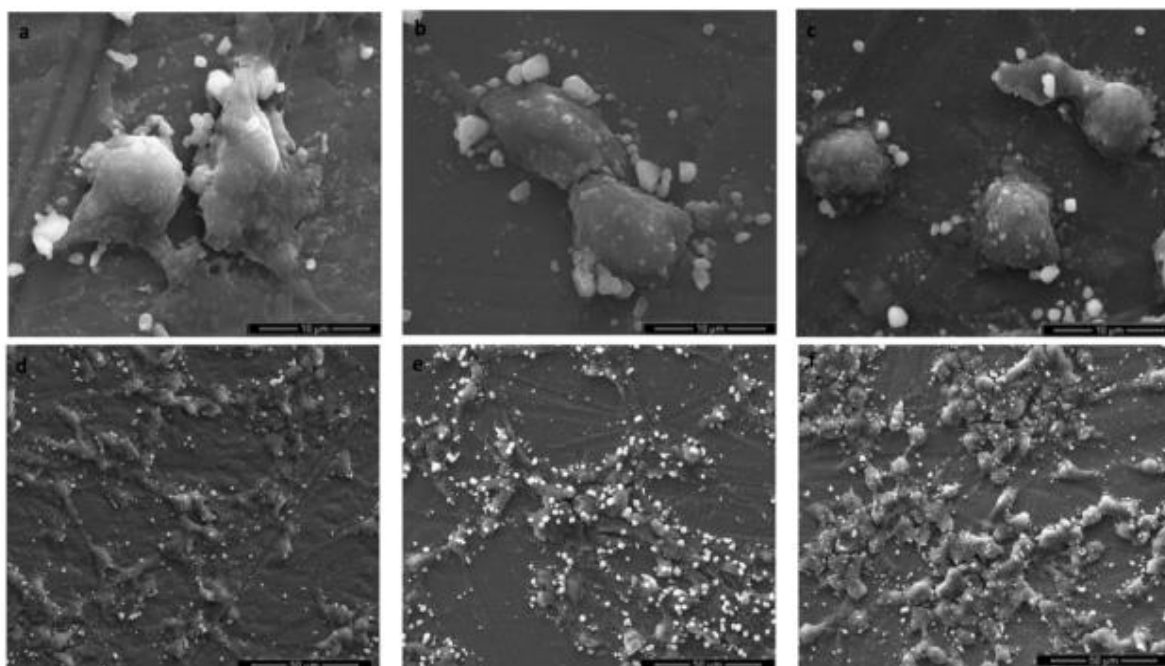


Figura 2. Imagem de macrófagos J774A.1 sob efeitos de indutores por 24h. M0 (a-d), M1(b-e) e M2 (c-f) obtidos por MEV. a, b e c: ampliação original de 10 μm ; d, e, f: ampliação original de 50 μm .

4.2 Padronização da polarização dos macrófagos - Perfil de citocinas

O perfil de citocinas foi determinante para fazer a confirmação e validação da polarização da linhagem J774A.1. Os macrófagos tratados com os indutores IFN- γ e LPS por 24 horas para induzir M1 apresentou uma elevada produção dos marcadores inflamatórios TNF- α e IL-6 típicos desse fenótipo (Figura 3). Já as células controle, M0 cultivados apenas com meio de cultura a produção de dessas citocinas inflamatórias foi baixíssima e o perfil de M2 foi

semelhante. A dosagem de IL-10 (Figura 3) não evidenciou diferenças significativas entre os grupos.

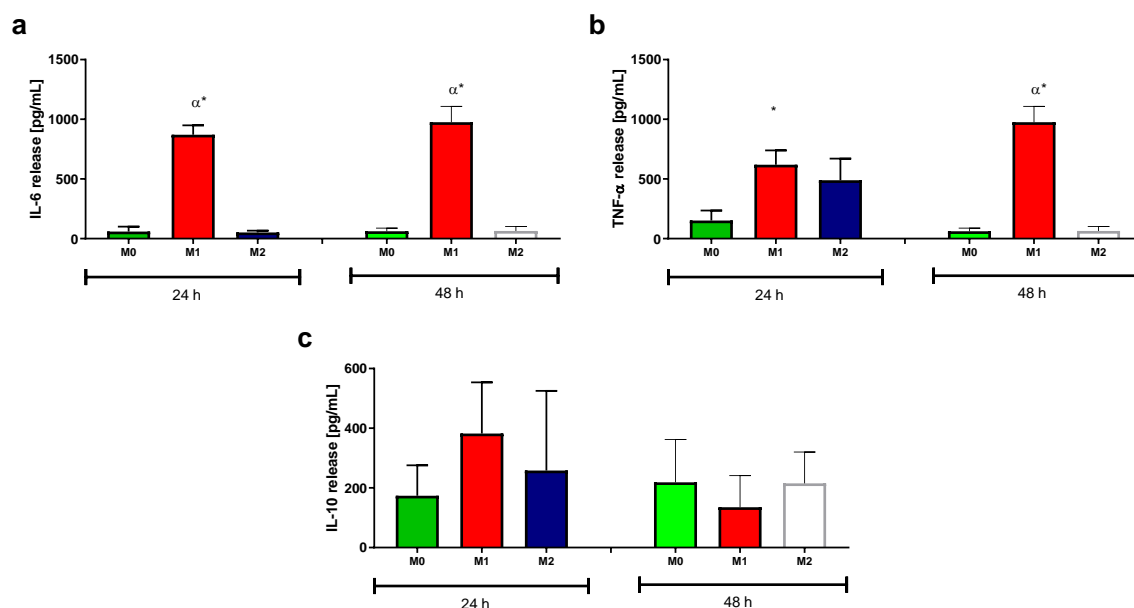


Figura 3. Níveis de IL-6 (a), TNF- α (b) e IL-10 (c) em sobrenadantes de cultura de macrófagos M0, M1 e M2. Os dados do gráfico estão expressos em média acompanhada do desvio padrão (DP) com $p < 0,05$ em relação ao grupo M0. M0: DMEM + 10 % SBF; M1: LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN- γ (5 ng/mL); M2:IL-4 (20 ng/mL). * $p < 0,05$ comparado a M0; α $p < 0,05$ comparado a M2.

4.3 Viabilidade celular

A partir da caracterização do perfil de polarização dos macrófagos da linhagem J774.A1, foram conduzidos os experimentos com a proteína recombinante SmCyp do *S. mansoni* nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em um intervalo de 24 e 48 horas para avaliar a viabilidade mitocondrial. No período de 24 horas, as células apresentaram uma viabilidade celular próxima ao controle celular conforme pode ser visto na Figura 4, sendo que ele foi observado para as células tratadas com a proteína total, embora esta última tenha tido uma discreta queda, mas sem relevância estatística. Já a exposição de 48 horas, embora tenha demonstrado uma tendência de aumento de viabilidade, os resultados não apresentaram diferença significativa em relação ao controle celular.

Um resultado semelhante pode ser observado com a análise da viabilidade pelo método de Vermelho Neutro, que também é um método indireto, mas a atividade metabólica da célula é verificada por outra organela celular, o lisossomo (Figura 3).

