



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

---

**ADRIELE ATAÍDES DE QUEIROZ**

**EXPRESSÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS, CITOCINAS E ALTERAÇÃO  
HORMONAL DO COLOSTRO DE MÃES COM GIARDÍASE**

Belo Horizonte – MG

2023

ADRIELE ATAIDES DE QUEIROZ

**EXPRESSÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS, CITOCINAS E ALTERAÇÃO  
HORMONAL DO COLOSTRO DE MÃES COM GIARDÍASE**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia  
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes  
Coorientadora: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honorio França

Belo Horizonte – MG

2023

043

Queiroz, Adriele Ataides de.

Expressão de células T regulatórias, citocinas e alteração hormonal do colostro de mães com giardíase [manuscrito] / Adriele Ataides de Queiroz. – 2023.

76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes. Coorientadora: Profa. Dra. Adenilda Cristina Honorio França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Colostro. 3. Hidrocortisona. 4. Giardia lamblia. 5. Melatonina. 6. Linfócitos T Reguladores. I. Gomes, Maria Aparecida. II. França, Adenilda Cristina Honorio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TESE 339/2023/01**

**TÍTULO DA TESE: "EXPRESSÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS, CITOCINAS E ALTERAÇÃO HORMONAL DO COLOSTRO DE MÃES COM GIARDÍASE"**

**ALUNA: ADRIELE ATAIDES DE QUEIROZ**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e sete de fevereiro de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

**Danny Laura Gomes Fagundes Triches**

Membro externo - UFMT

**Tassiane Cristina Moraes**

Membro externo - EMESCAM

**Adriana Oliveira Costa**

Membro interno - UFMG

**Helena Keiko Toma**

Membro externo- UFRJ

**Adenilda Cristina Honorio França**

Coorientadora - UFMT

**Maria Aparecida Gomes**

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Gomes, Servidor(a)**, em 27/02/2023, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helena Keiko Toma, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 20:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danny Laura Gomes Fagundes Triches, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 08:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 28/02/2023, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adenilda Cristina Honorio França, Usuário Externo**, em 28/02/2023, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tassiane Cristina Moraes, Usuária Externa**, em 28/02/2023, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2057576** e o código CRC **2A448B79**.

Referência: Processo nº 23072.205596/2023-99

SEI nº 2057576

*Dedico esta tese a Deus, meu mestre maior, pela dádiva da vida. Carinhosamente aos meus Pais, Julia e Valdivino, minha base e motivação para enfrentar a vida. E a toda minha família e amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela graça da vida, pela minha saúde, e por ser a fortaleza nos momentos de dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Valdivino e Julia, que são minha base, exemplos e motivação para continuar a luta da vida. Agradeço a minha irmã, Adriana, por toda ajuda e apoio ao longo dos anos.

A toda minha família materna e paterna, pelo apoio, carinho e motivação nessa fase da minha vida. Sou grata pela vida de todos.

Aos meus amigos pelo companheirismo e momentos de alegria que por vezes aliviam os momentos difíceis da vida.

As queridas mães que gentilmente aceitaram participar da minha pesquisa, permitindo a coleta de colostro, mesmo em momento desafiador como o puerpério, abriram as portas de suas casas e nos receberam com muito carinho. Sem vocês essa pesquisa não teria sido possível.

A minha companheira de coleta, Gabriella, que esteve comigo durante quase 8 meses, numa rotina de domingo a domingo, em busca de mães participantes para nossas pesquisas. Obrigada pela ajuda, apoio e companheirismo.

Agradeço a toda equipe do Pronto Socorro Municipal de Barra do Garças – MT, por nos recepcionar e permitir que pudéssemos entrevistar as mães.

Agradeço a Mahmi, Leticia, André e Gabriella pela ajuda na fase experimental. Obrigado por me acompanharem nas rotinas laboratoriais. E a querida professora Danny Laura, pela ajuda na análises de alguns dados desse estudo.

Agradeço a toda equipe ao Laboratório de Cronoimunomodulação e ao Laboratório de Imunologia da Relação Materno Infantil da UFMT, que em algum momento contribuíram para a realização dessa pesquisa, além da possibilidade de uso de toda estrutura física, com os equipamentos e reagentes para análises.

Agradeço a Universidade Federal de Mato Grosso, onde dei início a minha formação acadêmica. Ao programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Básicas e Aplicadas pela possibilidade de realização de alguns créditos pelo programa.

A Universidade Federal de Minas Gerais, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, todo seu corpo docente com quem pude aprender muito durante o período de realização dos créditos. E em especial as secretárias do programa, Sumara e Sibebe, por serem tão queridas e atenciosas.

Aos colegas que convivi durante a fase de disciplinas, que tornaram essa experiência muito agradável, foi um prazer conhece-los, conviver e aprender com cada um. Em especial as meninas, Talita, Andressa e Mariana que com elas pude estreitar os laços de amizade e ter a alegria de ter convivido com elas para além das salas do ICB. Sou grata pela amizade construída.

A todos do laboratório de Amebíase e parasitas intestinais (LAPI) da UFMG, por toda atenção e aprendizado pelo período que estive em Belo Horizonte. Em especial, ao Rafael, Rodrigo, Ruth e Andressa, que também podemos estreitar nossa convivência para além da faculdade. Todos foram muito queridos, gentis e atenciosos comigo, muito obrigada.

A professora Maria Aparecida, querida Cidinha, por ter me aceitado como sua orientada, por toda orientação, paciência e carinho comigo. Desde o dia que nos conhecemos, véspera do processo seletivo, e ali me orientou de forma certa para aprimorarmos a apresentação, o que foi importante para me garantir a aprovação. E assim se manteve nas orientações de como eu poderia me adequar a rotina do seu laboratório, tão bem cuidado. Obrigada pelos elogios e os diversos momentos de alegria, reflexo do seu alto astral.

Aos professores Adenilda e Eduardo que me acompanham já alguns anos, desde a iniciação científica e até esse momento do doutoramento, grata sou pelo quanto pude aprender com vocês durante todo esse tempo. Muito obrigada pelo apoio, orientação, conselhos e o carinho comigo. Sempre direi que além de mestres excepcionais, vocês são seres humanos maravilhosos. Muito obrigada por tudo!

Agradeço a querida Dona Neide, quem abriu as portas de sua casa e confiou a mim a intimidade do seu lar, onde pude me instalar pelos meses que morei em BH.

Sempre serei grata por todo carinho, cuidado e amizade comigo. Agradeço também a Vanessa e Samuel, que conheci pela Dona Neide, e também se tornaram especiais pra mim.

Deixo um agradecimento especial e emocionado a duas mulheres da minha vida que recentemente partiram para estarem ao lado do nosso senhor Deus, minha querida Tia Dade e querida Madrinha Marlene. Agradeço por terem sido exemplos pra mim de força feminina, luta e determinação. A saudade é e será sempre grande, mas sou grata por Deus ter me dado a honra de ter convivido com mulheres maravilhosas como vocês. Saudade eterna!

A Universidade Federal de Mato Grosso, que recentemente me tornei servidora, em especial a toda equipe do Laboratório de Patologia do HOVET, com quem divido minha rotina e posso compartilhar os momentos finais da conclusão dessa etapa da minha vida.

A CAPES pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Aos membros formadores da banca examinadora pela presença, ajuda e recomendações.

A todos que de forma direta ou indiretamente fizeram parte de toda minha trajetória na minha formação acadêmica, o meu muito obrigada.

*“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”*

*- Platão*

## RESUMO

O protozoário parasito *Giardia lamblia* infecta humanos e outros mamíferos, por meio da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com cistos. A giardíase acomete pessoas em todo o mundo, sobretudo crianças, constituindo uma das principais causas de diarreia no mundo. Por meio do colostro e leite materno, os recém-nascidos recebem diversos componentes bioativos capazes de impulsionar seu sistema imunológico e prevenir doenças diarreicas. Dentre esses componentes estão elementos imunoreguladores, como células T regulatórias (Tregs), citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , e hormônios, entre eles cortisol e melatonina, com capacidade imunomoduladora, que participam de vários aspectos relacionados ao sistema imunológico e constituem um importante mecanismo de defesa para proteção e tratamento de doenças parasitárias. Há uma escassez na literatura de estudos sobre os mecanismos regulatórios envolvidos durante a giardíase, sobretudo associada à amamentação, assim como o efeito dos hormônios cortisol e melatonina sobre células Tregs durante interações com *Giardia lamblia*. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os mecanismos imunoregulatórios envolvidos na infecção por *Giardia lamblia*, bem como a concentração dos hormônios melatonina e cortisol em colostro de mães soropositivas para giardíase. Amostras de colostro foram coletadas de nutrizas com idade entre 18 e 35 anos. As gestantes foram divididas em dois grupos de acordo com a soropositividade para IgM e IgG anti-*Giardia lamblia*, determinada por teste de ELISA, ficando como o grupo controle (IgG e IgM não reagentes N=6) e (IgG reagente N=6 e IgM reagente N=5). Por meio do teste de ELISA foram avaliadas as concentrações dos hormônios melatonina e cortisol presentes no sobrenadante de colostro. As concentrações das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  no sobrenadante foram determinadas por meio de citometria de fluxo, assim como a imunofenotipagem de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) presentes no colostro. No grupo soropositivo para IgM anti-*G. lamblia* a concentração do hormônio melatonina foi menor quando comparado ao grupo soronegativo, enquanto que no colostro de mães soropositivas para IgG anti-*G. lamblia* a concentração de melatonina foi maior. O percentual de células T regulatórias foi maior no colostro de mães reagentes para IgM anti-*G. lamblia*, assim como a concentração de TGF- $\beta$  nesse mesmo grupo. No colostro de mães soropositivas para IgG anti-*G. lamblia* a concentração do hormônio cortisol, percentual de células T regulatórias e concentração das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  foram similares as concentrações encontradas no colostro de mães soronegativas. Houve correlação positiva entre a concentração de melatonina e percentual de células Tregs no grupo soronegativo. Esses resultados sugerem uma possível ação da melatonina no contrabalanço da resposta imunoregulatória em infecção por *G. lamblia*.

**Palavras-Chave:** Colostro, Cortisol, *Giardia lamblia*, Melatonina, Treg.

## ABSTRACT

The protozoan parasite *Giardia lamblia* infects humans and other mammals by ingesting water and/or food contaminated with cysts. Giardiasis affects people all over the world, especially children, and is one of the main causes of diarrhea in the world. Through colostrum and breast milk, newborns receive several bioactive components that can boost their immune system and prevent diarrheal diseases. Among these components are immunoregulatory elements, such as regulatory T cells (Tregs), cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ , and hormones, including cortisol and melatonin, with immunomodulatory capacity, which participate in various aspects related to the immune system and constitute an important defense mechanism for protection and treatment of parasitic diseases. There is a scarcity in the literature of studies on the regulatory mechanisms involved during giardiasis, especially associated with breastfeeding, as well as the effect of the hormones cortisol and melatonin on Tregs cells during interactions with *Giardia lamblia*. Thus, the aim of this study was to evaluate the immunoregulatory mechanisms involved in *Giardia lamblia* infection, as well as the concentration of the hormones melatonin and cortisol in colostrum from giardiasis-seropositive mothers. Colostrum samples were collected from nursing mothers between the ages of 18 and 35 years. The pregnant women were divided into two groups according to seropositivity for IgM and IgG anti-*Giardia lamblia*, determined by ELISA test, being the control group (IgG and IgM non reagent N=6) and (IgG reagent N=6 and IgM reagent N=5). By means of ELISA the concentrations of the hormones melatonin and cortisol present in the colostrum supernatant were evaluated. The concentrations of the cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  in the supernatant were determined by flow cytometry, as well as the immunophenotyping of regulatory T cells (CD4+CD25+FOXP3+) present in colostrum. In the group seropositive for IgM anti-*G. lamblia* the concentration of the hormone melatonin was lower when compared to the seronegative group, while in the colostrum of mothers seropositive for IgG anti-*G. lamblia* the concentration of melatonin was higher. The percentage of regulatory T cells was higher in colostrum from anti-*G. lamblia* IgM reagent mothers, as was the concentration of TGF- $\beta$  in this same group. In colostrum from anti-*G. lamblia* IgG-seropositive mothers, the concentration of the hormone cortisol, percentage of regulatory T cells, and concentration of the cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  were similar to those found in colostrum from seronegative mothers. There was a positive correlation between melatonin concentration and percentage of Tregs cells in the seronegative group. These results suggest a possible action of melatonin in counterbalancing the immunoregulatory response in *G. lamblia* infection.

**Keywords:** Colostrum, Cortisol, *Giardia lamblia*, Melatonin, Treg.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do delineamento experimental do estudo .....	38
Figura 2 - Curva ROC, indicando o ponto de corte da reação (cut-off) IgM .....	40
Figura 3 - Curva ROC, indicando o ponto de corte da reação (cut-off) IgG.....	41
Figura 4 - Concentração de melatonina (pg/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgM Anti-G. <i>lamblia</i> .....	42
Figura 5 - Concentração de melatonina (pg/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgG Anti-G. <i>lamblia</i> .....	42
Figura 6 - Concentração de cortisol (ng/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgM Anti-G. <i>lamblia</i> .....	43
Figura 7 - Concentração de cortisol (ng/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgG Anti-G. <i>lamblia</i> .....	43
Figura 8 - Percentual de células T regulatórias no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgM Anti-G. <i>lamblia</i> .....	44
Figura 9 - Percentual de células T regulatórias no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgG Anti-G. <i>lamblia</i> .....	44
Figura 10 - Concentração de IL-10 (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgG Anti-G. <i>lamblia</i> .....	45
Figura 11 - Concentração de TGF- $\beta$ (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgG Anti-G. <i>lamblia</i> .....	45
Figura 12. Concentração de IL-10 (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgM Anti-G. <i>lamblia</i> .....	46
Figura 13. Concentração de TGF- $\beta$ (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgM Anti-G. <i>lamblia</i> .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação entre a concentração do hormônio melatonina e cortisol, percentual de células Tregs e citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ . .....	47
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ANOVA	Análise de Variância
APC's	<i>Antigen Presenting Cells</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DCs	<i>Dendritic Cell</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FOX	<i>Forkhead box</i>
FOXP3	<i>Forkhead box protein 3</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IBL	<i>Imuno-Biological Laboratories</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IPEX	<i>Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked</i>
iTregs	<i>Induced Tregs</i>
MHC-II	<i>Major histocompatibility complex II</i>
MLT	Melatonina

NaCl	Cloreto de sódio
NK	<i>Natural Killer Cell</i>
NO	Óxido nítrico
nTregs	<i>Natural Treg</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenilenoldiamino
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PFOR	Piruvato-ferredoxina oxidorreductase
PHMB	<i>4-hydroxymercuri Benzoic Acid</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPM	Rotação por minuto
SD	Desvio padrão
S-IgA	Imunoglobulina A secretória
SSC	<i>Side Scatter</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH-1	<i>T helper 1</i>
TH-2	<i>T helper 2</i>
TLCK	<i>Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TREGs	Células T regulatórias
VSPs	<i>Variant-specific Surface Proteins</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. JUSTIFICATIVA .....	31
3. OBJETIVOS .....	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1 Caracterização das amostras .....	33
4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	33
4.2.1 Critérios de inclusão.....	33
4.2.2 Critérios de exclusão .....	33
4.3 Definição das variáveis .....	33
4.3.1 Variáveis de controle .....	33
4.3.2 Variáveis independentes .....	34
4.3.3 Variáveis dependentes .....	34
4.4 Métodos de coleta e avaliação.....	34
4.4.1 Obtenção de sobrenadante e células de colostro humano .....	34
4.5 Determinação da reatividade para <i>G. lamblia</i> pelo método de ELISA (Ensaio Imunoenzimático).....	35
4.6 Dosagem da concentração de melatonina no sobrenadante de colostro ...	36
4.7 Dosagem da concentração do cortisol no sobrenadante de colostro .....	36
4.8 Imunofenotipagem.....	37
4.9 Quantificação de citocinas (IL-10 e TGF- $\beta$ ) no sobrenadante de colostro ..	37
4.10 Análise Estatística.....	38
4.11 Aspectos Éticos .....	38
4.12 Fluxograma Experimental.....	39
5. RESULTADOS .....	40
5.1 ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM e IgG para <i>G. lamblia</i> no sobrenadante de colostro.....	40
5.2 Concentração dos hormônios melatonina e cortisol no sobrenadante de colostro .....	41
5.3 Imunofenotipagem de células do colostro .....	43
5.4 Concentração das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ em sobrenadante de colostro .	44

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Giardia lamblia* (*G.lamblia*) (sinônimos *Giardia intestinalis*, *Giardia duodenalis*), agente etiológico da giardíase, é um protozoário que infecta humanos e outros mamíferos, por meio da ingestão de água e/ou alimentos contaminados com cistos (ADAM, 2001; RYAN *et al.*, 2019). De acordo com a morfologia o gênero *Giardia* pertence ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae (MORRISON *et al.*, 2007).

A giardíase acomete pessoas em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo responsável, anualmente, por mais de 280 milhões de casos de diarreia em humanos, contribuindo para a ocorrência de 1,6 milhões de óbitos por diarreia de diferentes causas no ano de 2016 (EINARSSON *et al.*, 2016; TROEGER *et al.*, 2018). A prevalência dessa parasitose em humanos varia de 2% a 7,6% em países industrializados e até 30% em países de baixa renda e/ou em desenvolvimento, onde doenças diarreicas são responsáveis por mais de 20% de mortes de crianças em países pobres. Em países mais desenvolvidos essa taxa é menor que 1% (FENG e XIAO, 2011; LIU *et al.*, 2019).

A prevalência de giardíase no Brasil varia entre 12,4%, na literatura estudo aponta que 50% dos casos ocorrem em crianças de zero a seis anos de idade (SANTANA *et al.*, 2014), enquanto outro aponta percentual de 50,8% de crianças infectadas com idades entre três e doze anos (FONSECA *et al.*, 2017). Uma revisão sistemática sobre a ocorrência de *G. lamblia* no Brasil demonstrou que o parasito está presente em todas as cinco regiões do país, com prevalência maior na região sudeste (COELHO *et al.*, 2017).

Atualmente são encontradas oito variações de genótipos de *G. lamblia*, sendo classificados de A a H, onde os genótipos A e B são os principais genótipos que infectam humanos e outros mamíferos, dentre eles alguns animais domésticos como, cães e gatos, demonstrando alto potencial zoonótico de transmissão da doença (FENG e XIAO, 2011; CACCIÒ *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). Os outros genótipos de C a H são provavelmente classificados como hospedeiros específicos, embora alguns estudos relatam infecções de alguns genótipos em hospedeiros que

se distingue da classificação de hospedeiro específico (ŠTRKOLCOVÁ *et al.*, 2015; HEYWORTH, 2016).

O ciclo de vida do parasito na transmissão da doença não requer vetores, completando seu ciclo biológico em um único hospedeiro (Monoxeno), tendo início com a ingestão de cistos presentes em alimentos ou água contaminados. Baseia-se na alternância de estágios, onde constitui-se em duas fases, envolvendo a forma cística, estágio infeccioso, responsável pela transmissão do parasito, o qual possui uma parede cística resistente a variações de temperatura e umidade e produtos químicos utilizados como desinfetantes, e a forma de trofozoíto, estágio vegetativo, responsável pelas manifestações clínicas da doença, composto por quatro pares de flagelos e um disco adesivo ventral, o qual permite a aderência a células epiteliais intestinais (MORF *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011; HEYWORTH, 2014).

O processo de desencistamento se inicia após a ingestão de cistos, os quais ao passarem pelo estômago sofrem estímulos pela alternância de temperatura e pH, induzindo a mudança de programação celular, onde proteases do hospedeiro degradam a parede cística, liberando os excizoítos, trofozoítos ovais encistados com quatro núcleos, que passam por divisão celular originando quatro trofozoítos binucleados. Quanto ao processo de encistamento, após o trofozoíto realizar processo de diferenciação celular, no intestino delgado, havendo depleção lipídica e aumento do pH local ocorre a indução do desenvolvimento das formas císticas em um período de 20 a 24 horas (ADAM, 2001; BERNANDER *et al.*, 2001; BARASH *et al.*, 2017).

O diagnóstico da giardíase inicia-se com avaliação clínica com sinais e sintomas inespecíficos, sendo confirmado com a presença de cistos, trofozoítos e/ou antígenos de *G. lamblia* presentes em amostras fecais ou fluido duodenal (SANTANA *et al.*, 2014). O exame de microscopia direta é padrão-ouro para o diagnóstico de giardíase, onde observa-se a presença de cistos em fezes formadas e trofozoítos em fezes líquidas, no entanto, essa técnica demanda tempo e exige profissional treinado e habilitado. Por conseguinte, testes que se baseiam na detecção de antígenos de *G. lamblia* como, ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), Imunofluorescência e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) apresentam-se como alternativa a microscopia, pois são mais confiáveis, sensíveis e específicos

(AGNAMEY *et al.*, 2011; GOUDAL *et al.*, 2019; MOHRAM *et al.*, 2020). Contudo estas técnicas nem sempre são utilizadas, a PCR e Imunofluorescência são ferramentas usadas em pesquisa e a ELISA tem custo nem sempre factível com a realidade econômica dos infectados.

A infecção causada por *G. lamblia* normalmente é autolimitada, solucionando-se entre 3 a 6 semanas (ESCOBEDO *et al.*, 2014). No entanto, a primeira linha de tratamento para giardíase é feita com o uso de fármacos da classe dos nitroimidazóis, principalmente o metronidazol, com um esquema terapêutico padrão de administração de três vezes ao dia uma dose de 250 mg entre 5 a 10 dias, com uma eficácia relatada entre 80-95%. O mecanismo de ação desse fármaco baseia-se na ativação metabólica por via anaeróbica, na qual resulta em danos ao DNA do parasito, com deterioração da estrutura helicoidal e de suas funções, levando conseqüentemente a morte de trofozoítos (SAMUELSON, 1999; BUSATTI *et al.*, 2009; WATKINS e ECKMANN, 2014; VIVANCOS *et al.*, 2018).

A eficácia do tratamento de giardíase com nitroimidazóis é bem estabelecida, porém, em 20% dos casos pode ocorrer falha no tratamento (UPCROFT e UPCROFT, 2001; GUTIÉRREZ *et al.*, 2013). A possível resistência ao metronidazol está associada a redução da atividade de enzimas envolvidas em sua ativação, incluindo nitroreductase-1, tioredoxina redutase e piruvato-ferredoxina oxidoreductase (ORDOÑEZ-QUIROZ *et al.*, 2018). Em razão disso, alguns fármacos são usados como alternativas ao tratamento de giardíase, incluindo, Albendazol, Nitazoxanida, Furazolidona, Cloroquina, Mepacrina, Paromomicina, Bacitracin zinco, ou terapia combinada com metronidazol (CARTER *et al.*, 2018). Também o uso de probióticos têm sido relatados como alternativas terapêuticas ao tratamento e profilaxia a infecções por *G. lamblia* (GOYAL *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2018; FONSECA *et al.*, 2019; AL-MEGRIN *et al.*, 2021).

A giardíase é referida como uma doença parasitária reemergente devido a sua crescente e reconhecida importância em surtos de doenças diarreicas em creches e em epidemias transmitidas pelo consumo de água contaminada (READ *et al.*, 2002; MONIS *et al.*, 2003; SULAIMAN *et al.*, 2004; HUNTER e THOMPSON, 2005). A doença pode ser assintomática, o que ocorre na maioria dos casos, ou apresentar uma série de sintomas, incluindo cólica abdominal, náusea, vômito,

inchaço, diarreia aguda ou crônica, má absorção intestinal e perda de peso (ESCOBEDO *et al.*, 2010; NEVES *et al.*, 2011).

A patogênese da giardíase se deve a um conjunto de fatores como o comprometimento das junções intercelulares, apoptose celular, danos causados a borda em escova de células epiteliais intestinais, com encurtamento de microvilosidades, dano aos enterócitos e prejuízo na função de barreira epitelial (MÜLLER e ALLMEN, 2005; BURET, 2007). Essas alterações levam a mudanças na permeabilidade e absorção de nutrientes ao longo do intestino, causando quadros de desnutrição durante a presença de *G.lamblia*, sobretudo em crianças, onde a diarreia e má absorção de nutrientes causam anemia, com deficiência de vitamina B12, ferritina, além do comprometimento de absorção de proteínas, carboidratos, lipídios e vitaminas lipossolúveis, levando a um prejuízo no desenvolvimento cognitivo (SPRINGER e KEY, 1997; BERKMAN *et al.*, 2002; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2007; NEMATIAN *et al.*, 2008; AI-MEKHLAFI *et al.*, 2013).

Vários trabalhos visam elucidar as diferenças entre as variações de sintomas. Acredita-se que multiplicidade de fatores podem levar as várias formas de manifestações clínicas da doença, incluindo carga parasitária (PETRI *et al.*, 2009), a cepa associada à infecção (READ *et al.*, 2002; WARD, 2009), variação antigênica do parasito (GOTTSTEIN *et al.*, 1990), dose infectante (RENDTORFF, 1954) e o estado imunológico do hospedeiro (HANEVIK *et al.*, 2007).

Hospedeiros imunocompetentes desenvolvem respostas inatas e adquiridas eficientes para evitar ou restringir o parasitismo (RÓPOLO e TOUZ, 2010). No entanto, esta resposta pode ser autolimitada, em alguns casos (ROBERTSON *et al.*, 2010), indicando a presença de mecanismos do próprio parasito ou do hospedeiro capazes de interferir durante a infecção. De fato *G. lamblia* possui proteínas de superfície variantes (VSPs - *Variant-specific Surface Proteins*) que facilitam a infecção por evadir a resposta imunológica do hospedeiro (NASH *et al.*, 1988; GARGANTINI *et al.*, 2016).

Nas infecções por *G. lamblia*, a primeira linha de defesa do sistema imunológico é por meio das barreiras naturais de superfícies, como membranas mucosas. As células epiteliais intestinais expressam receptores de reconhecimento

de padrões (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) que são importantes para direcionarem respostas imunológicas quando os patógenos são reconhecidos.

Células intestinais bem como células imunológicas produzem óxido nítrico (NO), a partir da L-arginina (ECKMANN 2003; FINK e SINGER, 2017). Foi demonstrado que o NO é capaz de inibir o processo de desencistamento e induzir um efeito citostático em trofozoítos de *G. lamblia* (ECKMANN *et al.*, 2000). O parasito evade das ações do NO por meio do consumo de arginina como fonte de energia, como produto disso é originado a ornitina, a qual inibe a captação de arginina pelas células intestinais, levando a sua depleção intracelular. Sabe-se que a depleção de arginina induz a apoptose em células, o que então pode-se explicar o processo patológico da giardíase, com a ocorrência de apoptose de células intestinais (RINGQVIST *et al.*, 2008; MOKRZYCKA *et al.*, 2010; STADELMANN *et al.*, 2012; LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015).

Durante a colonização do intestino delgado pela giárdia, os antígenos microbianos são direcionados para a lâmina própria onde as células imunológicas inatas são ativadas e iniciam as repostas adaptativas. As respostas imunológicas adaptativas incluem a produção de imunoglobulinas por células B, como Imunoglobulina M (IgM), G (IgG) e A (IgA), onde a produção desses anticorpos específicos são importantes para a eliminação do parasito em infecções humanas (NASH *et al.*, 1987).

A presença de IgM representa uma infecção ativa ou recente, onde sua produção cai em torno de 2 ou 3 semanas após a infecção, enquanto que IgG indica que o paciente está na fase crônica e/ou convalescente da doença ou já teve contato com o parasito em algum momento da vida e esse anticorpo se mantém por até 18 meses após o contato com a giárdia (HEYWORTH, 2014; MAHER *et al.*, 2022). De forma conjunta ocorre produção de citocinas por células T e ativação de células T citotóxicas, sendo as respostas imunológicas mediadas por células importantes para os mecanismos de defesa a esse protozoário, onde infecções sintomáticas por *G. lamblia* induz resposta de células T CD4<sup>+</sup> (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015; SAGHAUG *et al.*, 2015; FINK e SINGER, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018).

A erradicação da infecção por *G. lamblia*, bem como a sua proteção demonstra ser dependente da produção e ação de anticorpos mediada por células

B, como pela ação de células T (SINGER e NASH, 2000). Linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) são leucócitos que integram o sistema imunológico. Responsáveis por mediar a imunidade celular e são divididos em diferentes grupos, com ações diferentes, onde se incluem linfócitos T helper (CD4<sup>+</sup>), citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) e reguladores (Tregs - CD4<sup>+</sup>; CD25<sup>+</sup>; FOXP3<sup>+</sup>) (HRBÁČKOVÁ *et al.*, 2017).

Células Tregs são identificadas como uma das maiores populações celulares capazes de induzir tolerância periférica. Elas constituem 5% a 10% das células TCD4<sup>+</sup> e são importantes para a prevenção de autoimunidade e a manutenção da homeostase imunológica. São caracterizadas por expressarem altos níveis de cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (IL-2R), denominada CD25 e a expressão do fator de transcrição, da família das proteínas *Forkhead box (FOX)*, FOXP3 (*forkhead box protein 3*), a princípio conhecido como JM2, que define a atividade celular para com uma função reguladora (CHATILLA *et al.*, 2000; HORI *et al.*, 2003; ALLAN *et al.*, 2005; PAULY *et al.*, 2009; LABER *et al.*, 2010; JOSEFOWICZ *et al.*, 2012; CONSONNI *et al.*, 2021).

Estudos relatam que camundongos *scurfy*, que naturalmente apresentam deficiência em Tregs e defeitos na expressão de FOXP3, desenvolvem uma doença rara conhecida como IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*), uma síndrome de desregulação imunológica, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X, bem como doenças linfoproliferativas e doenças sistêmicas semelhantes ao Lúpus, evidenciando a importância de células Tregs na manutenção da autotolerância (CHATILLA *et al.*, 2000; BRUNKOW *et al.*, 2001; BENNETT *et al.*, 2001; FONTENOT *et al.*, 2003; HORI *et al.*, 2003; HADASCHIK *et al.*, 2015).

Tregs são derivadas de dois grupos distintos que atuam conjuntamente para a manutenção da homeostase imunológica. São as Tregs naturais (nTregs – *Natural Treg*) ou tímicas, originadas no timo como resultado da resposta de células T CD4<sup>+</sup> a autoantígenos, onde uma parte dessas células responsivas passam por seleção negativa ou deleção e o restante se desenvolve em células regulatórias. O segundo grupo de células T reguladoras são as Tregs induzidas (iTregs - *Induced Tregs*) ou adaptativas, que são desenvolvidas a partir de linfócitos T CD4<sup>+</sup> imaturos ou *naive*, em resposta a antígenos em órgãos linfoides periféricos como tecidos de mucosas, especialmente no trato gastrointestinal e trato respiratório. Esse grupo é formado

pela presença de fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e ácido retinóico, produzidos por células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas (DCs - *Dendritic Cell*) CD103<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> de mucosas e pelos macrófagos alveolares nos pulmões. Células iTregs contribui então para suprimir a ativação e ação de linfócitos autorreativos e possivelmente patogênicos (CUROTTO DE LAFAILLE e LAFAILLE, 2009; BILATE e LAFAILLE, 2012; SOROOSH *et al.*, 2013; ESTERHÁZY *et al.*, 2016; GEORGIEV *et al.*, 2019).

Diversas são as formas de supressão utilizadas por células Tregs como, citólise, (por meio da ação de granzima A e perforinas), desordem metabólica (competição por Interleucina 2 – IL-2), supressão de linfócitos B (regulação negativa do coestimulador), modulação na maturação de DC's (interação de CTLA-4 com CD80/CD86 em DC's) e produção de citocinas inibitórias (SCHMIDT *et al.*, 2012; BOCIAN *et al.*, 2017). No que concerne a produção de citocinas inibitórias, células T reguladoras que apresentam o fenótipo CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> e FOXP3<sup>+</sup> produzem e secretam elevadas quantidades de IL-10 (Interleucina 10) e TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) (BOCIAN *et al.*, 2017; QUEIROZ *et al.*, 2017).

A função inibitória de IL-10, consiste na inibição da produção de citocinas por células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, macrófagos, bem como a redução da expressão de MHC de classe II (*Major histocompatibility complex II*), ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), CD80, CD86 em APC's (*Antigen Presenting Cells*). Quanto ao TGF- $\beta$ , que existe tanto na sua forma solúvel quanto de membrana, tem sua atividade supressora voltada a macrófagos ativados, linfócitos T e B e células NK (*Natural Killer Cell*). Assim como IL-10, também inibe MHC-II em APC's. TGF- $\beta$  induz o aumento na expressão de CD25, CD122, CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) em CD4<sup>+</sup> *naive*, como consequência da presença de IL-2, levando a ativação e diferenciação periférica dessas células em células Tregs (ZHENG *et al.*, 2004; BOCIAN *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que tanto humanos como animais infectados por *G. lamblia* produzem uma grande variedade de citocinas que integram tanto o sistema imunológico inato e adaptativo que irão contribuir para a eliminação do parasito (LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015). O papel destas citocinas está relacionado diretamente com o perfil de imunidade e de acordo com o estímulo pode determinar

respostas imunológicas diferenciadas frente ao parasito. Sabe-se que a IL-10 e TGF- $\beta$  são produzidas em níveis elevados em pacientes infectados por protozoários, ativando e modulando a resposta de células imunológicas contra esses parasitos (BAYRAKTAR *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2015) e que na presença de *G. lamblia*, células mononucleares aumentam sua atividade microbicida quando expostas a TGF- $\beta$  (BRUNE *et al.*, 2021).

Essas citocinas têm atividade imunomoduladora na infecção, limitando a resposta inflamatória. A liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  durante infecções por *G. lamblia* impede o recrutamento de células inflamatórias (GRIT *et al.*, 2014; JIMÉNEZ *et al.*, 2014). Essa resposta imunológica regulatória produzida no trato intestinal pode ser induzida pelo hospedeiro com objetivo de reduzir a inflamação, diminuindo danos patológicos imunomediados ou pode ser induzida pela *Giardia* como tentativa de promover sua permanência no intestino (ZHOU *et al.*, 2007; LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015).

De uma forma geral, o TGF- $\beta$ , parece suprimir a resposta imunológica celular, podendo em algumas infecções determinar quadros sintomáticos (BANSAL *et al.*, 2005). A presença de Tregs com alta expressão de IL-10 é capaz de evitar quadros de disbiose microbiana e inflamação intestinal presentes em infecção por *G. lamblia* (DANN *et al.*, 2018). Por sua vez, as Tregs intestinais moldam a imunidade a patógenos, contribuindo para preservação do tecido, protegendo a integridade da barreira epitelial e colaborando para a manutenção da homeostase local (COSOVANU e NEUMANN, 2020). Portanto, é possível que alterações nos percentuais de células Treg durante a infecção por *G. lamblia*, possa ser o diferencial para a evolução dos diferentes quadros clínicos apresentados durante a infecção.

A infecção por *G. lamblia* pode produzir imunidade, embora não esteja esclarecido se a infecção prévia pelo parasito, realmente, evita uma segunda infecção, ou apenas, evita os sintomas severos da doença (SOLAYMANI-MOHAMMADI *et al.*, 2010), bem como se indivíduos assintomáticos possam apresentar sintomas em uma reinfecção.

É conhecido que células Tregs intestinais nas mucosas são capazes de regular respostas imunológicas a alimentos, autoantígenos e microbiota, por meio da

secreção de citocinas anti-inflamatórias (MAJLESSI *et al.*, 2008; LO-MAN, 2011; WEINER *et al.*, 2011; CASTRO-SÁNCHEZ e MARTÍN-VILLA, 2013) porém seus efeitos durante a infecção por *G. lamblia* ainda não foram elucidados. No entanto, nos últimos anos houve um crescente interesse quanto a estas células, pois existem alguns indícios, embora também algumas lacunas, de que estas células podem interferir diretamente na incidência de doenças infecto-parasitárias.