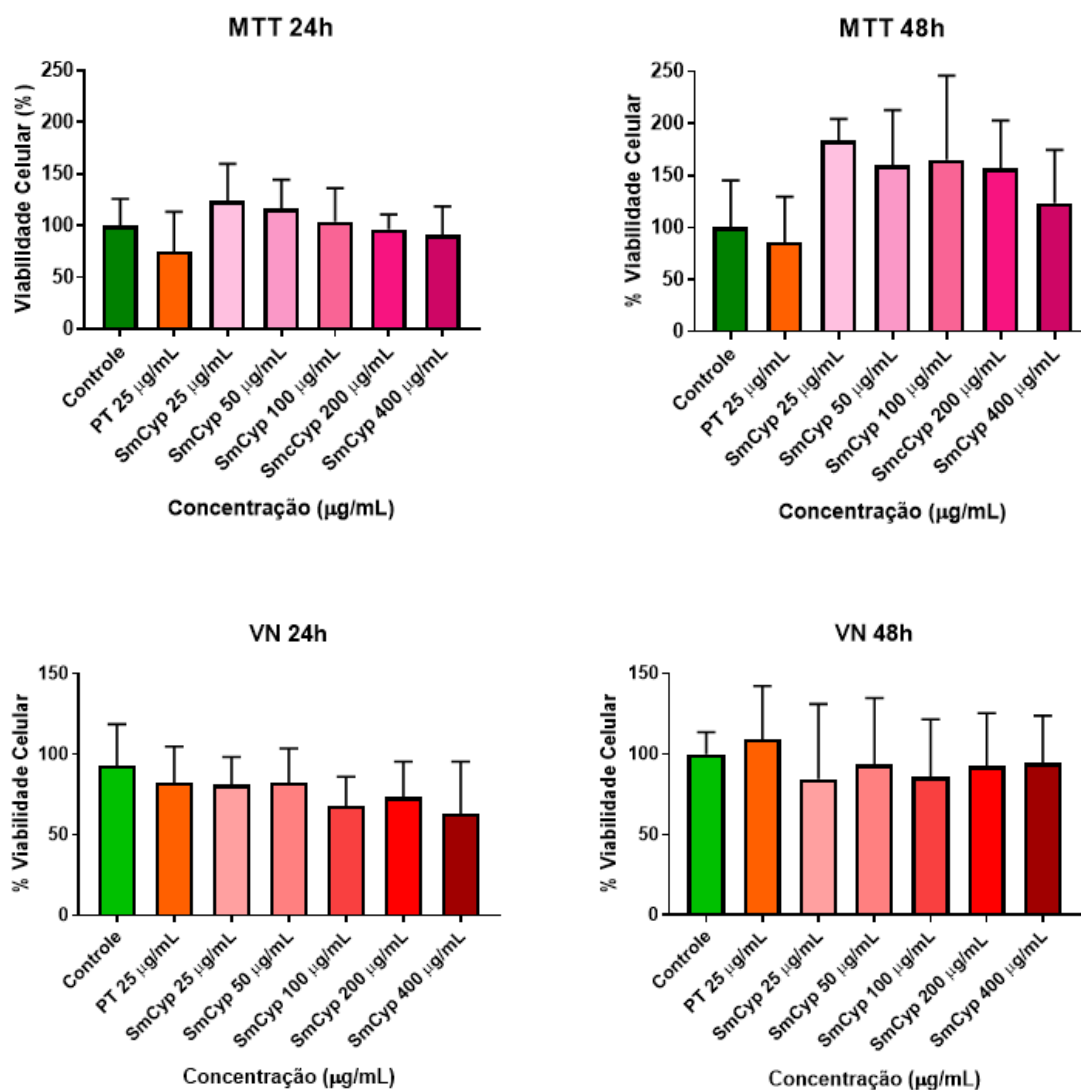


Figura 4. Viabilidade celular (%) de células da linhagem J774A.1 por 24 e 48h com os tratamentos: Controle: DMEM + 10 % SBF; Proteína Total (PT) 25 µg/mL; SmCyp 25-400 µg/mL. Os dados do gráfico estão expressos em média acompanhada do desvio padrão (DP) com $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A significância estatística foi determinada por testes One way ANOVA com dados paramétricos e Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para dados não paramétricos.

4.4 Morfologia Celular

Conforme é possível observar nas imagens capturadas da morfologia dos macrófagos murinos da linhagem J774A.1 houve um aumento da densidade celular entre 24 e 48 horas de cada um dos grupos, incluindo todas as concentrações da proteína e do macerado do verme. Apesar disso, ao comparar os grupos entre si em cada período de incubação, não houve diferenças significativas ou notáveis entre controle celular, proteína recombinante SmCyp e proteínas totais (PT) (Figura 5). Este foi um ensaio complementar atrelado ao de viabilidade de caráter demonstrativo permitindo a visualização direta das células por meio de microscopia

óptica.