Por outro lado, estudos têm evidenciado o impacto da giardíase durante a gestação e amamentação. A giardíase pode ser uma doença debilitante, que pode comprometer o bem-estar materno, fetal e a amamentação (KREUTNER *et al.*, 1981). Na literatura, estudo investigando parasitos intestinais em gestantes de diferentes faixas-etárias, revelou maior prevalência (48,1%), no grupo etário entre 23-31 anos e predominância (86%) de protozoários (RODRÍGUEZ-GARCÍA *et al.*, 2002).

A amamentação é considerada um meio eficaz para a prevenção de infecções por *G. lamblia* (MORROW *et al.*, 1992; MAHMUD *et al.*, 2001; IGNATIUS *et al.*, 2012) assim como em outras infecções parasitárias, haja vista que foi demonstrado *in vitro* que macrófagos do colostro humano foram capazes de fagocitar trofozoítos de *G. lamblia* (FRANÇA-BOTELHO *et al.*, 2006; ABDEL-HAFEEZ *et al.*, 2013, PEREIRA *et al.*, 2018). Portanto é possível afirmar que tanto o colostro como o leite humano possuem componentes do sistema imunológico que são importantes na proteção ao parasito (REINER *et al.*, 1986; MAHMUD *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2018). Devido à prevalência de infecções por *G. lamblia*, é possível que gestantes sejam mais susceptíveis à infecção pelo parasito, podendo a giardíase ocasionar efeitos durante a gestação e no período do aleitamento.

Pode-se inferir que a diarreia causada durante a infecção da gestante e a alteração no epitélio intestinal causem má-absorção de nutrientes e esses fatores seriam corresponsáveis pela restrição do crescimento fetal culminando em baixo peso ao nascer. A letalidade por giardíase está ancorada na mortalidade infantil por doenças diarreicas. Assim, torna-se importante avaliar efeitos de células Treg presentes no colostro para *G. lamblia*, uma vez que as crianças são infectadas por parasitos logo em seguida ao nascimento, tendo continuidade em alguns casos durante a sua vida (FERNANDES e BARBOSA, 2011).

O leite materno é uma secreção constante, produzido na mama humana. Sua composição de nutrientes e fatores bioativos estão em constante evolução, passando pelas fases de colostro, leite de transição e leite maduro, fornecendo assim, nutrição e proteção apropriadas conforme o desenvolvimento do bebê (ANDREAS *et al.*, 2015). O leite materno é composto por componentes imunológicos, como citocinas, células e imunoglobulinas e outros componentes como, hormônios, fatores de crescimento, lisozima, lactoferrina, que trarão proteção ao bebê em seus primeiros meses de vida (FIELD, 2005; HOSEA BLEWETT *et al.*, 2008; CABRERA-RUBIO *et al.*, 2012).

A composição do leite materno varia conforme o estágio da lactação, sendo o colostro mais rico em proteínas e componentes imunológicos, conferindo um papel mais imunológico ao recém-nascido, enquanto o leite de transição e leite maduro são mais ricos em água e gordura, portanto, com características mais nutricionais adequando sua composição conforme as necessidades do bebê durante seu desenvolvimento. Além dessa alteração durante os estágios da amamentação o leite materno também sofre alterações em sua composição a cada vez que a lactante oferta seu leite ao seu filho. No início da amamentação, leite anterior, apresenta concentrações maiores de água, enquanto ao final da mamada, leite posterior, apresenta maior concentração de gordura, o que é importante para o ganho de peso do bebê (LÖNNERDAL, 2004; FRANÇA *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2013; GIDREWICZ e FENTON, 2014; ANDREAS *et al.*, 2015).

A amamentação além de aumentar o laço afetivo entre mãe e filho, traz benefícios tanto para a criança quanto para a mãe. Crianças que são amamentadas por períodos longos têm redução na mortalidade e morbidade em doenças infecciosas, diminuição na ocorrência de mal oclusões dentárias e um melhor desenvolvimento cognitivo, além de proteger na vida adulta contra o excesso de peso e diabetes. Quanto as mães os benefícios são de proteção contra o câncer de mama, redução do risco de desenvolver diabetes e câncer de ovário, diminuição de sangramento pós-parto, acelera a perda de peso e proteção contra doenças cardiovasculares (FRANÇA-BOTELHO *et al.*, 2012; VICTORA *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2019; HONORIO-FRANÇA *et al.*, 2021). Dessa forma, a organização mundial de saúde recomenda a amamentação

exclusiva durante os primeiros 6 meses de vida e sua continuação até pelo menos 2 anos de idade (WHO, 2003).

O colostro apresenta um grande número de leucócitos viáveis, sendo  $1 \times 10^9$  células/ml, durante os primeiros dias de lactação (ISLAM *et al.*, 2006). Desses leucócitos, 55 a 60% são neutrófilos, 30 a 40% macrófagos e 5 a 10% linfócitos (GOLDMAN, 1993) que permanecem viáveis na mucosa intestinal do recém-nascido por um período de quatro horas após a amamentação (HUGHES, 1988), estimulando o sistema imunológico imaturo do recém-nascido, especialmente nas mucosas, prevenindo doenças diarreicas (RIEDEL-CASPARI, 1993; HONORIO-FRANÇA *et al.*, 1997; FRANÇA-BOTELHO *et al.*, 2006; FRANÇA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2018). Crianças nascidas de mães não imunizadas para giardíase possuem um risco significativamente maior de desenvolverem a doença com sintomas mais graves em comparação com filhos de mães imunologicamente protegidas (TELLEZ *et al.*, 2003).

O leite materno fornece diversos componentes imunológicos que irão proteger o recém-nascido de alguns patógenos e também ajuda a manter tolerância imunológica a alguns antígenos fornecidos pela mãe e pelo ambiente, mantendo homeostase do seu sistema imunológico (CAMPBELL *et al.*, 1984; FIELD, 2005; PARIGI *et al.*, 2015). Um dos componentes imunológicos regulatórios transferidos pelo leite materno são as células Tregs, sendo possível que essa transferência adotiva de células seja capaz de levar a tolerância ao recém-nascido (SAFINIA *et al.*, 2013; KINDER *et al.*, 2014; CÉRBULO-VÁZQUEZ *et al.*, 2017).

O colostro contém vários componentes bioativos que impulsionam o sistema imunológico desses recém-nascidos. No entanto, esses componentes de defesa recebidos por meio da amamentação funcionam sem causar inflamação, demonstrando que tanto o colostro como o leite maduro possuem componentes anti-inflamatórios (PALMEIRA e CARNEIRO-SAMPAIO, 2016). Dentre esses componentes, as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , são importantes citocinas imunomoduladoras e atuam estimulando a maturação intestinal e a defesa do recém-nascido (VERHASSELT, 2010).

A literatura reporta a importância de hormônios como potentes imunomoduladores, que participam de vários aspectos relacionados ao sistema

imunológico (DARDENNE *et al.*, 1994; KUHLWEIN e IRWIN, 2001; CORRÊA *et al.*, 2006). Existem autores que reportam um mecanismo de interação entre células do sangue e colostro e a modulação pelo hormônio cortisol (LONG *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2007; FAGUNDES *et al.*, 2012), enquanto outros pelo hormônio melatonina (HARA *et al.*, 2013; HONORIO-FRANÇA *et al.*, 2013).

O cortisol é um hormônio glicocorticoide, sintetizado a partir do colesterol, sendo produzido na glândula adrenal, especificamente na zona fasciculada mediante estímulo da ação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH - *Adrenocorticotropic hormone*) que é produzido na adeno-hipófise, atuando como o principal marcador para a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Esse hormônio está envolvido na quebra de gordura e proteína e na síntese de glicose, bem como regula várias funções importantes, como cardiovasculares, metabólicas e imunológicas. Sua liberação segue um ritmo circadiano, onde apresenta níveis mais altos no período matutino, que diminuem à noite e na fase inicial do sono. Esse hormônio é utilizado como um biomarcador em muitos estudos de estresse fisiológico (TSIGOS *et al.*, 2002; CHIDA e STEPTOE, 2009; LEE *et al.*, 2015).

Em interação com o sistema imunológico o cortisol apresenta ação anti-inflamatória. Atua na diminuição da circulação de neutrófilos, monócitos e linfócitos B e com supressão da atividade citotóxica de células NK (HASENMAJER *et al.*, 2020). Um outro mecanismo pelo qual o cortisol diminui a resposta inflamatória é por meio do aumento da expressão do receptor CXCR4, que é o receptor da quimiocina CXCL12, que mantém células T imaturas quiescentes na medula óssea e com isso diminui a circulação de linfócitos T no sangue periférico (BESEDOVSKY e DEL REY, 1996; BESEDOVSKY *et al.*, 2012).

O cortisol está presente no colostro, onde sua concentração sofre influência da idade materna, adequando-se conforme a necessidade do recém-nascido (PEREIRA *et al.*, 2018). Além disso, tem sido demonstrado que possui um importante papel no desenvolvimento e maturação pós-neonatal do trato gastrointestinal e do sistema imunológico do recém-nascido (FOLIGNE *et al.*, 2001; JOUAN *et al.*, 2006; FAGUNDES *et al.*, 2012), sendo, também, capaz de modular a atividade funcional de fagócitos da própria secreção (FAGUNDES *et al.*, 2012).

Assim como o cortisol, o hormônio melatonina foi relatado no colostro (HARA *et al.*, 2013; HONORIO-FRANÇA *et al.*, 2013; MORCELLI *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2019). A melatonina (MLT) é um neuro-hormônio produzido pela glândula pineal, que exibe diversas funções fisiológicas, incluindo a regulação biológica dos ritmos circadianos: sono, reprodução, imunomodulação (controlando a ativação de células T, B, NK, liberação de citocinas) (HARDELAND e FUHRBERG, 1996; PONTES *et al.*, 2006) e ação anti-inflamatória (HARDELAND *et al.*, 2006). Esse hormônio tem importante papel imunomodulador no controle de doenças infecciosas (FRANÇA *et al.*, 2009).

A melatonina (MLT), uma indolamina, é principalmente produzida e secretada pela glândula pineal, a partir do aminoácido triptofano. Após sua produção, a melatonina não fica armazenada dentro dos pinealócitos, sendo rapidamente liberada na corrente sanguínea assim que finalizada sua produção, e por ter uma meia-vida curta, sua dosagem é capaz de refletir diretamente a sua síntese pela pineal. A produção de melatonina também é encontrada em outros tecidos como, cérebro, olhos, pele, trato gastrointestinal, fígado, rim, tireóide, pâncreas, timo, baço, trato reprodutivo e também presente em células do sistema imunológico. No entanto, a melatonina produzida nesses locais não é liberada na corrente sanguínea e também não obedece uma produção rítmica, sendo usada localmente como antioxidante. Portanto a melatonina produzida pela pineal é um hormônio que tem importância na mensagem circadiana endócrina para todo o organismo (ACUÑA-CASTROVIEJO *et al.*, 2014; PEVET *et al.*, 2017)

Diversas células do sistema imunológico produzem melatonina em diferentes concentrações, onde linfócitos produzem altas concentrações de melatonina, tendo ação imunomoduladora do sistema imunológico (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004; CARRILLO-VICO *et al.*, 2005). Melatonina exerce uma ação pró-inflamatória, aumentando o número de células NK, proliferação de leucócitos, aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor Alpha*) e aumento da fagocitose. Embora, tenha ação pró-inflamatória a melatonina pode atuar de forma anti-inflamatória, quando apresenta função antioxidante, diminuindo a concentração de ROS (*Reactive oxygen species*) e com isso demonstrando que tem capacidade de ativar um estado inflamatório, mas ao mesmo tempo controlar a inflamação, a fim de evitar os danos causados pela

inflamação crônica (RADOGNA *et al.*, 2010; BESEDOVSKY *et al.*, 2012; FAVERO *et al.*, 2017; MORAIS *et al.*, 2019).

A melatonina está presente no leite materno, atingindo seu pico as 3 horas da manhã, o que contribui para a regulação do ritmo circadiano do recém-nascido e a regulação temporária da atividade endócrina da criança (FRANÇA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013; KATZER *et al.*, 2016; ITALIANER *et al.*, 2020). Estudos demonstraram atividade pró-inflamatória da melatonina, tendo em vista que a presença do hormônio foi capaz de aumentar a atividade fagocítica de células do colostro contra bactérias (HONORIO-FRANÇA *et al.*, 2013; HARA *et al.*, 2013; MORCELI *et al.*, 2013), assim como também apresenta atividade anti-inflamatória com ação antioxidante ao reduzir a liberação de cálcio intracelular e prevenir danos celulares (MORAIS *et al.*, 2019). Em infecções por diversos parasitos protozoários a melatonina foi reportada como importante fator tanto na indução de resposta imunológica efetora contra esses parasitos, bem como na imunomodulação e contribuindo para prevenção de danos teciduais causados por infecções com protozoários (DARYANI *et al.*, 2018).

Estudo prévio revelou os efeitos dos hormônios melatonina e cortisol sobre fagócitos de colostro durante interações com a *G. lamblia* e sugere que ambos os hormônios podem regular a atividade funcional de células do colostro e ser um importante mecanismo de defesa para proteção e tratamento de doenças parasitárias (PEREIRA *et al.*, 2018), porém o efeito destes hormônios sobre células Tregs durante interações com a *G. lamblia* é desconhecido.

## 2. JUSTIFICATIVA

Com mais de 280 milhões de casos anualmente em todo o mundo, a maioria em crianças, a Giardíase passa a ser considerada um problema de saúde pública, e pela OMS (Organização Mundial da Saúde) como uma doença negligenciada (SAVIOLI *et al.*, 2006; EINARSSON *et al.*, 2016). Há o fato de que uma em cada nove mortes infantis se deve a diarreias, somando 2.195 mortes diárias e 801 mil mortes anuais, o que é maior que casos combinados de sarampo, AIDS e malária, e que a diarreia é a segunda principal causa de morbidade e mortalidade infantil por doenças infecciosas, atrás somente da pneumonia (CDC, 2020; (ROSHIDI e ARIFIN, 2022). Portanto, tendo em vista a prevalência maior de infecções por *G. lamblia* em crianças, as consequências das manifestações de infecções sintomáticas como a ocorrência de diarreias em crianças e a amamentação como uma fonte de proteção aos recém-nascidos, torna-se importante o estudo de componentes imunológicos e hormonais presentes em colostro de nutrizes para *G. lamblia*.

Considerando que o habitat da *G. lamblia* é o intestino e que o tecido linfóide associado à mucosa é um ambiente capaz de ser imunomodulado, sendo essencialmente não inflamatório, a hipótese deste trabalho é que interações entre os hormônios melatonina e o cortisol podem gerar um ambiente anti-inflamatório e que a presença de células T regulatórias intensifiquem a supressão da resposta imunológica, com liberação de grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ , favorecendo dessa forma o estabelecimento do parasito. Provavelmente esses componentes atuam conjuntamente e estas interações provavelmente constituem a chave para o entendimento das infecções sintomáticas em gestantes e crianças. Portanto, são necessário estudos para elucidar quais componentes regulatórios participam em infecções por *G. lamblia*, bem como o papel dos hormônios melatonina e cortisol presentes no colostro durante infecção por *G. lamblia*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar os mecanismos imunoregulatórios envolvidos na infecção por *Giardia lamblia*, bem como a concentração dos hormônios melatonina e cortisol em colostro de mães soropositivas para giardíase.

#### 3.2 Objetivos específicos

Analisar em colostro de mães soropositivas e soronegativas para giardíase:

- Realizar a triagem de puérperas IgG positivas e IgM positivas para giardíase no colostro
- Comparar a concentração dos hormônios melatonina e cortisol;
- Realizar imunofenotipagem e percentuais de células CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup> ;
- Determinar a concentração de IL-10 e TGF- $\beta$ ; e
- Avaliar a existência de correlação entre melatonina, cortisol, Tregs, IL-10 e TGF- $\beta$ .

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Caracterização das amostras

Estudo de corte transversal, onde foram incluídas nutrizes de 18 a 35 anos de idade, reagentes e não reagentes para *G. lamblia*. As amostras de colostro foram obtidas de nutrizes usuárias do Serviço Público de Saúde de Barra do Garças - MT.

O tamanho amostral proposto neste estudo baseou-se em cálculos estatísticos do tamanho amostral assumindo uma perda de seguimento da ordem de 10% e corrigindo para os efeitos dos erros  $\alpha$  (5%) e  $\beta$  (20%) atribuídos ao estudo. Sendo assim, o tamanho amostral foi constituído de 17 gestantes, assim distribuídas: 06 no grupo soronegativa para *G. lamblia* (controle); 05 no grupo soropositivo para IgM anti-*G. lamblia* e 06 no grupo soropositivo para IgG anti-*G. lamblia*. A reatividade para *G. lamblia* foi realizada pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

### 4.2 Critérios de inclusão e exclusão.

#### 4.2.1 Critérios de inclusão

- Idade gestacional no parto a partir de 37 semanas;
- Ter concebido um recém-nascido vivo e sem malformações;
- Reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### 4.2.2 Critérios de exclusão

- Malformação fetal diagnosticada no momento do parto
- Gravidez gemelar

### 4.3 Definição das variáveis

#### 4.3.1 Variáveis de controle

- Idade – entre 18 e 35 anos;
- Presença (sim) ou ausência (não) de tabagismo, de hipertensão arterial e de Diabetes Mellitus;
- Idade gestacional no momento do parto, em semanas completas.

#### **4.3.2 Variáveis independentes**

- Nutrizes com ou sem soropositividade para giardíase.

#### **4.3.3 Variáveis dependentes**

- Índices de células T regulatórias e concentração de melatonina, cortisol, IL-10 e TGF- $\beta$  no colostro.