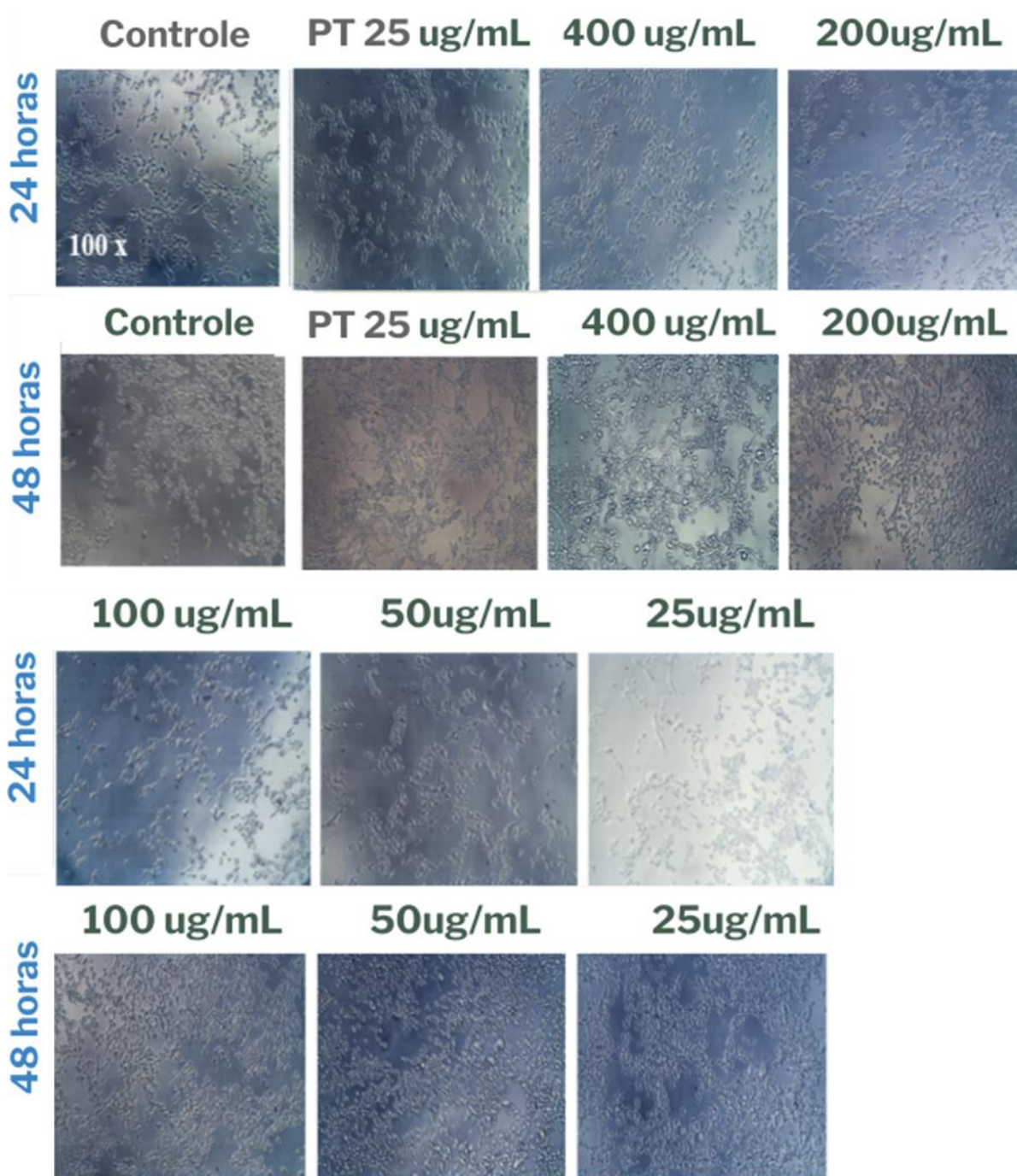


Figura 5. Morfologia celular dos macrófagos J774A.1 por microscopia óptica em microscópio invertido Axiovert 40 CFL (Zeiss) em aumento final de 100x. Incubação com os tratamentos: Controle: DMEM + 10 % SBF; Proteína Total (PT) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SmCyp 25-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nos períodos de 24h e 48h.

4.5 Citocinas

Com os sobrenadantes da cultura celular dos macrófagos em interação com a proteína

do *S. mansoni*, foram realizadas as dosagens de liberação de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 e anti-inflamatória IL-10 por meio da técnica de detecção imunoenzimática ELISA. Como é possível observar na figura 6, nos períodos de 24 e 48 horas, não foi observado aumento IL-6 nas condições testadas. O grupo M1 foi o único em que houve uma alta e estatisticamente relevante liberação da citocina inflamatória em relação ao controle celular M0 em 24 horas, e praticamente não foi detectada para os outros grupos. Em 48 horas, houve uma discreta detecção para os outros grupos, exceto M2. Os valores de M1 continuaram altos significativamente maior que as proteínas totais e a SmCyp nas concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$.

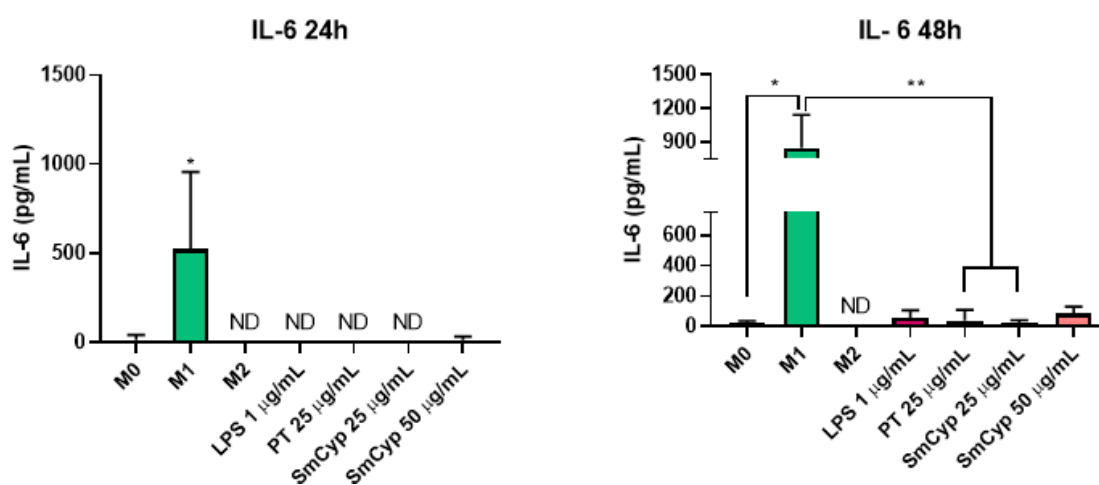


Figura 6: Níveis de IL-6 de sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h. M0: DMEM + 10 % SBF; M1: LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (5 ng/mL); M2:IL-4 (20 ng/mL); Proteína Total (PT) 25 $\mu\text{g/mL}$; LPS (1 $\mu\text{g/mL}$); SmCyp 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os dados do gráfico estão expressos em média acompanhada do desvio padrão (DP) com $p < 0,05$. . A significância estatística foi determinada por testes One way ANOVA com dados paramétricos e Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para dados não paramétricos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. ND: Não detectado.

Na Figura 7 estão representados os resultados para a TNF- α . Em 24 horas, os níveis de TNF- α nos macrófagos M1 comparado aos grupos M0. Além disso, as concentrações testadas da proteína SmCyp apresentaram valores próximos ao perfil M1 e mais elevados que o grupo M0 e M2. Enquanto as outras condições testadas não foram significativamente maiores ou menores. No período de maior exposição, não houve diferença significativa entre as condições testadas.

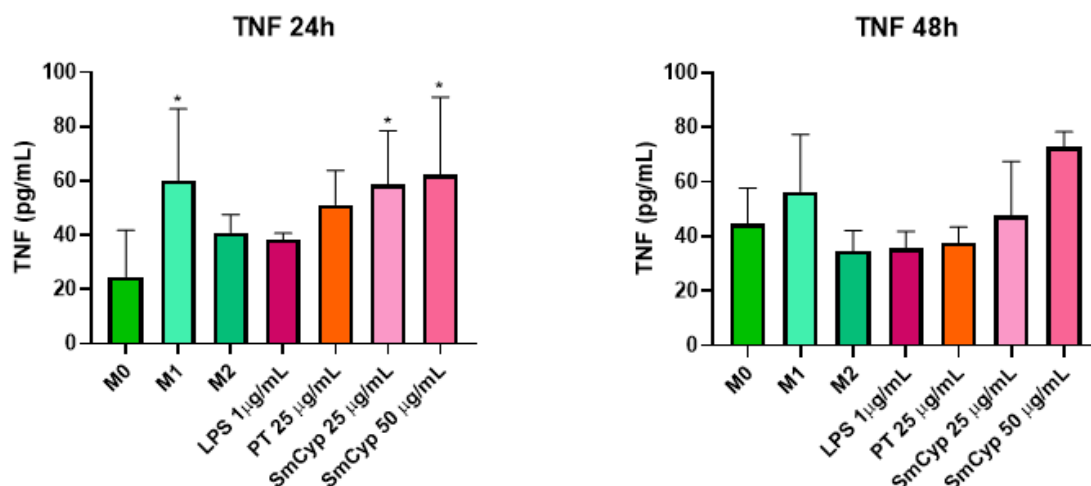


Figura 7. Níveis de TNF- α de sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h. M0: DMEM + 10 % SBF; M1: LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (5 ng/mL); M2:IL-4 (20 ng/mL); Proteína Total (PT) 25 μ g/mL; LPS (1 μ g/mL); Proteína Total (PT) 25 μ g/mL; SmCyp 25 e 50 μ g/mL. Os dados do gráfico estão expressos em média acompanhada do desvio padrão (DP) com $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A significância estatística foi determinada por testes One way ANOVA com dados paramétricos e Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para dados não paramétricos. * $p < 0,05$ comparado a M0.

Já para a citocina anti-inflamatória IL-10, houve uma detecção da interleucina para todos os grupos, embora com dados mais dispersos e com maior variância. Os níveis de IL-10 não foram diferentes entre os tratamentos aplicados (Figura 8).

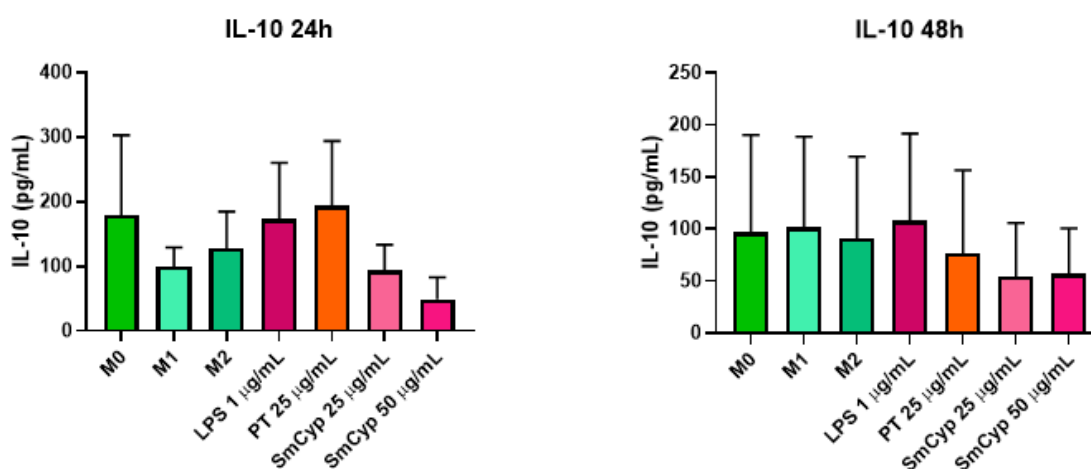


Figura 8. Níveis de IL-10 de sobrenadantes da linhagem J774A.1 sob os tratamentos por 24 e 48h. M0: DMEM + 10 % SBF; M1: LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (5 ng/mL); M2:IL-4 (20 ng/mL); Proteína Total (PT) 25 μ g/mL; LPS (1 μ g/mL); Proteína Total (PT) 25 μ g/mL; SmCyp 25 e 50 μ g/mL. Os dados estão expressos em média e desvio padrão (DP) com $p < 0,05$ em relação ao grupo M0. A significância estatística foi determinada por testes One way ANOVA com dados paramétricos e Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para dados não paramétricos.

4.6 Óxido Nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada de forma indireta com a quantificação de nitrito no sobrenadante celular e os resultados na Figura 9 mostram que não houve diferença estatística da produção de óxido nítrico pelos macrófagos quando expostos a proteína SmCyp nas concentrações de 25 e 50 μ g/mL comprados ao controle M0. O mesmo ocorreu para as proteínas

totais (25 $\mu\text{g/mL}$). O grupo M1 apresentou uma alta produção de óxido nítrico em relação ao controle celular M0 e aos demais grupos, inclusive os da SmCyp e houve um aumento na liberação no período de 48 horas e em relação ao de 24 horas.

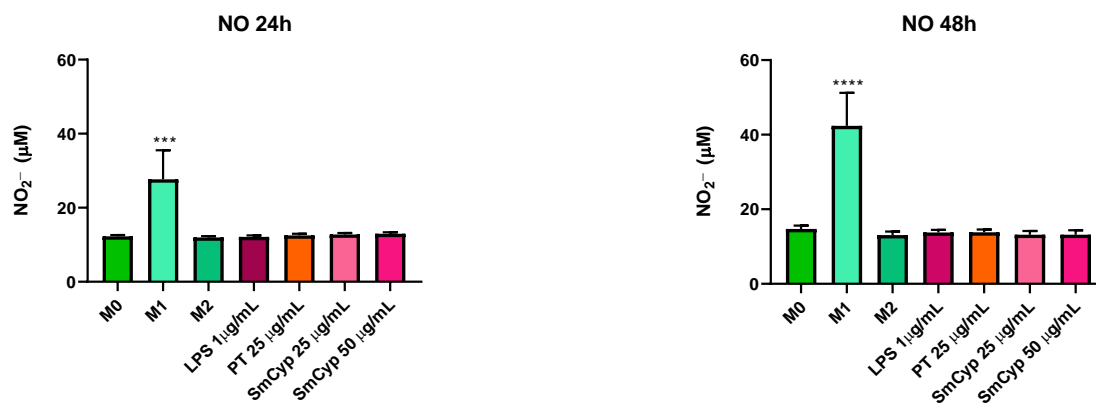


Figura 9. Quantificação indireta de NO em sobrenadantes de cultura dos macrófagos J774A.1 incubados com os tratamentos por 24 e 48h. M0: DMEM + 10 % SBF; M1: LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + IFN- γ (5 ng/mL); M2:IL-4 (20 ng/mL); Proteína Total (PT) 25 $\mu\text{g/mL}$; LPS (1 $\mu\text{g/mL}$); Proteína Total (PT) 25 $\mu\text{g/mL}$; SmCyp 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os dados do gráfico estão expressos em média acompanhada do desvio padrão (DP) com $p < 0,05$ em relação ao grupo M0. A significância estatística foi determinada por testes One way ANOVA com dados paramétricos e Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para dados não paramétricos. Com *** $<0,001$ e **** $p < 0,0001$ comparado a M0.

5 DISCUSSÃO

O potencial imunomodulador de moléculas como proteínas e glicanos de *Schistosoma mansoni* e de outros helmintos tem sido investigado para entender melhor a interação entre o parasito e o hospedeiro. Com base nessas investigações, avalia-se a viabilidade de desenvolvimento de vacinas contra a esquistossomose ou de imunoterapias para doenças inflamatórias agudas e crônicas.

S. mansoni mantém sua relação parasitária por meio de estratégias de evasão imunológica, modulando células do hospedeiro para garantir sua sobrevivência (Maizels *et al.*, 2018). Uma característica marcante desse processo é a mudança da resposta imune de um perfil inflamatório Th1 para um perfil anti-inflamatório Th2. Assim, algumas células como macrófagos também alteram de perfil: ocorre um aumento na polarização para o fenótipo ativado alternativamente (M2) (Waqas; Ampem; Röszer, 2019). Como os macrófagos são uma das principais células envolvidas na regulação do sistema imune, essa mudança resulta na diminuição da inflamação (Reyes; Terrazas, 2007).

Os macrófagos apresentam um espectro de ativação e, dependendo do sítio de recrutamento e do contexto, podem associar-se a processos inflamatórios, polarizados para o perfil clássico M1, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, produção de iNOS e NO. Por outro lado, sob indução para o perfil M2, os macrófagos alternativamente ativados atuam e, um cenário anti-inflamatório e reparador (Brancewicz, *et al.*, 2025).

Em condições de inflamação crônica, como o DM2, ocorre um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente TNF- α e IL-6. Esses mediadores inflamatórios contribuem para a resistência à insulina e desregulação metabólica, refletindo o estado de polarização de macrófagos para M1, além da geração de moléculas de espécies reativas, como o NO.

Nesse contexto, promover o perfil M2 (em relação ao M1) está relacionado com a ação de citocinas características, como IL-10, TGF- β e IL-4, as quais também são implicadas na imunomodulação pelo *S. mansoni* (Gomes; Accardo, 2018; Hussaarts *et al.*, 2015; Maizels; Mcsorley, 2016).