### **4.4 Métodos de coleta e avaliação**

#### **4.4.1 Obtenção de sobrenadante e células de colostro humano**

A coleta do colostro foi efetuada através de ordenha manual, sempre no período da manhã e no intervalo entre duas mamadas, no período correspondente às primeiras 48 a 72 horas após o parto, em um volume aproximado de 8 ml. As nutrizes receberam de forma clara e compreensiva, informação verbal e escrita sobre o objetivo e importância do trabalho, para posteriormente assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e só então foi realizado a coleta das amostras.

O colostro foi centrifugado por 10 minutos a 160xg sob refrigeração a 4°C, o qual permite a separação do colostro em três fases nítidas: o "botão" celular (pellet), uma porção fluida intermediária e uma camada superior de gordura. A camada superior composta de gordura foi desprezada e o sobrenadante (porção fluida) reservado para posterior quantificação de citocinas e hormônios. O pellet foi reservado para as análises celulares.

As células do colostro foram ressuspensas em meio de cultura 199 (Gibco), e separadas em gradiente de densidade pelo Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 160xg, sob temperatura de 4°C. A separação com o Ficoll-Paque permite

que os fagócitos polimorfonucleares sedimentem no tubo, formando um "botão" celular, e a formação de um anel rico em células mononucleares na interface entre o meio de cultura e o Ficoll-Paque. O anel celular rico em células mononucleares foi retirado separadamente, sendo lavadas duas vezes em meio de cultura 199 (Gibco). Em seguida, as células foram contadas em câmara de Newbauer, e as concentrações celulares ajustadas para  $2 \times 10^6$  células/ml.

#### **4.5 Determinação da reatividade para *G. lamblia* pelo método de ELISA (Ensaio Imunoenzimático)**

Para determinar a reatividade de anticorpos da classe IgM e IgG para antígeno de *G. lamblia* foi realizado o método de ELISA, seguindo as seguintes etapas:

- Preparação do antígeno:

Para obtenção de antígeno, trofozoítos da cepa Portland-1 (ATCC® 30888TM), oriunda do LAPI do ICB/UFMG, foram mantidos em cultura axênica em meio TYI-S-33 (DIAMOND, 1978) e suplementado com bile bovina. As culturas de trofozoítos de *G. lamblia* passaram por banho de gelo por 10 minutos para que ocorresse o desprendimento dos trofozoítos da parede dos tubos, posteriormente os tubos foram centrifugados por 3000 RPM (rotação por minuto) por 5 minutos, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), e então o pellet foi recolhido para proceder a extração. Foi acrescentado inibidores enzimáticos (1mM de Iodoacetamida, 1mM de TLCK (*Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride*), 1 mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*), 1 mM de PHMB (*4-hydroxymercuri)Benzoic Acid*), todos em PBS. Então o pellet passou por sonicação 10 vezes de 1 minuto cada com intervalo de 30 segundos a 40 *hertz*. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 3000 RPM por 30 min 4°C. O sobrenadante, onde estava presente as proteínas solúveis, foi aliquoteado em volume de 50µL, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) e congelados a -20°C até o uso.

- Sensibilização da placa:

A placa foi sensibilizada com 1 µg/mL (100µL por poço) do antígeno diluído em tampão carbonato e incubada por 24 horas a 4°C. Após a incubação a placa foi

lavada cinco vezes com PBS-Tween 20 (0,05%). Em seguida, foi adicionado 100µl de PBS-BSA (0,05%) e a placa incubada por 1 hora a 37 °C. Foi feita a lavagem 5 vezes PBS-Tween 20 (0,05%). Após a lavagem foi pipetado 100 µL de sobrenadante (diluído em PBS-Tween 20 (0,2%) + 0,5% de Cloreto de sódio (NaCl), na diluição única de 1:40, definida por titulação prévia), e incubada por 2 horas a 37°C. Após a incubação a placa foi lavada cinco vezes com PBS-Tween 20 (0,05%), sendo adicionado, em seguida, 100µl de conjugados anti-IgG e anti-IgM marcados com peroxidase (Sigma), em cada poço. A diluição dos conjugados foram de 1:40, em PBS-BSA (1%) + Tween 20 (0,2%) + NaCl (2%), e seguido de uma nova incubação de 2 horas, a 37°C. Terminada a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-Tween 20 (0,05%). Finalmente, 100 µL do substrato (4 µg de orto-fenilenoldiamino (OPD), em 10ml de solução tampão citrato-fosfato e 5µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-30vol) foi adicionado à placa com incubação por 45 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 30µl de ácido sulfúrico 4M, em cada orifício. A reação produzida foi medida em espectrofotômetro, a 490nm. Para determinação do ponto de corte, utilizou-se a análises através da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), utilizando software MedCal®.

#### **4.6 Dosagem da concentração de melatonina no sobrenadante de colostro**

A determinação quantitativa da concentração do hormônio melatonina no sobrenadante de colostro foi realizada pelo teste imunoenzimático em microplacas de ELISA. A melatonina presente no colostro foi extraída por cromatografia de afinidade, conforme orientação do fabricante, e concentrada em centrífuga à vácuo por 120 minutos a 200xg e determinada por kit de ELISA *Imuno-Biological Laboratories (IBL, Hamburgo)*. Os valores da reação foram medidos por absorbância em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 405nm. Os resultados foram obtidos através de curva-padrão e expressos em pg/mL.

#### **4.7 Dosagem da concentração do cortisol no sobrenadante de colostro**

A determinação quantitativa da concentração do hormônio cortisol total no sobrenadante de colostro foi realizada pelo teste de ELISA em microplaca, pelo Kit *DRG® International, Inc.* Padrões e amostras (20µl) foram colocados em microplaca

com 96 poços, em seguida foi adicionado 200 µl de conjugado enzimático, a placa foi agitada e incubada por 60 minutos, posteriormente a placa foi lavada com tampão de lavagem e adicionado 100µl de substrato e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a reação enzimática foi interrompida com 100µl de solução de parada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram obtidos através de curva-padrão e expressos em ng/mL.

#### **4.8 Imunofenotipagem**

Células do colostro, após a separação foram marcadas com 20µl de anti-CD4 PE (*Phycoerythrin*), 20µl de anti-CD25 FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), 5µl de anti-CD25 BB515 (*BD Horizon Brilliant™ Blue 515*), 20µl Anti-FOXP3 PE ou 20µl Anti-FoxP3 *Alexa Fluor 488*. A coloração intracelular para FOXP3 seguiu as especificações de acordo com as instruções do fabricante (*BD Biosciences, San Jose, CA*). As amostras foram incubadas por 30 minutos, com proteção da luz e a temperatura ambiente. As células foram lavadas e ressuspendidas em PBS-SFB (10%). Um mínimo de 10.000 células foram analisadas por tamanho (*Forward Scatter - FSC*) e granulosidade (*Side Scatter - SSC*). A aquisição de dados foi realizada por citometria de fluxo (*FACSCalibur, BD Bioscience, USA*), por meio do software *Cell Quest*. Os dados foram analisados através do software *Flowjo 7.2.5*.

#### **4.9 Quantificação de citocinas (IL-10 e TGF-β) no sobrenadante de colostro**

A quantificação das concentrações de citocinas no sobrenadante de colostro foi realizada por Citometria de Fluxo. A IL-10 foi avaliada pelo Kit Cytometric Bead Array *Human Inflammatory Cytokines Kit (CBA, BD Bioscience, USA)*. TGF-β foi avaliada pelo kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human TGF-β1 Single Plex Flex Set (CBA, BD Bioscience, USA)*. A leitura foi realizada em Citômetro de Fluxo (*FACSCalibur, BD Bioscience, USA*).

#### **4.10 Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (SD). Como teste de normalidade foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise estatística dos dados utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparação de médias de Tukey. Para análise de correlação entre as variáveis dependentes, dentro dos grupos, foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de P foi menor 0.05 ( $p < 0,05$ ).

#### **4.11 Aspectos Éticos**

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da nutriz, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. As coletas respeitaram os protocolos técnicos do hospital e dos serviços envolvidos. As nutrizes foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - APÊNDICE), conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Campus Araguaia (CEP - CUA/UFMT), sob o número de CAAE: 05524918.0.0000.5587 e sob número de parecer: 3.151.830 (ANEXO).

## 4. 12 Fluxograma Experimental

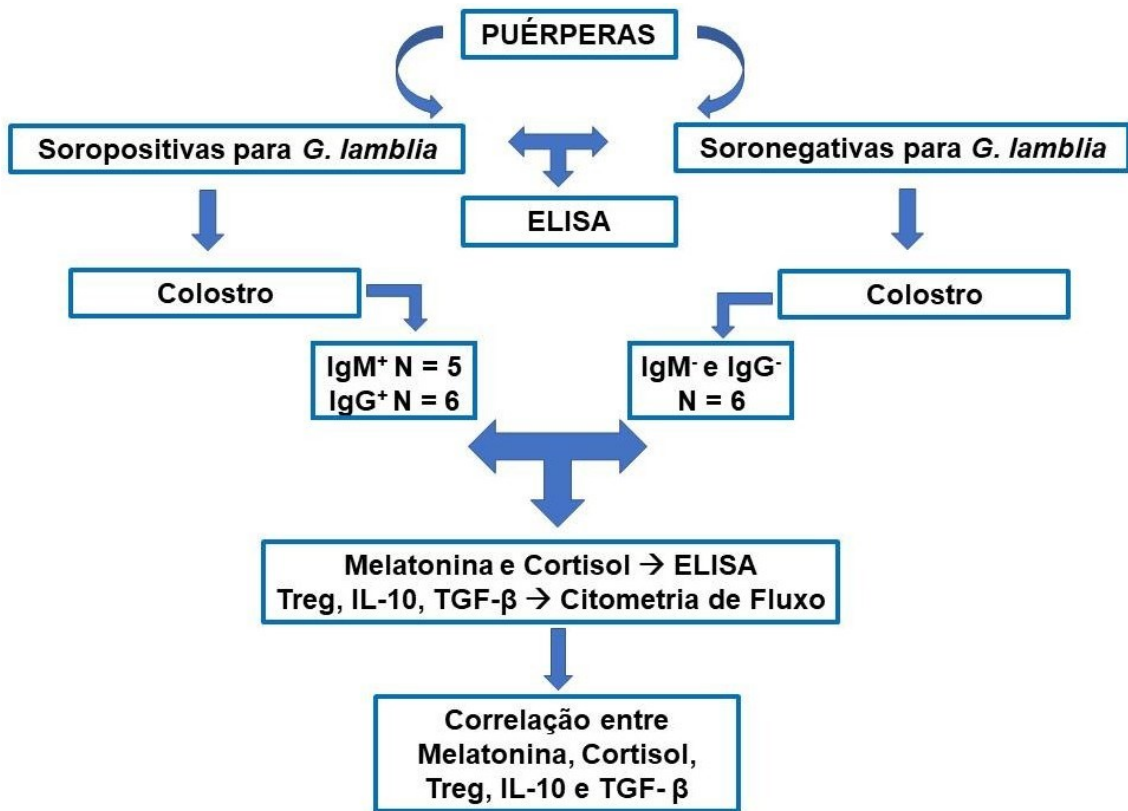


Figura 1: Fluxograma do delineamento experimental do estudo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM e IgG para *G. lamblia* no sobrenadante de colostro

Para a definição do ponto de corte (*cut-off*) da reação de ELISA foi realizado, com base em dados epidemiológicos presentes na literatura, uma análise de curva de ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*), onde o ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM (Imunoglobulina M) e IgG (Imunoglobulina G) para *G. lamblia* presentes em sobrenadante de colostro apresentou valores de sensibilidade e especificidade de 100% e um valor de área sob a curva Roc (AUC - *Area Under the Curve*) de 100%, em que a partir dessa análise ficou definido o valor de *cut-off* de absorbância da reação de 0,194 para IgM (figura 2) e 0,107 para IgG (figura 3). Resultado semelhante encontrado por Pacheco *et al.*, 2020, que obteve um valor de *cut-off* de 0,136 em amostras de soro.

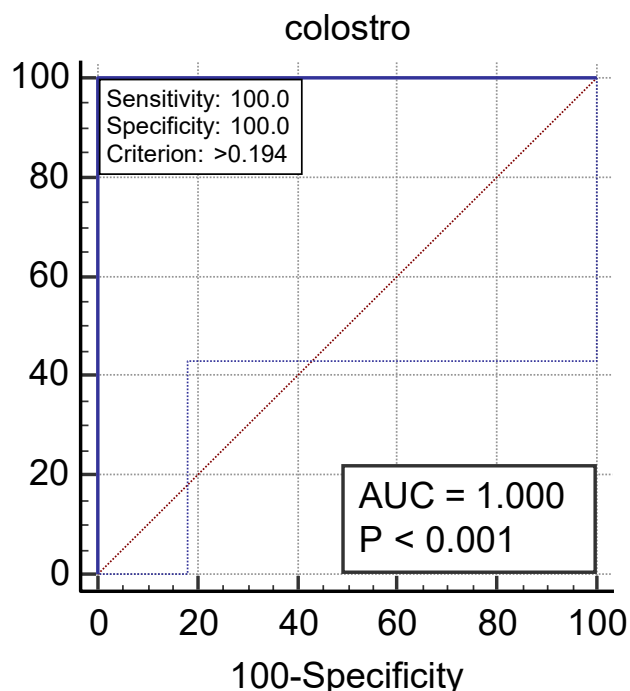


Figura 2. Curva ROC, indicando o ponto de corte da reação (*cut-off*), sensibilidade, especificidade e área sob a curva para detecção de IgM anti-*Giardia lamblia* em amostras de sobrenadante de colostro.

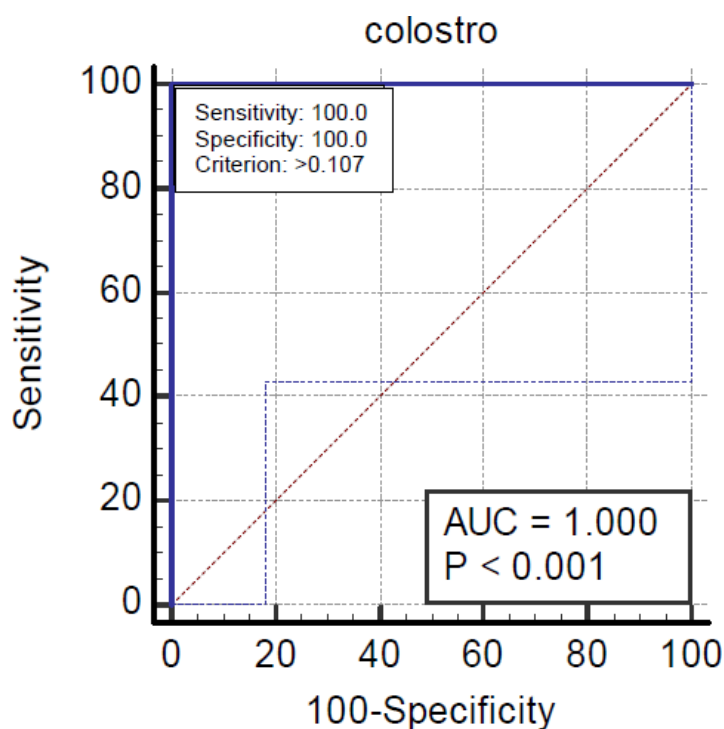


Figura 3. Curva ROC, indicando o ponto de corte da reação (cut-off), sensibilidade, especificidade e área sob a curva para detecção de IgG anti-*Giardia lamblia* em amostras de sobrenadante de colostro.

## 5.2 Concentração dos hormônios melatonina e cortisol no sobrenadante de colostro

Na figura 4 e 5 estão apresentadas as concentrações do hormônio melatonina presente no sobrenadante de colostro de nutrizes soropositivas e soronegativas para IgM e IgG anti-*G. lamblia*. Observa-se que houve redução na concentração de melatonina no colostro de mães do grupo positivo para IgM comparado ao grupo negativo (figura 4), enquanto que no colostro de mães do grupo reagente para IgG anti-*G. lamblia* houve um aumento nos níveis desse hormônio quando comparado ao colostro de mães não reagentes para IgG anti-*G. lamblia* (figura 5).