Este estudo teve como objetivo analisar e compreender os efeitos da proteína recombinante SmCyp em modelo *in vitro* de macrófagos murinos. Por sua vez, os macrófagos são reconhecidos pela sua alta plasticidade e transitam num espectro de polarização, tradicionalmente dividido em M1 (classicamente ativado) e M2 (alternativamente ativado), sendo que este último pode ser classificado em subpopulações M2a, M2b, M2c e M2d

(Brancewicz *et al.*, 2025).

Embora essa divisão binária não reflita completamente o comportamento *in vivo*, trata-se de uma abordagem válida e reproduzível em estudos *in vitro*, nos quais utilizam IFN- γ e LPS como indutores de M1 e, IL-4, como indutor de M2. Esses indutores geram subgrupos do espectro amplamente aplicados em estudos. O IFN- γ ativa o fator de transcrição STAT1, que por sua vez ativa a expressão de genes para o fenótipo M1, caracterizado pela elevada produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Já IL-4 ativa o transdutor de sinal STAT6, que desencadeia uma série de sinalizações para a expressão de genes associados ao fenótipo M2, com altas produções de IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β , evidenciando os efeitos contrastantes desses estímulos (Brancewicz *et al.*, 2025; Murray *et al.*, 2014).

Considerando o exposto, este trabalho utilizou a linhagem J774A.1 de macrófagos, um modelo bem estabelecido e amplamente empregado em pesquisas na área de imunologia, para a padronização da polarização de macrófagos. Os níveis elevados de TNF- α e IL-6 após 24h e 48h de indução sugerem que houve polarização para M1.

Em ambos os tempos, os níveis de IL-10, importante marcador do perfil M2, permaneceram semelhantes ao controle (M0), mas apresentaram alta variabilidade, o que pode comprometer sua interpretação. Importante destacar que o modelo de polarização de macrófagos M2 do presente trabalho foi M2a (induzido por IL-4), especializados em secretar substâncias pró-fibróticas como TGF- β , fator de crescimento semelhante à insulina e fibronectina (Sica; Mantovani, 2012; Xia *et al.*, 2023). Assim, observamos que a avaliação da IL-10 pode não ter sido a melhor escolha para a verificação. Por isso, futuros ensaios serão conduzidos para avaliar TGF- β , um marcador mais promissor.

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) não são muito conclusivos, embora tenham demonstrado algumas diferenças importantes. O grupo M0 mostrou-se homogêneo, o que não é algo inesperado, pois pode ser apenas um reflexo de sua plasticidade basal. Os grupos M0 e M2 foram mais semelhantes entre si, enquanto o grupo M1 se destacou pelo seu formato mais alongado, como esperado. Os resultados dos grupos M1 e M0 estão de acordo com a literatura, mas as células M2 geralmente são descritas como heterogêneas com formato “spindeloides” alongadas com extensões citoplasmáticas nos polos e como macrófagos gigantes multinucleados (MNGs) repletos de projeções citoplasmáticas (Heinrich *et al.*, 2017). Esses resultados observados coincidem parcialmente com o trabalho de Ribeiro *et al.* (2022), que utilizou metodologia de indução semelhante. Assim como no presente estudo, também não foram observadas diferenças morfológicas entre M0 e M2, o que pode ser atribuído a condições

de cultivo ou a uma variação basal. Apesar disso, a polarização para M2 foi confirmada pelos altos níveis de IL-10 (Ribeiro *et al.*, 2022).

A proteína SmCyp analisada neste trabalho não induziu proliferação celular, e a viabilidade das células foi preservada. Em contraste, Liu *et al.* (2019) demonstraram que vesículas extracelulares do *S. japonicum* (SjEVs) promoveram a proliferação de macrófagos RAW264.7 e estimularam a produção de TNF- α , uma citocina típica da resposta da resposta Th1. Isso pode estar relacionado ao estímulo Th1 precoce frequentemente observada nas fases iniciais da infecção, podendo atuar como um mecanismo de desvio imunológico que facilitam sua instalação inicial. Por sua vez, Sun *et al.* (2012) relataram que a proteína recombinante rSj16 de *S. japonicum* inibiu a proliferação celular de macrófagos RAW264.7 ativados com LPS, reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumentou IL-10, associada à resposta Th2, indicando um efeito anti-inflamatório. Esses achados são condizentes com o fato de que Sj16 está altamente expressa nas secreções do esquistossômulo, estágio inicial do parasita no hospedeiro, interagindo diretamente com seu sistema imune e contribuindo para a evasão imunológica.

No presente estudo, macrófagos tratados com SmCyp apresentaram liberação de TNF- α superior ao M0 e similar ao M1 após 24 h, mas esse efeito não se manteve em 48 horas. A produção de IL-6 foi mínima, e os níveis de NO permaneceram no mesmo padrão do controle celular, não estimulando o perfil inflamatório característico de M1, que, por sua vez, apresentou níveis expressivos de produção de IL-6 como esperado.

O estado regulatório via IL-10 também não foi detectado, pois os níveis dessa citocina ficaram próximos ao controle celular, mesmo no protocolo de indução com IL-4. Dessa forma, embora os ensaios com a proteína SmCyp a 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 e 48 horas tenham mostrado indícios de efeitos *in vitro* que evidenciam uma característica imunomoduladora, não houve confirmação em todos os testes.

Alguns estudos mostraram que antígenos solúveis do *Schistosoma spp.* induzem o perfil M1 (Xu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). Além disso, evidências *in vitro* e *in vivo* mostraram efeitos de indução M1 utilizando vesículas extracelulares de *S. japonicum* também promoveram esse perfil de ativação (Wang *et al.*, 2015). Já Assunção *et al.* (2017) identificaram que a lisofosfatidilcolina, derivada de esquistossomos, foi capaz de induzir o perfil M2 via receptor PPAR- γ . Adicionalmente, diversas proteínas também já foram identificadas como estimuladoras do perfil M2, como a RNase T2 Sj-CP1412 que aumentou de Agr-1, IL-10 *in vitro*; a Sj16 amenizou marcadores inflamatórios e aumentou IL-10 *in vitro* e *in vivo*; e a

cistatina Sj-Cys também teve um efeito semelhante observado em outro estudo (Li *et al.*, 2020; Xia *et al.*, 2021).

Explorando a possibilidade de atuação dessas proteínas nas doenças crônicas não transmissíveis como o Diabetes, acredita-se que um dos fatores que contribuem para a resistência à insulina seja a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e a intensificação do processo inflamatório, com um aumento na concentração de citocinas pró-inflamatórias, alto índice de M1/M2 e alto índice de NO, associado a desregulação no ciclo de Krebs e acúmulo de citrato (Palmieri; Mcginity, 2020). Embora alguns estudos sugeriram que o NO possa aumentar o consumo de glicose, sua alta concentração está relacionada com a inibição desse consumo. Fite *et al.* (2015) estudaram o papel do óxido nítrico na sinalização da insulina em modelo *in vitro* com co-cultura de macrófagos e adipócitos. O alto índice de NO demonstrou uma relação direta com a diminuição do consumo de glicose, embora também tenha sido observado, um aumento do transporte de GLUT1, sugerindo consumo não dependente de insulina.

Em um outro estudo *in vivo*, investigou-se a ligação entre ubiquitina-ligase MDM2 e as vias da iNOS, NO e do fator transcricional HIF-1 α que está intimamente associado à glicólise e inflamação no tecido adiposo. A MDM2 estabiliza iNOS o que leva a um aumento na produção de óxido nítrico (NO), que por sua vez promove a s-nitrosilação de HIF-1 α , ativando este fator transcricional para induzir respostas glicolíticas e pró-inflamatórias em macrófagos M1. Assim, o estudo mostrou que o NO proveniente da iNOS não é apenas um subproduto, mas ele também atua na amplificação da resposta inflamatória de M1 (Wu *et al.*, 2024).

Já foi estudado também *in vivo* que, durante a infecção do *Schistosoma mansoni*, há uma produção de NO inicialmente que é, posteriormente, modulada por uma transição para resposta Th2, principalmente pela produção de IL-4 (Brunet *et al.*, 1999).

Os resultados do presente estudo coincidem com a literatura, uma vez que o grupo M1 apresentou um aumento expressivo da produção de NO em relação ao controle celular, sendo ainda maior no tempo de exposição maior de 48 h (Kashfi; Kannikal; Nath, 2021). Em contrapartida, um perfil semelhante era esperado do grupo com LPS, sugerindo possíveis falhas experimentais como ativação inadequada do LPS ou concentração insuficiente para detecção de NO. Quanto às proteínas do verme, as proteínas totais e a recombinante não estimularam a produção de NO nas condições testadas, mantendo seus níveis próximos ao controle celular, sem se aproximar do comportamento do grupo M1

A proteína total do *Schistosoma mansoni* foi obtida a partir do macerado do verme adulto, contendo uma mistura complexa de proteínas solúveis como enzimas, proteínas

estruturais, proteínas de superfície, glicoproteínas e antígenos (SWA). Este extrato é muito interessante e útil como controle comparativo, para obtenção dos efeitos complexos da interação dos macrófagos com os antígenos solúveis totais, assim como para comparação com os efeitos de uma única proteína (SmCyp).

Além disso, tal extrato também poderia ser avaliado como um candidato para aplicações terapêuticas, dado que a diversidade de antígenos pode potencializar a resposta fisiológica por meio da ativação de múltiplos receptores de reconhecimento, aproximando-se de uma simulação de infecção. Esse extrato proteico é frequentemente empregado na literatura para investigar polarização fenotípica e mecanismos imunomodulatórios em modelos *in vitro*, muitas vezes induzindo o perfil inflamatório M1 (Zhu *et al.*, 2014; Licá *et al.*, 2023), o que não é interessante como estratégia terapêutica para síndromes metabólicas associadas a inflamação, mas pode ser considerada para outros estudos relacionados a imunoterapia antitumoral ou em adjuvantes vacinais. A concentração utilizada foi determinada experimentalmente em estudos não mostrados realizados pelo grupo de pesquisa, de modo a selecionar uma dosagem com que não afetasse a viabilidade celular nos tempos de incubação determinados.

Em suma, a proteína recombinante SmCyp, nas concentrações e períodos de incubação testados, não atuou na polarização de macrófagos no modelo *in vitro*, embora os níveis elevados de TNF- α detectados sugiram algum potencial modulador a ser explorado conforme demonstrado em estudos com essa proteína (Melo *et al.*, 2019). Dessa forma, a SmCyp, nas condições deste estudo, não se caracteriza como candidata promissora para compor imunoterapias voltadas ao controle de doenças imunometabólicas, como o DM2. Ainda assim, os achados indicam que a proteína induziu o perfil inflamatório moderado, sem comprometer a viabilidade celular, sugerindo um perfil de segurança relevante para desenvolvimento de produtos biológicos, como vacinas e imunoterapias. Essa perspectiva é reforçada por estudos previamente citados, os quais demonstraram efeitos promissores nesse contexto (Zhu *et al.*, 2014, Licá *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÃO

Em síntese, os dados sugerem que a proteína recombinante SmCyp do *S. mansoni*, nas concentrações e tempos de exposição avaliados, não afeta de forma significativa a viabilidade ou morfologia dos macrófagos J774A.1. No que se refere à modulação imune, a SmCyp apresentou capacidade limitada de induzir citocinas inflamatórias, com produção discreta de TNF- α após 24 horas. Apesar disso, não promoveu a liberação de NO e IL-6, marcadores característicos da polarização de macrófagos do tipo M1, assim como não liberou níveis significativos de IL-10, sugerindo um estímulo moderado. A ausência de ativação desses mediadores também é relevante, indicando uma atuação seletiva e possivelmente estratégica na interface com o sistema imune. Esses achados contribuem para a compreensão das interações parasito-hospedeiro e o potencial papel da SmCyp na resposta imune durante a esquistossomose, mas não se mostrou promissora para o desenvolvimento de imunoterápicos para doenças inflamatórias de baixo grau associada a obesidade, como o DM2. No entanto, o fato de não desencadear resposta inflamatória intensa abre novas perspectivas, especialmente no contexto de formulações combinadas com outras moléculas do *S. mansoni*, ou como componente em estratégias vacinais ou alguns tipos de imunoterapias – áreas nas quais uma modulação imune equilibrada pode ser benéfica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C. L. S.; SANTIAGO, L. F.; SANTANA, M. B. R.; FIGUEIREDO, B. C. P.; MORAIS, S. B.; OLIVEIRA, S. C.; PACHECO, L. G. C.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; PINHEIRO, C. S. Immunomodulatory properties of *Schistosoma mansoni* proteins Sm200 and SmKI-1 in vitro and in a murine model of allergy to the mite *Blomia tropicalis*. **Molecular Immunology**, v. 124, p. 91–99, ago. 2020.
- AMER, A. S.; OTHMAN, A. A. A.; DAWOOD, L. M.; EL-NOUBY, K. A.; GOBERT, G. N.; ABOU RAYIA, D. M. The interaction of *Schistosoma mansoni* infection with diabetes mellitus and obesity in mice. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 9417, 2023
- ASSUNÇÃO, L. S. S. et al. *Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine triggers M2 polarization of macrophages through PPAR γ dependent mechanisms*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 2, p. 246–254, 2017.
- ATES, G.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, Vera; RODRIGUES, R. M. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. In: **Methods in Molecular Biology**, 2017.
- BRANCEWICZ, J.; WÓJCIK, N.; SARNOWSKA, Z.; ROBAK, J.; KRÓL, M. The multifaceted role of macrophages in biology and diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 5, p. 2107, 2025.
- BREITSAMETER, I.; FRAN, L. C. R.; CARVALHO, C. B. D. DIABETES MELITO. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 217-221, 1994.
- BRUNET, L. R.; BEALL, M.; DUNNE, D. W.; PEARCE, E. J. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 9, p. 4976–4984, 1999.
- BUGLI, F.; KHATTAB, A.; VIGNETI, E.; BUTLER, R.; CIOLI, D.; KLINKERT, M. Q. Expression cloning and biochemical characterizations of recombinant cyclophilin proteins from *Schistosoma mansoni*. **Protein Expression and Purification**, v. 12, n. 3, p. 340–346, 1998.
- CASTRO, C. A. D. et al. Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. **Int J Exp Pathol**, v. 98, n. 1, p. 26-36, 2016.
- CHEN, S.; SAEED, A. F. U. H.; LIU, Q.; JIANG, Q.; XU, H.; XIAO, G. G.; RAO, L.; DUO, Y.. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 207, 22 maio 2023.
- CROWTHER, J. R. *The ELISA guidebook*. **Methods in Molecular Biology**, v. 149, p. III-IV, 1–413, 2000.
- DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Stressed out about obesity and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 12, n. 1, p. 41–42; discussion 42, jan. 2006.