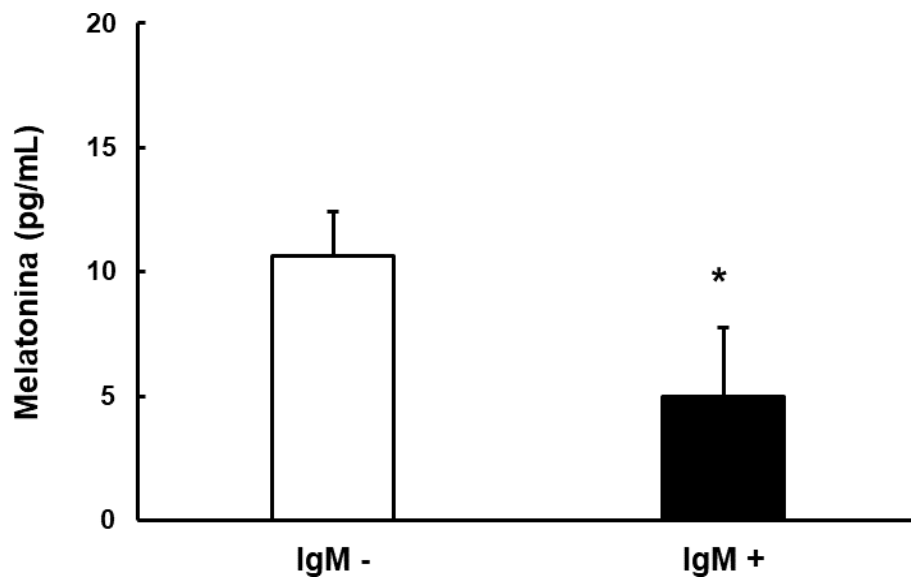


Figura 4. Concentração de melatonina (pg/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade ( $4,98 \pm 2,80$ ) e soronegatividade ( $10,63 \pm 1,78$ ) para IgM Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD). \* Indica diferença intergrupos (IgM - e IgM +).  $P < 0,05$

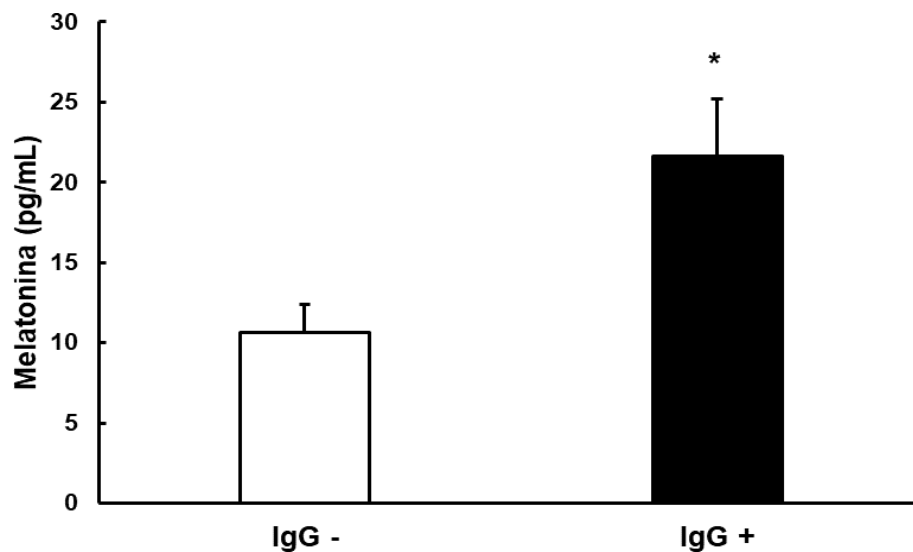


Figura 5. Concentração de melatonina (pg/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade ( $21,63 \pm 3,57$ ) e soronegatividade ( $10,63 \pm 1,77$ ) para IgG Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD). \* Indica diferença intergrupos (IgG - e IgG +).  $P < 0,05$

Na figura 6 e 7 estão apresentadas as concentrações do hormônio cortisol presente no sobrenadante de colostro. As concentrações do hormônio cortisol, independente da reação sorológica, foi similar entre os grupos avaliados.

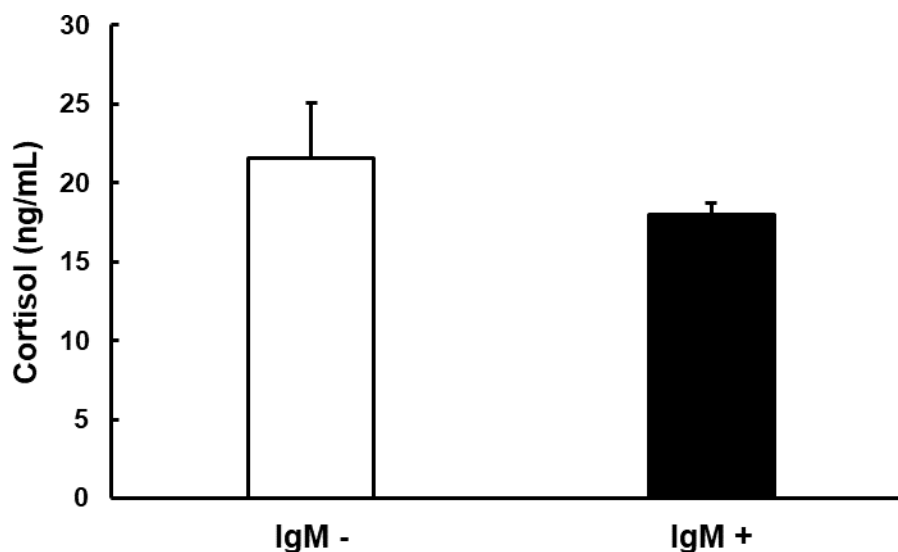


Figura 6. Concentração de cortisol (ng/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade ( $17,99 \pm 0,76$ ) e soronegatividade ( $21,57 \pm 3,50$ ) para IgM Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

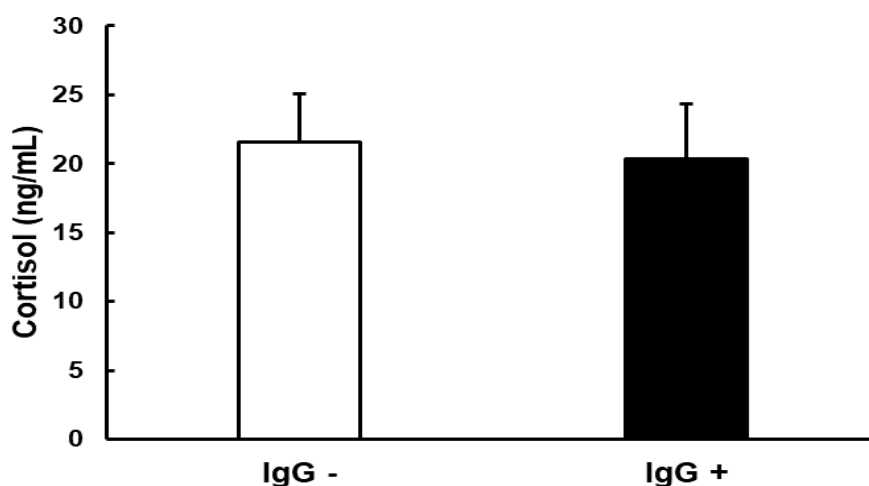


Figura 7. Concentração de cortisol (ng/mL) em sobrenadante de colostro de nutrizes com soropositividade ( $20,38 \pm 3,91$ ) e soronegatividade ( $21,57 \pm 3,49$ ) para IgG Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

### 5.3 Imunofenotipagem de células do colostro

O percentual de células T regulatórias de colostro de mães reagentes ou não para IgM e IgG anti-*G. lamblia* estão apresentados nas figuras 8 e 9. Houve aumento no percentual de células T regulatórias no colostro de mães do grupo com soropositividade para IgM quando comparado com o grupo controle (figura 8). No colostro de mães do grupo reagente para IgG anti-*G. lamblia* os percentuais de

células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> foram similares aos observados no colostro de mães não reagentes (figura 9).

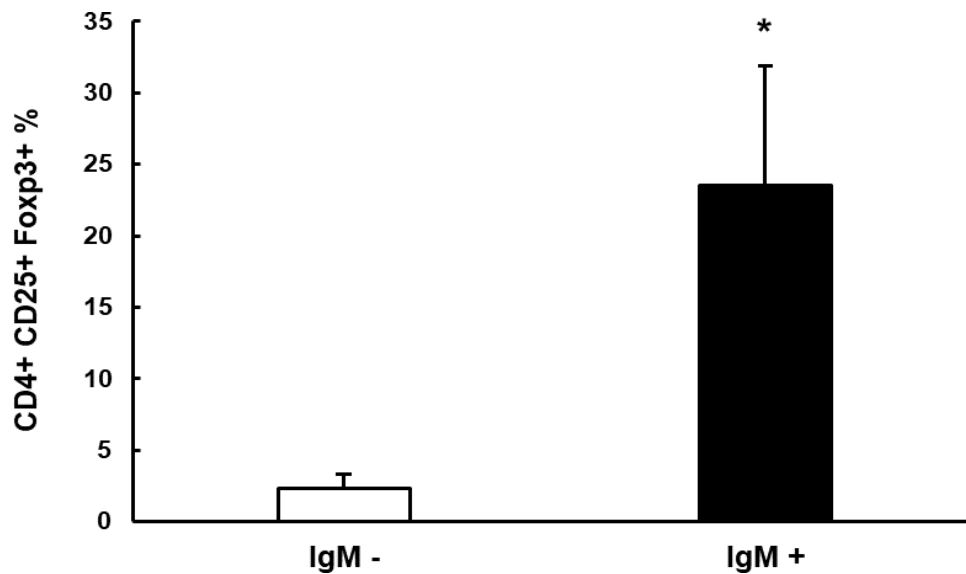


Figura 8. Percentual de células T regulatórias no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgM Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD). \* Indica diferença intergrupos (IgM - e IgM +). P<0.05

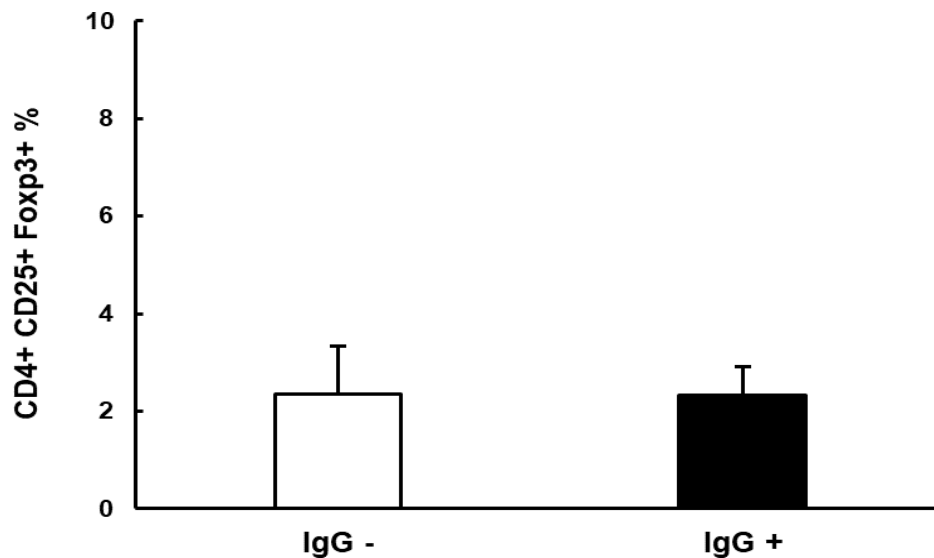


Figura 9. Percentual de células T regulatórias no colostro de nutrizes com soropositividade e soronegatividade para IgG Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

#### 5.4 Concentração das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ em sobrenadante de colostro

As concentrações de citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  presentes nos sobrenadante de colostro de mães soropositivas e soronegativas para IgG e IgM anti-*G. lamblia* estão apresentadas nas figuras 10, 11, 12 e 13, respectivamente. As concentrações de IL-10, independente da reatividade para *G. lamblia*, foram similares entre os grupos

avaliados (figura 10 e 12), assim como TGF- $\beta$  quando avaliado a reatividade para IgG anti-*G. lamblia* ( figura 11). Enquanto que TGF- $\beta$  apresentou aumento na sua concentração presente no colostro do grupo reagente para IgM anti-*G. lamblia* em comparação ao grupo controle (figura 13).

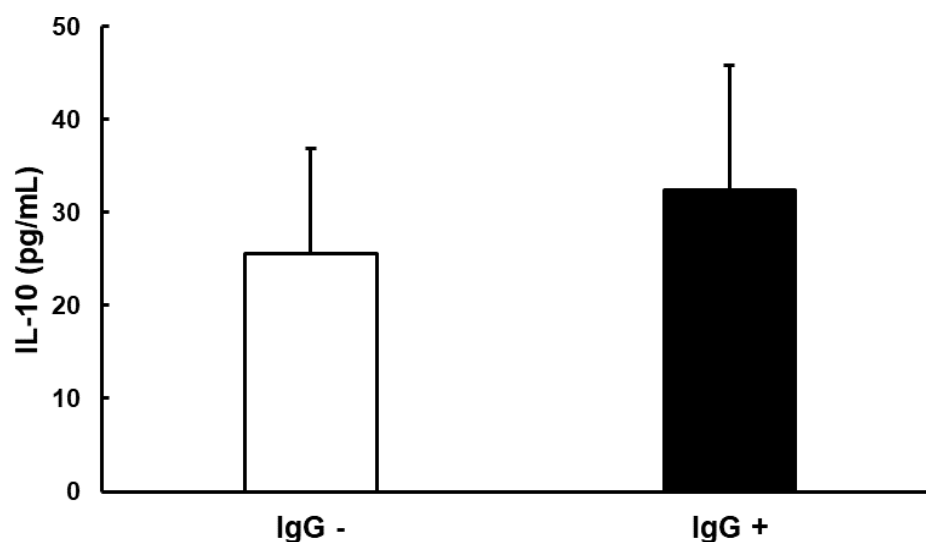


Figura 10. Concentração de IL-10 (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade ( $32,46 \pm 13,44$ ) e soronegatividade ( $25,52 \pm 11,40$ ) para IgG Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

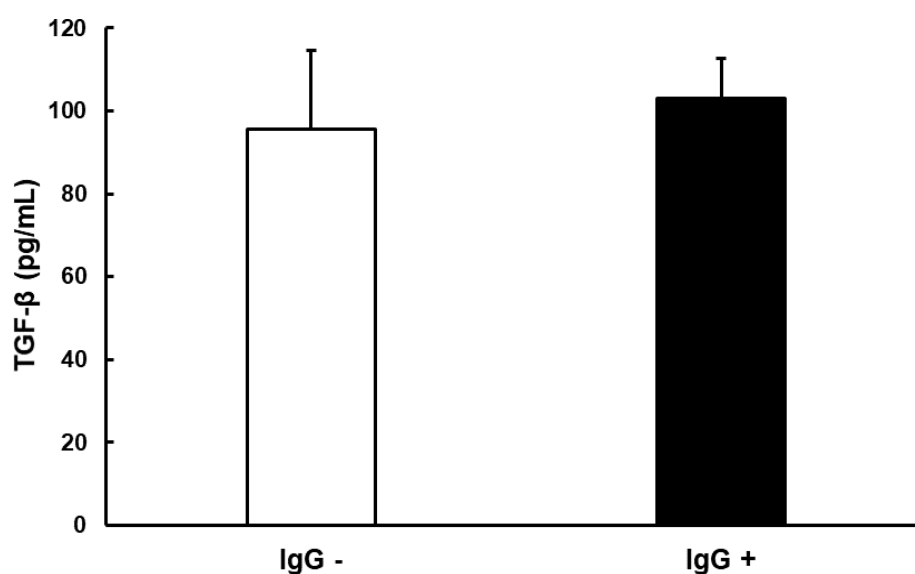


Figura 11. Concentração de TGF- $\beta$  (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade ( $103,05 \pm 9,62$ ) e soronegatividade ( $95,72 \pm 18,90$ ) para IgG Anti-*G. lamblia*. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

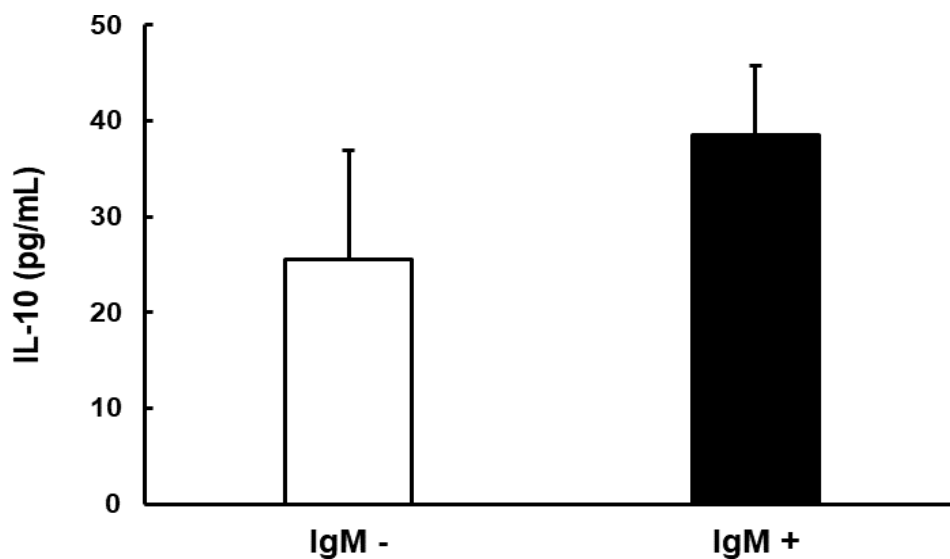


Figura 12. Concentração de IL-10 (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade ( $39 \pm 7,17$ ) e soronegatividade ( $26 \pm 11,40$ ) para IgM Anti-G. lamblia. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

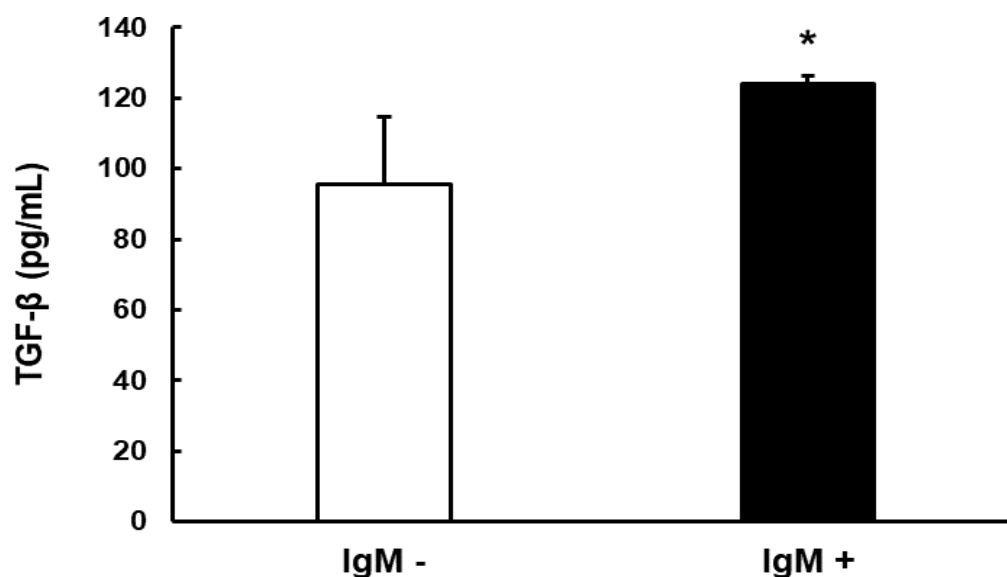


Figura 13. Concentração de TGF-β (pg/mL) no colostro de nutrizes com soropositividade ( $124,14 \pm 2,14$ ) e soronegatividade ( $96 \pm 18,91$ ) para IgM Anti-G. lamblia. Dados são expressos como média e desvio-padrão (SD).

\* Indica diferença intergrupos (IgM - e IgM +).  $P < 0,05$

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de correlação entre o hormônio melatonina e os do hormônio cortisol, percentuais de células T regulatórias e concentração das citocinas IL-10 e TGF-β. Observou-se uma correlação positiva entre a concentração de melatonina e o percentual de células T regulatórias do colostro de nutrizes soronegativas para IgM e IgG anti-G. lamblia (Tabela 1). Independente da reatividade ou não para G. lamblia, não houve correlação entre a

melatonina, o cortisol e as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  presentes no colostro das mães avaliadas.

**Tabela 1.** Correlação entre a concentração do hormônio melatonina e cortisol, percentual de células Tregs e citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ .

	<b>Coeficiente de correlação (R)</b>		<b>Coeficiente de correlação (R)</b>		<b>Coeficiente de correlação (R)</b>	
	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>	<b>p</b>
	<b>IgM/IgG -</b>		<b>IgM +</b>		<b>IgG +</b>	
<b>Melatonina/Cortisol</b>	-0,2985	0,5655	0,6455	0,2394	-0,7537	0,0835
<b>Melatonina/Treg</b>	0,8317	<b>0,0401*</b>	0,8660	0,0576	-0,3339	0,5177
<b>Melatonina/IL-10</b>	-0,5643	0,3217	0,2962	0,6285	-0,2571	0,6228
<b>Melatonina/TGF-<math>\beta</math></b>	0,2899	0,5773	0,5774	0,3080	0,4857	0,3287

\* Indica diferença intragrupo (IgM/IgG<sup>-</sup>)

## 6. DISCUSSÃO

*Giardia lamblia* é o protozoário intestinal humano mais comum e está distribuído em todo o mundo, causando infecções que variam de assintomáticas a diarreia crônica e má absorção (ADAM, 2021). A giardíase é considerada uma doença negligenciada, com prevalência maior em crianças de 3 a 12 anos (EINARSSON et al., 2016; FONSECA et al., 2017). Portanto, a amamentação torna-se uma importante fonte de proteção a essa parasitose, tendo em vista que o colostro possui componentes importantes para o controle da *G. lamblia*, como células, hormônios e citocinas (PEREIRA et al., 2018).

No presente estudo a concentração de melatonina diminuiu em colostro de mães que tiveram um contato recente com *G. lamblia*. Por outro lado, numa infecção tardia houve aumento na concentração desse mesmo hormônio. Corroborando com esse resultado, um estudo revelou que durante infecções por *G. lamblia* ocorre um aumento na concentração do hormônio melatonina, assim como em pacientes infectados por *Entamoeba histolytica* (AL-HADRAAWYA et al., 2016; AL-HADRAAWY, 2018), o que poderia ser explicado por sua ação imunomoduladora, importante no controle da giardíase, considerando que esse mesmo hormônio é capaz de aumentar fagocitose de fagócitos mononucleares de colostro em contato com trofozoíto de *G. lamblia* (FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; PEREIRA et al., 2018).

Dentre os hormônios presentes no colostro destaca-se a melatonina e cortisol que possuem importante ação imunomoduladora em células do colostro (FAGUNDES et al., 2012; HARA et al., 2013). Durante a gestação a produção de melatonina segue ritmo circadiano, com sua produção maior durante períodos noturnos, e a partir da 24<sup>a</sup> semana de gestação essa produção aumenta comparado a mulheres não grávidas e retornando aos valores não gestacionais no puerpério. Durante o período gestacional fica evidente que ocorre transferência materna de melatonina, o que contribuiu para uma produção circadiana de melatonina fetal, tendo em vista que níveis maiores de melatonina foram encontrados em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos que nasceram durante período noturno e com concentrações maiores nas artérias umbilicais comparado a veia umbilical (NAKAMURA et al., 2001).

Após a gestação, onde inicia-se a amamentação, a melatonina segue produção circadiana, com uma produção maior em 35% em relação a melatonina sérica, além de apresentar alterações de concentração dependendo da fase de maturação do leite materno, se mantendo estável em condições de armazenamento com congelamento e descongelamento do leite materno, o que é importante para o estabelecimento e manutenção de ritmos biológicos e sincronização do recém-nascido (FRANÇA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2013; MOLAD *et al.*, 2019; VINE *et al.*, 2022).

Em infecções por diversos parasitos protozoários a melatonina atuou como importante fator tanto na indução de resposta imunológica efetora, bem como na imunomodulação, contribuindo para prevenção de danos teciduais causados por infecções com protozoários (FRANÇA-BOTELHO *et al.*, 2012; DARYANI *et al.*, 2018). Como evidencia o estudo feito por Santello *et al.*, 2007 que demonstrou que o uso de melatonina em ratos infectados com *Trypanosoma cruzi* foi responsável por reduzir significativamente no número de tripomastigotas sanguíneos em infecções agudas, como também o aumento de leucócitos, IL-2 (Interleucina 2) TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Interferon-gama) no pico da parasitemia e a proteção do tecido cardíaco com diminuição de infiltrados inflamatórios e a presença de amastigotas no local.

Outro estudo que avaliou os efeitos do tratamento com melatonina em ratos infectados com *Enterobius vermicularis* demonstrou que o grupo tratado com o hormônio teve diminuição no número de ovos e vermes, bem como no aumento de leucócitos no intestino e diminuição de pontos de necrose intestinal, demonstrando mais uma vez um efeito protetor da melatonina em infecções parasitárias (SHAIMAA *et al.*, 2021).

Neste estudo avaliamos a concentração de cortisol no sobrenadante de nutrizes com ou sem anticorpos IgM e IgG anti-*G. lamblia* e independentemente da soropositividade as concentrações de cortisol foram similares entre os grupos avaliados. Estudo anterior evidenciou efeitos dos hormônios melatonina e cortisol sobre fagócitos de colostro em interação com *G. lamblia* o que sugere que esses hormônios podem regular a atividade funcional de células do colostro e ser um importante mecanismo de defesa para proteção e tratamento de doenças parasitárias (PEREIRA *et al.*, 2018).

Estudo experimental com gerbils infectados com *G. lamblia* e tratados com hidrocortisona mostrou que esse grupo teve recrudescência maior da doença

(LEWIS *et al.*, 1987). Enquanto que em estudo recente com gerbils também infectados por *G. lamblia* e tratados com dexametasona mostrou que esse glicocorticoide foi capaz de inibir a formação de pontos de inflamação no epitélio do duodeno, mantendo vilosidades longas e íntegras, além de promover aumento de área de mucinas intestinais em relação ao controle infectado não tratado, demonstrando que o fármaco foi responsável por evitar o surgimento de lesões durante enterite causada pela infecção por *G. lamblia*, causada pela exacerbação da resposta imunológica local (AMARAL *et al.*, 2021).

Em outros estudos com diversas infecções parasitárias foi demonstrado o aumento nos níveis de cortisol, como em infecção experimental por *Leishmania infantum*, onde esse aumento foi correlacionado com o aumento de IL-10 e TGF- $\beta$  e correlacionado negativamente com leucócitos e IFN- $\gamma$  (BARROS-GONÇALVES *et al.*, 2021). Esse aumento do cortisol também foi evidenciado em infecções humanas como na leishmaniose visceral (VERDE *et al.*, 2011), malária (ABDAGALIL e ELBAGIR, 2009) e chagas (SAVINO, 2017).

Somando a alterações nos níveis de melatonina, células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> apresentaram uma porcentagem maior em colostro de mães positivas para IgM comparado ao grupo controle e positivo para IgG anti-*G. lamblia*, demonstrando que a infecção por *G. lamblia* desenvolve um ambiente regulatório. Células Tregs são uma das maiores populações celulares capazes de induzir tolerância imunológica, constituindo de 5 a 10% das células TCD4<sup>+</sup>, tornando-se importante na manutenção da homeostase do sistema imunológico e na prevenção de autoimunidade (JOSEFOWICZ *et al.*, 2012).

Estudo com bovinos infectados com *G. lamblia* demonstraram que ocorre proliferação de células TCD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, sugerindo a existência de mecanismos regulatórios durante a giardíase (GRIT *et al.*, 2014). Em contrapartida, em camundongos com susceptibilidade a infecção por *G. lamblia* ocorre aumento no número de células Tregs em relação a Th17, indicando que ocorre uma supressão da resposta inflamatória conduzida por Th17 e dificultando uma resposta protetora ao parasito (YORDANOVA *et al.*, 2019).

O aumento de células Tregs em infecções por *G. lamblia* é observada tanto em humanos parasitados quanto em animais de experimentação, demonstrando que

essa resposta regulatória é importante para prevenção de danos teciduais induzidos por uma resposta imunológica exacerbada em infecções crônicas. No entanto, essa ativação precoce pode favorecer ao aumento de carga parasitária e manifestações clínicas mais graves (YAHYA *et al.*, 2014; REYES-DUARTE *et al.*, 2022).

Células Tregs sofrem a influência do hormônio cortisol, como também da melatonina. A exposição de células mononucleares a dexametasona em um período de 24 horas foi capaz de reduzir a expressão de FOXP3, CD28 e CD80, representando os efeitos de um estresse agudo. Essa mesma exposição em um período de 11 dias reduziu o equilíbrio de citocinas Th1/Th2 e expressão de CTLA-4, como o resultado do estresse crônico (XIANG e MARSHALL, JR., 2010). Enquanto, a administração *in vitro* de melatonina diminuiu a resposta de células Th1 e Th17 e a produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas e aumentou a expressão de FOXP3 e produção de IL-10 em células CD4<sup>+</sup> de pacientes com miastenia gravis, indicando a ação imunorregulatória do hormônio melatonina (CHANG *et al.*, 2020), corroborando com nossos resultados que evidenciaram uma correlação positiva entre a melatonina e células T regulatórias.

Sabe-se que células TREGS intestinais são capazes de regular respostas imunológicas a alimentos, autoantígenos e microbiota, por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$  (MAJLESSI *et al.*, 2008). Este estudo evidenciou que a infecção com *G. lamblia* não alterou significativamente a concentração de IL-10, mas aumentou a concentração de TGF- $\beta$  no colostro. Corroborando com nossos resultados, estudo prévio demonstrou o aumento na produção de TGF- $\beta$  por células mononucleares quando exposta a trofozoítos de *G. lamblia* (BRUNE *et al.*, 2021). De maneira geral, o TGF- $\beta$  diminui a resposta imunológica celular e em algumas infecções determina quadros sintomáticos (BANSAL *et al.*, 2005). Enquanto Tregs que liberam grandes concentrações IL-10 evita quadros de disbiose e inflamação intestinal presentes em infecção por *G. lamblia* (DANN *et al.*, 2018).

Estudos que avaliaram a produção de citocinas em animais infectados por *G. lamblia* evidenciou que ocorre a produção de citocinas tanto inflamatórias como IFN- $\gamma$ , bem como a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 (Interleucina 4), que é responsável por estimular Th2 (*T helper 2*) e inibir repostas Th1 (*T helper 1*),

assim como IL-10, responsável por contrabalancear respostas inflamatórias, suprimindo a atuação de macrófagos e evitando danos teciduais imunomediados (REDPATH *et al.*, 2014; MAHMOUD *et al.*, 2018; ABO-ZAID; HAMDY, 2022).

Este mesmo cenário ocorre em humanos infectados com *G. lamblia*, com aumento na produção de IL-10 durante a infecção e o aumento dessa citocina em relação a IFN- $\gamma$ , demonstrando a sua importância na proteção tecidual a excesso de respostas inflamatórias (SAGHAUG *et al.*, 2016; WEATHERHEAD *et al.*, 2017; KHALAF *et al.*, 2021).

É demonstrado pela literatura que em infecções concomitantes entre helmintos e outros microrganismos, como bactérias, vírus e protozoários, esses patógenos tendem a suprimir respostas do tipo Th1 e Th2 e induzir ao aumento das respostas regulatórias, com a ação de células Tregs produzindo e secretando IL-10 e TGF- $\beta$ , fazendo com que se protejam da resposta imunológica do hospedeiro (EZENWA e JOLLES, 2011; CHARD *et al.*, 2019).

Em estudo que comparou a produção de diversas citocinas de diferentes perfis imunológico, bem como a produção de anticorpos entre infecção experimental e imunização oral com VSPs em gerbils, evidenciou que nos dois eventos ocorreu o aumento da produção de TGF- $\beta$  e que a produção dessa citocina estaria relacionada com o aumento de S-IgA (Imunoglobulina A secretória) e a diminuição da ocorrência de inflamação intestinal nos animais que foram imunizados (SERRADELL *et al.*, 2018).

Em outras infecções humanas por diferentes protozoários como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*, é evidenciado que ocorre aumento de produção de TGF- $\beta$ , por meio da indução da diferenciação de células TCD4<sup>+</sup> em células iTregs, como mecanismo de evasão a resposta imunológica do hospedeiro (CHULANETRA e CHAICUMPA, 2021).

Essas citocinas inibem a resposta inflamatória por terem função imunomoduladora na infecção. Esta resposta imunorregulatória intestinal pode ser induzida pelo hospedeiro a fim de reduzir a inflamação e dano tecidual imunomediado ou pelo próprio parasita a fim de promover sua persistência no intestino. Portanto, a liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  durante infecções por *G. lamblia* é

importante para prevenir o recrutamento de células inflamatórias (ZHOU *et al.*, 2007; GRIT *et al.*, 2014; LOPEZ-ROMERO *et al.*, 2015).

## 7. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos no estudo, que demonstrou o aumento de células Tregs e TGF- $\beta$  em colostro de mães com reatividade para IgM anti *G. lamblia*, pode-se concluir que a melatonina pode estar exercendo uma ação direta sobre as células Tregs e gerando um ambiente regulatório durante uma infecção por *G. lamblia*, uma vez que houve correlação positiva entre a concentração de melatonina e o percentual de células T regulatórias, tanto no colostro de mães soronegativas para IgM e IgG anti-*G. lamblia*. E que esse ambiente regulatório é importante para controlar os efeitos do excesso de uma resposta imunológica, que traz prejuízos tanto para a mãe quanto para o recém-nascido. Sendo assim a amamentação é importante fator para controle de infecções parasitárias quanto no controle de inflamações exacerbadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDAGALIL M. A.; ELBAGIR N. M. *Effect of falciparum malaria on some plasma proteins in males: With special reference to the levels of testosterone and cortisol. African Journal of Biochemistry Research.* v. 3, n. 11, p. 349-355, nov, 2009.
- ABDEL-HAFEEZ E. H. *et al. Breast-feeding protects infantile diarrhea caused by intestinal protozoan infections. The Korean Journal of Parasitology.* v. 51, n. 5, p. 519-524, oct, 2013.
- ABO-ZAID, M. A.; HAMDI, A. A. *Evaluation of immune response and haematological parameters in infected male albino rats by giardiasis. Parasite Immunology,* v. 44, n. 4-5, feb, 2022.
- ACUÑA-CASTROVIEJO D. *et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. Cellular and molecular life sciences : CMLS.* v. 71, n. 16, p. 2997-3025, aug, 2014.
- ADAM R. D. *Biology of Giardia lamblia. Clinical Microbiology Reviews.* v. 14, n. 3, p. 447-475, jul, 2001.
- ADAM R. D. *Giardia duodenalis: Biology and Pathogenesis. Clinical microbiology reviews.* v. 34, n. 4, e00024-19, aug, 2021.
- AGNAMEY P. *et al. Evaluation of four commercial rapid immunochromatographic assays for detection of Cryptosporidium antigens in stool samples: a blind multicenter trial. Journal of clinical microbiology.* v. 49, n. 4, p. 1605-1607, apr. 2011.
- AL-HADRAAWY S. K. *et al. Ghrelin and melatonin as biomarkers in patients with giardiasis. Biotechnology & Biotechnological Equipment.* v. 30, n. 3, p. 553-557, feb, 2016.
- AL-HADRAAWY, SALEEM KHTEER. *Study role of melatonin and leptin in patient infected with Entamoeba histolytica. Research Journal of Pharmacy and Technology.* v. 10, n. 10, p. 3471–3473, mar, 2018.
- ALLAN S. E. *et al. The role of 2FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. The Journal of Clinical Investigation.* v. 115, n. 11, p. 3276–3284, nov, 2005.
- AL-MEGRIN W. A. *et al. Preventive role of probiotic bacteria against gastrointestinal diseases in mice caused by Giardia lamblia. Bioscience reports.* v. 41, n. 2, feb, 2021.
- AL-MEKHLAFI H. M. *et al. Burden of Giardia duodenalis infection and its adverse effects on growth of schoolchildren in rural Malaysia. PLoS neglected tropical diseases.* v. 7, n. 10, oct, 2013.

- AMARAL R. S. *et al.* Effect of dexamethasone on experimental enteritis produced by *Giardia lamblia* in a *Meriones unguiculatus* model. **Experimental Parasitology**. v. 230, p. 108158, nov, 2021.
- ANDREAS N. J. *et al.* Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. **Early Human Development**.v. 91, n. 11, p. 629-635, nov, 2015.
- BANSAL D. *et al.* Role of cholesterol in parasitic infections. **Lipids in Health and Disease**. v. 4, p. 1-7, may, 2005.
- BARASH N. R. *et al.* *Giardia* Colonizes and Encysts in High-Density Foci in the Murine Small Intestine. **mSphere**. v. 2, n. 3, may. 2017.
- BARROS-GONÇALVES T. DE D. *et al.* Increased levels of cortisol are associated with the severity of experimental visceral leishmaniasis in a *Leishmania (L.) infantum*-hamster model. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 15, n. 11, p. e0009987, nov, 2021.
- BAYRAKTAR M. R. *et al.* Role of IL-2, IL-4 and IL-10 in patients infected with *Giardia lamblia*. **Türkiye Parazitoloji Dergisi - Turkish Journal of Parasitology**. v. 29, n. 3, p. 160-162, 2005.
- BENNETT C. L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nature Genetics**. v. 27, n. 1, p. 20-21, jan, 2001.
- BERKMAN D. S. *et al.* Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. **The Lancet**. v. 359, n. 9306, p. 564-571, feb, 2002.
- BERNANDER R. *et al.* Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. **Cellular Microbiology**. v. 3, n. 1, p. 55-62, jan, 2001.
- BESEDOVSKY H. O.; DEL REY A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine reviews**. v. 17, n. 1, p. 64-102, feb, 1996.
- BESEDOVSKY L. *et al.* Sleep and immune function. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**. v. 463, n. 1, p. 121- 137, jan, 2012.
- BILATE A. M.; LAFAILLE J. J. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. **Annual Review of Immunology**. v. 30, p. 733-58, jan, 2012.
- BOCIAN K. *et al.* Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. I: Origin, Phenotype, Mechanisms. **Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis**. v. 65, n. 6, p. 501-520, dec, 2017.
- BRUNE M. *et al.* Effects of Cytokines IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  on the Functional Activity of Blood Mononuclear Cells against *Giardia lamblia*. **Iranian Journal of Parasitology**. v. 16, n. 2, p. 209-218, apr, 2021.