FITE, A.; ABOU-SAMRA, A. B.; SEYOUM, B. Macrophages inhibit insulin signalling in adipocytes: role of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, n. 1, p. 36-43, fev. 2015.

FLOUDAS, A.; CLUXTON, C. D.; FAHEL, J.; KHAN, A. R.; SAUNDERS, S. P.; AMU, S.; ALCAMI, A.; FALLON, P. G. Composition of the *Schistosoma mansoni* worm secretome: Identification of immune modulatory Cyclophilin A. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 26 out. 2017.

FRAGELLI, B. D. D. L. Efeito das enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) no tratamento da esquistossomose experimental. UFSCar, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-111, 2018.

GOMES, B. F.; ACCARDO, C. D. M. Immunoinflammatory mediators in the pathogenesis of diabetes mellitus. **Einstein**, Brasil, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2018.

GOYAL, R.; JIALAL, I. Type 2 Diabetes. In: STATPEARLS [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>. Acesso em: 20 mai. 2025
GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131–138, 1982.

HAEBERLEIN, Simone; OBIEGLO, Katja; OZIR-FAZALALIKHAN, Arifa; CHAYÉ, Mathilde A. M.; VENINGA, Henrike; VAN DER VLUGT, Luciën E. P. M.; VOSKAMP, Astrid; BOON, Louis; DEN HAAN, Joke M. M.; WESTERHOF, Lotte B.; WILBERS, Ruud H. P.; SCHOTS, Arjen; SCHRAMM, Gabriele; HOKKE, Cornelis H.; SMITS, Hermelijn H. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 7, p. e1006539, 2017.

HEINRICH, Franziska; LEHMBECKER, Annika; RADDATZ, Barbara B.; KEGLER, Kristel; TIPOLD, Andrea; STEIN, Veronika M.; KALKUHL, Arno; DESCHL, Ulrich; BAUMGÄRTNER, Wolfgang; ULRICH, Reiner; SPITZBARTH, Ingo. Morphologic, phenotypic, and transcriptomic characterization of classically and alternatively activated canine blood-derived macrophages in vitro. **PLoS One**, v. 12, n. 8, e0183572, 17 ago. 2017.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F.; ATKINSON, R. L.; SPIEGELMAN, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 95, n. 5, p. 2409–2415, maio 1995. DOI: 10.1172/JCI117936.

HUSSAARTS, L.; GARCÍA-TARDÓN, N.; VAN BEEK, L.; HEEMSKERK, M. M.; HAEBERLEIN, S.; VAN DER ZON, G. C.; OZIR-FAZALALIKHAN, A.; BERBÉE, J. F.; WILLEMS VAN DIJK, K.; VAN HARMELEN, V.; YAZDANBAKHSI, M.; GUIGAS, B. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. **FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 3027–3039, 2015.

KASHFI, Khosrow; KANNIKAL, Jasmine; NATH, Niharika. Macrophage reprogramming and cancer therapeutics: role of iNOS-derived NO. **Cells**, v. 10, n. 11, art. 3194, 16 nov. 2021.

GUIGAS, Bruno; MOLOFSKY, Ari B. A worm of one's own: how helminths modulate host adipose tissue function and metabolism. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 9, p. 435-441, set. 2015

KRAAKMAN, Michael James; MURPHY, Andrew James; JANDELEIT-DAHM, Karin; KAMMOUN, Hélène L. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 470, 25 set. 2014.

KRISTIANSEN, Ole P.; MANDRUP-POULSEN, Thomas. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? **Diabetes**, v. 54, supl. 2, p. S114–S124, 2005.

LEE, Chi Ho; LAM, Karen S. L. Obesity-induced insulin resistance and macrophage infiltration of the adipose tissue: a vicious cycle. *Journal of Diabetes Investigation*, v. 10, n. 1, p. 29–31, 24 set. 2018

LI, Jinghui; ZHUANG, Wenjia; CONG, Li; SHI, Wenjun; CAI, Xingyan; HUANG, Fengjuan; LIAO, Yiteng; LIU, Yiyang; LI, Jun; CHEN, Chunxia; CHEN, Xiao-Ping. Cyclophilin A from *Schistosoma japonicum* promotes a Th2 response in mice. **Parasites & Vectors**, v. 6, art. 330, 2013.

LI, J.; LIU, H.; JIANG, J.; SHE, X.; NIU, Y.; MING, Y. The potential role of schistosome-associated factors as therapeutic modulators of the immune system. **Infection and immunity**, v. 88, n. 8, e00754-19, 21 jul. 2020.

LIC A, I. C.; FRAZ AO, G. C. C. G.; NOGUEIRA, R. A.; LIRA, M. G. S.; SANTOS, V. A. F.; RODRIGUES, J. G. M.; MIRANDA, G. S.; CARVALHO, R. C.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M. Immunological mechanisms involved in macrophage activation and polarization in schistosomiasis. **Cambridge University Press**, 05 jan. 2023.

LIU, Juntao; ZHU, Lihui; WANG, Jianbin; QIU, Lin; CHEN, Yongjun; DAVIS, Richard E.; CHENG, Guofeng. *Schistosoma japonicum* extracellular vesicle miRNA cargo regulates host macrophage functions facilitating parasitism. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, e1007817, 4 jun. 2019.

LUMENG, Carey N.; SALTIEL, Alan R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2111–2117, 2011.

MACDONALD, Andrew S.; ARAUJO, Maria Ilma; PEARCE, Edward J. Immunology of parasitic helminth infections. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 427-433, fev. 2002.

MAGALHÃES, Andr ea et al. Cytokine profile associated with human chronic schistosomiasis mansoni. **Mem orias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 21-26, 2004.

MAIZELS, Rick M.; MCSORLEY, Henry J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. **Elsevier**, USA, v. 138, n. 3, p. 666-675, 2016.

MAIZELS, Rick M.; SMITS, Hermelijn H.; MCSORLEY, Henry J. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. **Elsevier**, USA, v. 49, n. 5, p. 801-818, 2018.

MELO, T. T. D. et al. The *Schistosoma mansoni* cyclophilin A epitope 107-121 induces a protective immune response against schistosomiasis. Elsevier, EUA, v. 111, n. 1, p. 172-181, 2019.

MORAIS, Suellen B.; FIGUEIREDO, Barbara C.; ASSIS, Natan R. G.; ALVARENGA, Debora M.; DE MAGALHÃES, Mariana T. Q.; FERREIRA, Rafaela S.; VIEIRA, Angélica T.; MENEZES, Gustavo B.; OLIVEIRA, Sergio C. *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 2, fev. 2018.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MURRAY, Peter J.; ALLEN, Judith E.; BISWAS, Subhra K.; FISHER, Edward A.; GILROY, Derek W.; GOERDT, Sergij; GORDON, Siamon; HAMILTON, John A.; IVASHKIV, Lionel B.; LAWRENCE, Toby; LOCATI, Massimo; MANTOVANI, Alberto; MARTINEZ, Fernando O.; MEGE, Jean-Louis; MOSSER, David M.; NATOLI, Gioacchino; SAEIJ, Jeroen P.; SCHULTZE, Joachim L.; SHIREY, Kari Ann; SICA, Antonio; WYNN, Thomas A. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, 17 July 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Relatório Global sobre Doenças Tropicais Negligenciadas 2023*. Genebra: Organização Mundial da Saúde, 2023. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/365729>. Acesso em: 17 mar. 2025

PALMIERI, Erika M.; MCGINITY, Christopher; WINK, David A.; MCVICAR, Daniel W. Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight. *Metabolites*, v. 10, n. 11, p. 429, 2020

PEARCE, Edward J.; KANE, Colleen M.; SUN, Jie; TAYLOR, Justin J.; MCKEE, Amy S.; CERVI, Laura. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 117–126, 2004.