BRUNKOW M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**. v. 27, n. 1, p. 68-73, jan, 2001.

BURET A. G. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. **Gut**. v. 56, n. 3, p. 316-317, mar, 2007.

BUSATTI H. G. N. O. *et al.* The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we?. **Biologics :Targets & Therapy**. v. 3, p. 273-287, jul, 2009.

CABRERA-RUBIO R. *et al.* The human Milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 96, n. 3, p. 544-551, sep, 2012.

CACCIÒ S. M. *et al.* Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 66, p. 335-345, dec. 2018.

CAMPBELL D. A. J. *et al.* Breast feeding and maternal-donor renal allografts. Possibly the original donor-specific transfusion. **Transplantation**. v. 37, n. 4, p.340-344, apr, 1984.

CARRILLO-VICO A. *et al.* A Review of the Multiple Actions of Melatonin on the Immune System. **Endocrine**. v. 27, n. 2, p. 189-200, jul, 2005.

CARRILLO-VICO A. *et al.* Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 18, n. 3, p. 537-539, mar, 2004.

CARTER E. R. *et al.* Nitroimidazole-refractory giardiasis: a growing problem requiring rational solutions. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, n. 1, p. 37-42, jan, 2018.

CARVALHO-COSTA F. A. *et al.* *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 49, n. 3, p. 147-153, jun, 2007.

CASTRO-SÁNCHEZ P.; MARTÍN-VILLA J. M. Gut immune system and oral tolerance **The British Journal of Nutrition**.v. 109, n. 2, p. 3-11, jan, 2013.

CDC, *Global Water, Sanitation & Hygiene*. Centers for Disease Control and Prevention. September 2020. <https://www.cdc.gov/healthywater/global/diarrhea-burden.html>.

CÉRBULO-VÁZQUEZ A. *et al.* Characterization of CD127<sup>-</sup> CD25<sup>++</sup> Treg from human colostrum. **American Journal of Reproductive Immunology**.e12806, nov, 2017. 9p.

CHANG, T. *et al.* Melatonin exerts immunoregulatory effects by balancing peripheral effector and regulatory T helper cells in myasthenia gravis. **Aging**. v. 12, n. 21, p. 21147–21160, nov, 2020.

CHARD A. N. *et al.* Associations between soil-transmitted helminthiasis and viral, bacterial, and protozoal enteroinfections: a cross-sectional study in rural Laos. **Parasites & Vectors**. v. 12, n. 1, may, 2019.

CHATILLA T .A. *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. **The Journal of clinical investigation** v. 106, n. 12, p. 75-81, dec, 2000.

CHIDA Y.; STEPTOE A. Cortisol awakening response and psychosocial factors: a systematic review and meta-analysis. **Biological Psychology**. v. 80, n. 3, p. 265-278, mar, 2009.

CHULANETRA M.; CHAICUMPA W. Revisiting the Mechanisms of Immune Evasion Employed by Human Parasites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 11, jul, 2021.

COELHO C. H. *et al.* Giardiasis as a neglected disease in Brazil: Systematic review of 20 years of publications. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 11, n. 10, oct. 2017.

CONSONNI F. *et al.* IL-2 Signaling Axis Defects: How Many Faces? **Frontiers in Pediatrics**. v. 9, n. 669298, jul, 2021.

CORRÊA V. S. C. *et al.* Atividade funcional dos fagócitos na presença do fitoterápico “Mais Vida”. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 2, p. 26-32, 2006.

COSOVANU C. e NEUMANN C. The Many Functions of Foxp3 + Regulatory T Cells in the Intestine. **Frontiers in immunology**. v. 11, oct, 2020.

CUROTTO DE LAFAILLE M. A.; LAFAILLE J. J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**. v. 30, n. 5, p. 626-635, may, 2009.

DANN S. M. *et al.* Giardia Infection of the Small Intestine Induces Chronic Colitis in Genetically Susceptible Hosts. **Journal of immunology**. v. 201, n. 2, p. 548-559, jul, 2018.

DARDENNE M. *et al.* Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytofluorometry. **Endocrinology**. v. 134, n. 5, p. 2108-2114, may, 1994.

DARYANI A. *et al.* The potential use of melatonin to treat protozoan parasitic infections: A review. **Biomedicine & pharmacotherapy**. v. 97, p. 948 – 957, jan, 2018.

DIAMOND, L. S.; HARLOW, D. R.; CUNNICK, C. C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 72, n. 4, p. 431–432, jan. 1978.

ECKMANN L. *et al.* Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. **Journal of Immunology**. v. 164, n. 3, p. 1478-1487, feb, 2000.

- ECKMANN L. *Mucosal defences against Giardia*. **Parasite Immunology**. v. 25, n. 5, p. 259-270, may, 2003.
- EINARSSON E. *et al.* *An up-date on Giardia and giardiasis*. **Current Opinion in Microbiology**. v. 34, p. 47-52, dec. 2016.
- ENGLER A. C. *et al.* *Breastfeeding may improve nocturnal sleep and reduce infantile colic: potential role of breast milk melatonin*. **European journal of pediatrics**. v. 171, n. 4, p. 729-732, apr, 2012.
- ESCOBEDO A. A. *et al.* *Giardiasis: the ever-present threat of a neglected disease*. **Infectious Disorders - Drug Targets**. v. 10, n. 5, p. 329-348, oct, 2010.
- ESCOBEDO A. A. *et al.* *Management of chronic Giardia infection*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 12, n. 9, p. 1143-1157, jul, 2014.
- ESTERHÁZY D. *et al.* *Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance*. **Nature immunology**. v. 17, n. 5, may, 2016.
- EZENWA V. O.; JOLLES A. E. *From Host Immunity to Pathogen Invasion: The Effects of Helminth Coinfection on the Dynamics of Microparasites*. **Integrative and Comparative Biology**. v. 51, n. 4, p. 540–551, jul, 2011.
- FAGUNDES D. L. G. *et al.* *Immunomodulatory effects of Poly (Ethylene Glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes*. **International Journal of Pharmacology**. v. 8, n. 6, p. 510-518, 2012.
- FAVERO G. *et al.* *Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation*. **International journal of endocrinology**. v. 2017, p. 1-13; oct, 2017.
- FENG Y.; XIAO L. *Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24, n. 1, jan. 2011.
- FERNANDES F. C.; BARBOSA F. H. F. *Ocorrência de parasitoses intestinais entre crianças da creche menino Jesus do município de Dores do Indaiá, Minas Gerais*. **Ciência Equatorial**. v. 12, n. 4, p. 20-24, 2011.
- FERNANDES R. T. S. *et al.* *Melatonin bioengineered: A New Possible Strategy for Treatment of Breast Cancer*. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**. v. 5, n. 10, p. 9-18, oct, 2018.
- FERNANDES R. T. S. *et al.* *Nanodoses of melatonin induces apoptosis on human breast cancer cells co-cultured with colostrum cells*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. v. 9; p. 4416-4423, 2019.
- FIELD C. J. *The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants*. **The Journal of Nutrition**. v. 135, n. 1, p. 1-4, jan, 2005.
- FINK M. Y.; SINGER S. M. *The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis*. **Trends in Parasitology**. v. 3, n. 11, p. 901-913, nov, 2017.

- FOLIGNE B. *et al.* Changes in cell proliferation and differentiation of adult rat small intestine epithelium after adrenalectomy. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 46, n. 6, p. 1236-1246, jun, 2001.
- FONSECA J. F. *et al.* Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 5<sup>1A</sup> and *Weissella paramesenteroides* WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 127, n. 4, p. 1184-1191, oct, 2019.
- FONSECA R. E. P. *et al.* High prevalence of enteroparasites in children from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v. 70, n. 3, p. 566-571, jun, 2017.
- FONTENOT J. D. *et al.* Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Nature Immunology**. v. 4, n. 4, p. 330-336, apr, 2003.
- FRANÇA E. L. *et al.* Chronoimmunomodulation of melatonin bactericidal activity of human blood phagocytes. **Internet Journal of Microbiology**. v. 6, p. 1-13, 2009.
- FRANÇA E. L. *et al.* Time-dependent alterations of soluble and cellular components in human milk. **Biological Rhythm Research**. v. 41, n. 5, p. 333-347, jan, 2010.
- FRANÇA E. L. *et al.* Transfer of Maternal Immunity to Newborns of Diabetic Mothers. **Clinical and Developmental Immunology**. v. 2012, p. 1-7, aug, 2012.
- FRANÇA-BOTELHO A. C. *et al.* Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrum leukocytes. **Acta Paediatrica**. v. 95, n. 4, p. 438-443, apr, 2006.
- FRANÇA-BOTELHO A. C. *et al.* Breastfeeding and its relationship with reduction of breast cancer: a review. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**. v. 13, n. 11, p. 5327-5332, 2012.
- FRARGY E. M. *et al.* Use of melatonin as an adjuvant therapy in neonatal sepsis. **Journal of neonatal-perinatal medicine**. v. 8, n. 3, p. 227-232, 2015.
- GARGANTINI P. R. *et al.* Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Current Opinion in Microbiology**. v. 32, p. 52-58, aug, 2016.
- GEORGIEV P. *et al.* Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. **Journal of clinical immunology**. v. 39, n. 7, p. 623- 640, oct, 2019.
- GIDREWICZ D. A.; Fenton T. R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. **BMC pediatrics**. v. 14, n. 216, aug, 2014.
- GOLDMAN A. S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 12, n. 8, p. 664-671, aug, 1993.
- GOTTSTEIN B. *et al.* Antigenic variation in *Giardia lamblia*: cellular and humoral immune response in a mouse model. **Parasite Immunology**. v. 12, n. 6, p. 659-673, nov, 1990.

- GOUDAL A. *et al.* Rapid diagnostic tests relying on antigen detection from stool as an efficient point of care testing strategy for giardiasis and cryptosporidiosis? Evaluation of a new immunochromatographic duplex assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 93, n. 1, p. 33-36, jan, 2019.
- GOYAL N. *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG antagonizes Giardia intestinalis induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 29, n. 6, p. 1049-1057, jun, 2013.
- GRIT G. H. *et al.* Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against Giardia duodenalis infection in cattle. **Veterinary Parasitology**. v. 202, n. 3-4, p. 145-155, may, 2014.
- GRIT G. H. *et al.* Giardia duodenalis stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation. **Parasite Immunology**. v. 36, n. 4, p. 157-169, apr, 2014.
- GUTIÉRREZ M. *et al.* Refractory giardiasis in Spanish travellers. **Travel Medicine and Infectious Disease**. v. 11, n. 2, p. 126-129, apr, 2013.
- HADASCHIK E. N. *et al.* Regulatory T cell-deficient scurfy mice develop systemic autoimmune features resembling lupus-like disease. **Arthritis research & therapy**. v. 17, n. 1, p. 35, feb, 2015.
- HANEVIK K. *et al.* Persisting symptoms and duodenal inflammation related to Giardia duodenalis infection. **The Journal of Infection**. v. 55, n. 6, p. 524-530, dec, 2007.
- HARA C. C. P. *et al.* Melatonin Nanoparticles Adsorbed to Polyethylene Glycol Microspheres as Activators of Human Colostrum Macrophages. **Journal of Nanomaterials**. v. 2, p. 1-8, jan, 2013.
- HARDELAND R. *et al.* Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 38, n. 3, p. 313-316, mar, 2006.
- HARDELAND R.; FUHRBERG B. Ubiquitous melatonin: Presence and effects in unicells, plants and animals. **Trends in Comparative Biochemistry & Physiology**. v. 2, p. 25-45, 1996.
- HASENMAJER V. *et al.* The Immune System in Cushing's Syndrome. **Trends in endocrinology and metabolism**. v. 31, n. 9, p. 655-669, sep, 2020.
- HEYWORTH M. F. Giardia duodenalis genetic assemblages and hosts. **Parasite**. v. 23, n. 13, mar. 2016.
- HEYWORTH M. F. Immunological aspects of Giardia infections. **Parasite**. v. 21, n. 55, oct, 2014. 4p.
- HEYWORTH, M. F. Diagnostic testing for Giardia infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 108, n. 3, p. 123–125, mar, 2014.

HILL D. R.; PEARSON R. D. *Ingestion of Giardia lamblia trophozoites by human mononuclear phagocytes. Infection and Immunity.* v. 55, n. 12, p. 3155-3161, dec, 1987.

HONORIO-FRANÇA A. C. *et al. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic Escherichia coli opsonized with colostral IgA. Scandinavian Journal of Immunology.* v. 46, n. 1, p. 59-66, jul, 1997.

HONORIO-FRANÇA A. C. *et al. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostral phagocytes. Journal of Applied Biomedicine.* v. 11, n. 3 p. 153-162, feb, 2013.

HONORIO-FRANÇA A. C. *et al. Mechanism Anti-Tumor of IgA-based Delivery System on the Human Colostral Mononuclear Cells via Fc $\alpha$  Receptor. Biointerface Research in Applied Chemistry.* v. 11, n. 6, p. 14906-14917, apr, 2021.

HORI S.*et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science.* v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, feb, 2003.

HOSEA BLEWETT H. J.*The immunological components of human milk. Advances in Food and Nutrition Research.* v. 54, p. 45-80, 2008.

HRBÁČKOVÁ H. *et al. The role of T-regulatory lymphocytes in pathogenesis of preterm delivery. Ceska Gynekologie.* v. 82, n. 6, p. 487-490, 2017.

HUGHES A. *et al. The interaction of infant formula with macrophages: effect on phagocytic activity, relationship to expression of class II MHC antigen and survival of orally administered macrophages in the neonatal gut. Immunology.* v. 64, n. 2, p. 213-218, jun, 1988.

HUNTER P. R.; THOMPSON R. C. *The zoonotic transmission of Giardia and Cryptosporidium. International Journal for Parasitology.* v. 35, n. 11-12, p. 1181-1190, oct, 2005.

IGNATIUS R. *et al. High prevalence of Giardia duodenalis Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. PLoS Neglected Tropical Diseases.* v. 6, n. 6, jun, 2012. 9p.

ISLAM S. K. *et al. Immune components (IgA, IgM, IgG, immune cells) of colostrum of Bangladeshi mothers. Pediatrics International: Official Journal os The Japan Pediatric Society.* v. 48, n. 6, p. 543-548, dec, 2006.

ITALIANER M. F. *et al. Circadian Variation in Human Milk Composition, a Systematic Review. Nutrients.* v. 12, n. 8, p. 2328, aug, 2020.

JIMÉNEZ J. C. *et al. Antibody and cytokine responses to Giardia excretory/secretory proteins in Giardia intestinalis-infected BALB/c mice. Parasitology Research.* v. 113, n. 7, p. 2709-2718, jul, 2014

JOSEFOWICZ S. Z. *et al. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. Annual Review of Immunology.* v. 30, p. 531-564, jan, 2012.

JOUAN P. N. *et al. Hormones in bovine milk and milk products: A survey. International Dairy Journal.* v. 16, n. 11, p. 1408-1414, nov, 2006.

- KATZER D. *et al.* Melatonin Concentrations and Antioxidative Capacity of Human Breast Milk According to Gestational Age and the Time of Day. **Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association**. v. 32, n. 4, p. 105-110, nov, 2016.
- KHALAF M. M. *et al.* Evaluation of IL-2, IL-4 and IL-10 levels in patients with giardiasis. **Annals of parasitology**, v. 67, n. 4, 2021.
- KHAN S. *et al.* Variation in fat, lactose, and protein composition in breast milk over 24 hours: associations with infant feeding patterns. **Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association**. v. 29, n. 1, p. 81-89, feb, 2013.
- KINDER J. M. *et al.* Pregnancy-induced maternal regulatory T cells, bona fide memory or maintenance by antigenic reminder from fetal cell microchimerism? **Chimerism**. v. 5, n. 1, p. 16-19, jan-mar, 2014.
- KREUTNER A. K. *et al.* Giardiasis in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 140, n. 8, p. 895-901, aug, 1981.
- KUHLWEIN E.; IRWIN M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. **Journal of Neuroimmunology**. v. 117, n. 1-2, p. 51-57, jul, 2001.
- LABER A. *et al.* Regulatory T cells and their role in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 63, n. 6, p. 445-459, jun, 2010.
- LEWIS P. D. *et al.* Cortisone-Induced Recrudescence of *Giardia lamblia* Infections in Gerbils. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 36, n. 1, p. 33-40, jan, 1987.
- LEE D. Y. *et al.* Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. **BMB Reports**. v. 48, n. 4, p. 209-216, apr, 2015.
- LIM H. Y. *et al.* Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. **Immunology**. v. 122, n. 1, p. 47-53, sep, 2007.
- LIU L. *et al.* National, regional, and state-level all-cause and cause-specific under-5 mortality in India in 2000-15: a systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **The Lancet Global Health**. v. 7, n. 6, p. e721-e734, jun, 2019.
- LO-MAN R. Regulatory B cells control dendritic cell functions. **Immunotherapy**. v. 3, n. 4, p. 19-20, apr, 2011.
- LONG F. *et al.* Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. **Steroids**. v. 70, n. 1, p. 55-61, jan, 2005.
- LÖNNERDAL B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. **Advances in experimental medicine and biology**. v. 554, p11 - 25, 2004.