RIBEIRO, A. R. B.; SILVA, E. C. O.; ARAÚJO, P. M. C.; SOUZA, S. T.; FONSECA, E. J. da S.; BARRETO, E. Application of Raman spectroscopy for characterization of the functional polarization of macrophages into M1 and M2 cells. **Vibrational Spectroscopy**, v. 116, 103278, 2021

QIN, Hongwei; WILSON, Cynthia A.; LEE, Sun Jung; ZHAO, Xueyan; BENVENISTE, Ety N. LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF- κ B and STAT-1 α in macrophages and microglia. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3114–3122, 14 jul. 2005

REPETTO, Guillermo; DEL PESO, Ana; ZURITA, Jorge L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125-1131, 2008..

REYES, J. L.; TERRAZAS, L. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 609–619, 2007.

ROHM, Theresa V.; MEIER, Daniel T.; OLEFSKY, Jerrold M.; DONATH, Marc Y. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. **Immunity**, 2022.

ROMAGNANI, Sergio. Th1 and Th2 in human diseases. **Clinical Immunology and Immunopathology**, San Diego, v. 80, n. 3, p. 225–235, set. 1996.

SALTZMAN, B. E. Colorimetric microdetermination of NO₂ in the atmosphere. **Analytical Chemistry**, v. 20, p. 1949–1954, 1963.

SANIN, David E.; MOUNTFORD, Adrian P. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. **Parasites & Vectors**, v. 8, art. 1, 2015.

SANTOS, Clara Louise Barreto Xavier dos. Análise do potencial imunomodulador de proteínas recombinantes do *Schistosoma mansoni*, no diabetes tipo 2. 2021. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretriz SBD 2023*. Disponível em: <https://diretriz.diabetes.org.br/>. Acesso em: 20 mai. 2025

SHIELS, Jenna; CWIKLINSKI, Krystyna; ALVARADO, Raquel; THIVIERGE, Karine; COTTON, Sophie; GONZALES SANTANA, Bibiana; TO, Joyce; DONNELLY, Sheila; TAGGART, Clifford C.; WELDON, Sinead; DALTON, John P. *Schistosoma mansoni* immunomodulatory molecule Sm16/SPO-1/SmSLP is a member of the trematode-specific helminth defence molecules (HDMs). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, jul. 2020.

SICA, Antonio; MANTOVANI, Alberto. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, [S.l.], v. 122, n. 3, p. 787-795, mar. 2012.

SUN, Xi *et al.* Effects of a recombinant schistosomal-derived anti-inflammatory molecular (rSj16) on the lipopolysaccharide (LPS)-induced activated RAW264.7. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2429–2437, 2012.

TANG, Chun-Lian; LIU, Zhi-Ming; GAO, Yan Ru; XIONG, Fei. *Schistosoma* infection and *Schistosoma*-derived products modulate the immune responses associated with protection against type 2 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 8, art. 1990, 17 jan. 2018.

WANG, Lifu; LI, Zhitao; SHEN, Jia; LIU, Zhen; LIANG, Jinyi; WU, Xiaoying; SUN, Xi; WU, Zhongdao. Exosome-like vesicles derived by *Schistosoma japonicum* adult worms mediates M1 type immune-activity of macrophage. *Experimental Parasitology*, v. 114, p. 1865–1873, 2015.

WANG, Xia; BAO, Wei; LIU, Jun; OUYANG, Ying-Ying; WANG, Di; RONG, Shuang; XIAO, Xiao; SHAN, Zhi-Lei; ZHANG, Yan; YAO, Ping; LIU, Lie-Gang. Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 36, n. 1, p. 166–175, 2013.

WAQAS, S. F. H.; AMPEM, G.; RÖSZER, T. Analysis of IL-4/STAT6 Signaling in Macrophages. In: BADR, M. (ed.). **Nuclear Receptors Methods in Molecular Biology**, v. 1966. Humana, New York, NY, 2019.

WENSVEEN, Felix M.; VALENTIĆ, Sonja; ŠESTAN, Marko; TURK WENSVEEN, Tamara; POLIĆ, Bojan. The “Big Bang” in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2446–2456, set. 2015.

WIRIA, Aprilianto Eddy; DJUARDI, Yenny; SUPALI, Taniawati; SARTONO, Erliyani; YAZDANBAKHSI, Maria. Helminth infection in populations undergoing epidemiological transition: a friend or foe? **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 889-901, nov. 2012.

WU, Kelvin Ka-lok; XU, Xiaofan; WU, Manyin; LI, Xiaomu; HOQUE, Moinul; LI, Gloria Hoi Yee; LIAN, Qizhou; LONG, Kekao; ZHOU, Tongxi; PIAO, Hailong; XU, Aimin; HUI, Hannah Xiaoyan; CHENG, Kenneth King-yip. MDM2 induces pro-inflammatory and glycolytic responses in M1 macrophages by integrating iNOS-nitric oxide and HIF-1 α pathways in mice. **Nature Communications**, v. 15, art. 8624, 2024.

XIE, H.; WU, L.; CHEN, X.; GAO, S.; LI, H.; YUAN, Y.; LIANG, J.; WANG, X.; WANG, S.; XU, C.; CHU, L.; ZHAN, B.; ZHOU, R.; YANG, X. Schistosoma japonicum cystatin alleviates sepsis through activating regulatory macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 23 fev. 2021.

XIA, Tingting; ZHANG, Meng; LEI, Wei; YANG, Ruilin; FU, Shengping; FAN, Zhenhai; YANG, Ying; ZHANG, Tao. *Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization*. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 14, p. 1–14, 3 abr. 2023.

XIA, Chang; RAO, Xiaoquan; ZHONG, Jixin. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes Associated Inflammation. **J Diabetes Res** v. 2017, n. 1, p. 1-6, 2017.

XU, Jingwei; ZHANG, Hao; CHEN, Lin; ZHANG, Donghui; JI, Minjun; WU, Haiwei; WU, Guanling. Schistosoma japonicum infection induces macrophage polarization. **Journal of Biomedical Research**, v. 28, n. 4, p. 299–308, 29 jan. 2014.

ZACCONE, Paola; FEHÉRVÁRI, Zoltán; JONES, Frances M.; SIDOBRE, Stéphane; KRONENBERG, Mitchell; DUNNE, David W.; COOKE, Anne. Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1439–1447, 2003.

ZHAO, Wenjing et al. *M2 macrophage polarization: a potential target in pain relief*. *Frontiers in Immunology*, [S.l.], v. 14, 28 ago. 2023. Seção: Inflammation.

ZHU, J.; XU, Z.; CHEN, X.; et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 122, 2014.