- LOPEZ-ROMERO G. *et al.* Host defences against *Giardia lamblia*. **Parasite Immunology**. v. 37, n. 8, p. 394-406, aug, 2015.
- MAHER A. *et al.* Role of anti-*Giardia* recombinant cyst wall protein IgG polyclonal antibodies in diagnosis and protection. **AMB Express**. v. 12, n. 1, 24, nov, 2022.
- MAHMUD M. A. *et al.*, Impact of breast-feeding on *Giardia lamblia* infections in Bilbeis, Egypt. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 65, n. 3, p. 257-260, sep, 2001.
- MAHMOUD A. *et al.* Assessment of the intestinal immune response in *Giardia duodenalis* experimentally infected rats using quantitative real-time PCR. **Parasitologists United Journal**. v. 11, n. 2, p. 75–81, dec, 2018.
- MAJLESSI L. *et al.* Regulatory B and T cells in infections. **Microbes and Infection**. v. 10, n. 9, p. 1030-1035, jul, 2008.
- MOHRAM A. F. *et al.* Combined Mini-Parasep SF and Nanogold Immunoassay Show Potential in Stool Antigen Immunodetection for Giardiasis Diagnosis. **Scientific Reports**. v. 10, n. 2, mar, 2020.
- MOKRZYCKA M. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in duodenum of children with *Giardia lamblia* infection. **Folia Histochemica Cytobiologica**. v. 48, n. 2, p. 191-196, jan, 2010.
- MOLAD M. *et al.* Melatonin Stability in Human Milk. **Breastfeeding Medicine**. v. 14, n. 9, p. 680–682, nov, 2019.
- MONIS P. T. *et al.* Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 3, n. 1, p. 29-38, may, 2003.
- MORAES L. C. A. *et al.* The effect of IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the functional activity of mononuclear cells in the presence of *Entamoeba histolytica*. **Parasites & vectors**. v. 8, n. 413, aug, 2015.
- MORAIS T. C. *et al.* Melatonin Action on the Activity of Phagocytes from the Colostrum of Obese Women. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**. v. 55, n. 10, p. 625, oct, 2019.
- MORCELI G. *et al.* Antioxidant Effect of Melatonin on the Functional Activity of Colostral Phagocytes in Diabetic Women. **Plos One**. v. 8, n. 2, p. 569-571, feb, 2013.
- MORF L. *et al.* The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. **Eukaryotic cell**. v. 9, n. 10, p. 1566-1576, oct, 2010.
- MORRISON H. G. *et al.* Genomic Minimalism in the Early Diverging Intestinal Parasite *Giardia lamblia*. **Science**. v. 317, n. 5846, p. 1921-1926, sep, 2007.
- MORROW A. L. Protection against infection with *Giardia lamblia* by breast-feeding in a cohort of Mexican infants. **The Journal of Pediatrics**. v. 121, n. 3, p. 363-370, sep, 1992.

- MÜLLER N.; ALLMEN N. V. *Recent Insights Into the Mucosal Reactions Associated With Giardia Lamblia Infections. International Journal for Parasitology.* v. 35, n. 13, p. 1339-1347, nov, 2005.
- NASH T. E. *et al. Antigenic variation in Giardia lamblia. The Journal of Immunology.* v. 141, n. 2, p. 636-641, jul, 1988.
- NASH T. E. *et al. Experimental Human Infections with Giardia lamblia. Journal of Infectious Diseases,* v. 156, n. 6, p. 974–984, dec, 1987.
- NAKAMURA Y. *et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to fetoplacental unit during pregnancy. Journal of Pineal Research.* v. 30, n. 1, p. 29–33, jan, 2001.
- NEMATIAN J. *et al. Giardiasis and other intestinal parasitic infections in relation to anthropometric indicators of malnutrition: a large, population-based survey of schoolchildren in Tehran. Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* v. 102, n. 3, p. 209-214, apr, 2008.
- NEVES, D. P. *et al. Parasitologia Humana.* 12 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2011.
- ORDOÑEZ-QUIROZ A. *et al. DNA damage induced by metronidazole in Giardia duodenalis triggers a DNA homologous recombination response. Experimental Parasitology.* v. 194, p. 24-31, nov, 2018.
- PACHECO F. T. F. *et al. Specific IgG and IgA Antibody Reactivities in Sera of Children by Enzyme-Linked Immunoassay and Comparison With Giardia duodenalis Diagnosis in Feces. Annals of laboratory medicine.* v. 40, n. 5, p. 382-389, sep, 2020.
- PALMEIRA P; CARNEIRO-SAMPAIO M. *Immunology of breastmilk. Revista da Associação Médica Brasileira.* v. 62, n.6, p. 584-593, sep, 2016.
- PARIGI S. M. *et al. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. Frontiers in Immunology.* v. 6, n. 415, aug, 2015. 21p.
- PAULY E. *et al. Regulatory T cells and tolerance induction. Clinical Transplantation.* v. 23, n.21, p. 10-14, dec, 2009.
- PEREIRA Q. L. C. *et al. Human colostrum action against Giardia lamblia infection influenced by hormones and advanced maternal age. Parasitology Research,* apr, 2018. 9p.
- PETRI W. A. *et al. Prospective Case-Control Study of the Association between Common Enteric Protozoal Parasites and Diarrhea in Bangladesh. Clinical Infectious Diseases.* v. 4, n. 9, p. 1191-1197, may, 2009.
- PEVET P *et al. The hormone melatonin: Animal studies. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism.* v. 31, n. 6, p. 547-559, dec, 2017.

PONTES G. N. *et al.* Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **Journal of Pineal Research**. v. 41, n. 2, p. 136-141, sep, 2006.

QUEIROZ A. A. *et al.* Phenotypic characterization of regulatory T cells populations in maternal blood, cord blood and placenta from diabetic mothers. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**. p. 1-7, nov, 2017.

QUIN Y. *et al.* Variations in melatonin levels in preterm and term human breast milk during the first month after delivery. **Scientific reports**. v. 9, 17984, nov, 2019.

RADOGNA F. *et al.* Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochemical pharmacology**. v. 80, n. 12, p. 1844-1852, dec, 2010.

READ C. *et al.* Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhea. **International Journal for Parasitology**. v. 32, n. 2, p. 229-231, feb, 2002.

REDPATH S. A. *et al.* Protection and pathology during parasite infection: IL-10 strikes the balance. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 6, p. 233–252, may, 2014.

REINER D. S. *et al.* Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 154, n. 5, p. 825-832, nov, 1986.

RENDTORFF R. C. *et al.* The Experimental Transmission of Human Intestinal Protozoan Parasites: II. *Giardia Lamblia* Cysts Given in Capsules. **American Journal of Epidemiology**. v. 59, n. 2, p. 209-222, mar, 1954.

REYES-DUARTE I. *et al.* Conjugated linoleic acid modifies transcriptional cytokine profile and induces early specific secretory IgA response in *Giardia lamblia* infected mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. v. 25, n. 12, p. 1468–1476, dec, 2022.

RIBEIRO M. R. S. *et al.* Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* in experimental giardiasis. **Beneficial Microbes**. v. 9, n. 5, p. 789-797, aug, 2018.

RIEDEL-CASPARI G. The influence of colostrum leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 35, n. 3-4, p. 275-288, jan, 1993.

RINGQVIST E. *et al.* Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. **Molecular and biochemical parasitology**. v. 159, n. 2, p. 85-91, jun, 2008.

ROBERTSON L. J. *et al.* Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop? **Trends in Parasitology**. v. 26, n. 2, p. 75-82, feb, 2010.

RODRÍGUEZ-GARCÍA R. *et al.* Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitoses in pregnant women and their relation to the infant's birth weight. **Ginecología Y Obstetricia De Mexico**. v. 70, p.338-343, jul, 2002.

RÓPOLO A. S.; TOUZ M. C. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. **The Scientific World Journal**. v. 10, p. 2019-2031, oct, 2010.

- ROSHIDI N.; ARIFIN N. *Disease Biomarkers of Giardiasis*. **Journal of Parasitology Research**. v. 2022, p. 1–12, aug, 2022.
- RYAN U. *et al.* *Giardia: an under-reported foodborne parasite*. **International Journal for Parasitology**. v. 49, n. 1, p. 1-11, jan, 2019.
- SAFINIA N. *et al.* *Promoting transplantation tolerance; adoptive regulatory T cell therapy*. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 172, n. 2, p. 158-168, may, 2013.
- SAGHAUG C. S. *et al.* *Human Memory CD4+ T Cell Immune Responses against Giardia lamblia*. **Clinical and vaccine immunology**. v. 23, n. 1, p. 11–18, sep, 2015.
- SAMUELSON J. *Why metronidazole is active against both bacteria and parasites*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 43, n. 7, p. 1533-1541, jul, 1999.
- SANTANA L. A. *et al.* *Atualidades sobre giardiase*. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 102, n. 1, p. 7-10, jan, 2014.
- SANTELLO F. H. *et al.* *Melatonin treatment reduces the severity of experimental Trypanosoma cruzi infection*. **Journal of Pineal Research**. v. 42, n. 4, p. 359–363, may 2007.
- SAVINO W. *Endocrine Immunology of Chagas Disease*. **Endocrine Immunology**. v. 2017, n. 48, p. 160–175, feb, 2017.
- SAVIOLI L. *et al.* *Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'*. **Trends in parasitology**. v. 22, n. 5, p. 203-208, may, 2006.
- SCHMIDT A. *et al.* *Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression*. **Frontiers in immunology**. v. 3, n. 51. mar, 2012.
- SERRADELL M. C. *et al.* *Cytokines, Antibodies, and Histopathological Profiles during Giardia Infection and Variant-Specific Surface Protein-Based Vaccination*. **Infection and Immunity**. v. 86, n. 6, jun, 2018.
- SHAIMAA A. *et al.* *Influence of Melatonin in the Treatment of Experimental Enterobius Vermicularis Infection*. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**. v. 15, n. 1, p. 314-317, mar, 2021.
- SILVA N. A. *et al.* *Bioactive Factors of Colostrum and Human Milk Exhibits a Day-Night Variation*. **American Journal of Immunology**. v. 9, n. 2, p. 68-74, jun, 2013.
- SINGER S. M.; NASH T. E. *T-cell-dependent control of acute Giardia lamblia infections in mice*. **Infection and immunity**. v. 68, n. 1, p. 170–175, jan, 2000.
- SOLAYMANI-MOHAMMADI S. *et al.* *Giardia duodenalis: the double-edged sword of immune responses in giardiasis*. **Experimental Parasitology**. v. 126, n. 3, p. 292-297, nov, 2010.
- SOROOSH P. *et al.* *Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance*. **The Journal of experimental medicine**. v. 210, n. 4, p. 775-788, apr, 2013.

SPRINGER S. C.; KEY J. D. *Vitamin B12 deficiency and subclinical infection with Giardia lamblia in an adolescent with agammaglobulinemia of Bruton*. **Journal of Adolescent Health**. v. 20, n. 1, p. 58-61, jan, 1997.

STADELMANN B. et al. *Arginine Consumption by the Intestinal Parasite Giardia intestinalis Reduces Proliferation of Intestinal Epithelial Cells*. **PLoS ONE**. v. 7, n. 9, p. e45325, sep, 2012.

ŠTRKOLCOVÁ G. et al. *Dog's genotype of Giardia duodenalis in human: first evidence in Europe*. **Acta Parasitologica**. v. 60, n. 4, p. 796-799, dec. 2015.

SULAIMAN I. M. et al. *Distribution of Giardia duodenalis Genotypes and Subgenotypes in Raw Urban Wastewater in Milwaukee, Wisconsin*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 6, p. 3776-3780, jun, 2004.

TELLEZ A. et al. *Antibodies in mother's milk protect children against giardiasis*. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v. 35, n. 5, p. 322-325, jul, 2003.

TROEGER C. et al. *Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 18, n. 11, p. 1211–1228, nov, 2018

TSIGOS C. et al. *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress*. **Journal of Psychosomatic Research**. v. 53, n. 4, p. 865-871, oct, 2002.

UPCROFT P.; UPCROFT J. A. *Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa*. **Clinical microbiology reviews**. v. 14, n. 1, p. 150-164, jan. 2001.

VERDE F A. L. et al. *Hormonal Disturbances in Visceral Leishmaniasis (Kala-Azar)*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 84, n. 5, p. 668–673, may, 2011.

VERHASSELT V. *Neonatal tolerance under breastfeeding influence: the presence of allergen and transforming growth factor-beta in breast milk protects the progeny from allergic asthma*. **The Journal of Pediatrics**. v. 156, n. 2, p. 16-20, feb, 2010.

VICTORA C. G. et al. *Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect*. **Lancet**. v. 387, n. 10017, p. 475-490, jan, 2016.

VINE T. et al. *Melatonin use during pregnancy and lactation: A scoping review of human studies*. **Brazilian Journal of Psychiatry**. v. 44, n. 3, p. 342–348, jun, 2022.

VIVANCOS V. et al. *Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 15, p. 1287-1303, sep, 2018.

WANG Y. et al. *Epidemiological distribution of genotypes of Giardia duodenalis in humans in Spain*. **Parasites & vectors**. v. 12, n. 432, sep. 2019.

WARD H. D. *Intestinal Protozoal Parasites and Diarrheal Disease in Bangladesh*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, n. 9, p. 1198-1200, may, 2009.

WATKINS R. R.; ECKMANN L. *Treatment of giardiasis: current status and future directions. **Current Infectious Disease Reports.*** v. 16, n. 2, p. 396, feb, 2014.

WEATHERHEAD J. *et al. Comparison of Cytokine Responses in Ecuadorian Children Infected with Giardia, Ascaris, or Both Parasites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,*** v. 96, n. 6, p. 1394–1399, jun, 2017.

WEINER H. L. *et al. Oral Tolerance. **Immunological Reviews.*** v. 241, n. 1, p. 241-259, may, 2011.

World Health Organization (WHO). **UNICEF.** *Global Strategy for Infant and Young Child. Feeding.* dec, 2003, 30p.

XIANG, L.; MARSHALL, JR., G. D. *Immunomodulatory effects of in vitro stress hormones on FoxP3, Th1/Th2 cytokine and costimulatory molecule mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells. **Neuroimmunomodulation.*** v. 18, n. 1, p. 1–10, jul, 2010.

YAHYA R. S. *et al. Natural Regulatory T Cells in Some Parasitic Diseases. **Journal of Bacteriology and Parasitology.*** v. 6, n. 1, p. 1000210, nov, 2014.

YORDANOVA I. A. *et al. ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Treg to Th17 ratios correlate with susceptibility to Giardia infection. **Scientific reports.*** v. 9, n. 1, dec, 2019.

ZHENG S. G. *et al. Natural and induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells educate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. **Journal of immunology.*** v. 172, n. 9, p. 5213-5221, may, 2004.

ZHOU P. *et al. Tumour necrosis factor alpha contributes to protection against Giardia lamblia infection in mice. **Parasite immunology.*** v. 29, n. 7, p. 367-374, jul, 2007.

## **APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

**I - TÍTULO DA PESQUISA:** EFEITOS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS DO SANGUE E COLOSTRO MODULADAS PELOS HORMÔNIOS MELATONINA E CORTISOL NA INFECÇÃO POR *GIARDIA LAMBLIA*.

**1. Pesquisadores e instituições envolvidas:** Me. Adriele Ataiades de Queiroz – Campus Universitário do Araguaia – Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT)

Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório-França - Campus Universitário do Araguaia - Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Prof. Dr. Eduardo Luzía França - Campus Universitário do Araguaia - Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

**2. Justificativa e objetivos:** Como informado, o parasito intestinal, *Giardia lamblia*, juntamente com determinados hormônios, sendo eles, melatonina e cortisol, podem modificar alguns componentes do sistema de defesa do organismo. É possível que isto influencie na qualidade do leite materno que protege a criança contra infecções. Por este motivo, para o desenvolvimento deste projeto, será necessário a coleta de leite materno (colostro) e sangue para avaliarmos se o parasito e os hormônios podem influenciar na atividade de determinados componentes do sistema de defesa materno.

**3. Procedimentos:** Coleta de sangue, em um volume aproximado de 8 ml, por punção venosa e coleta de leite humano (colostro) excedente, cerca de 8 ml, por ordenha manual (retirada manual do leite, através de massagem e expressão das mamas).

**4. Possíveis riscos e desconforto:** Os riscos e desconforto são mínimos, pois a coleta de sangue e colostro é feita com técnica adequada por profissionais devidamente habilitados e com materiais descartáveis, mas poderá haver certo desconforto, resultante da expressão manual das mamas. Em caso de relato de qualquer incômodo, a coleta será interrompida imediatamente.

**5. Benefícios previstos:** Para as atuais participantes do estudo: incentivo à amamentação, assistência e orientações sobre a amamentação, melhora nos conhecimentos sobre os mecanismos de defesa imunológica presentes no leite, que são passados aos seus filhos durante a amamentação. Acredita-se que o benefício a ser obtido será um melhor conhecimento sobre a influência da giardíase na qualidade do leite materno e seus componentes imunológicos, favorecendo o desenvolvimento de condutas futuras que poderão beneficiar as pacientes, evitando maiores riscos aos recém-nascidos.

**II - OBSERVAÇÃO:** Atendendo a resolução CNS 466/12, este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em duas vias, devidamente assinadas pelo pesquisador, uma via deste termo será entregue ao participante da pesquisa e a outra ficará sob a guarda pesquisador.

**III - ENCERRAMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu.....  
.....fui informada dos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios desta pesquisa, descritos acima. Entendo que terei garantia de confidencialidade, ou seja, que apenas os resultados dos exames realizados com o sangue e leite materno serão divulgados e ninguém, além dos pesquisadores, terá acesso aos nomes dos participantes desta pesquisa. Entendo também, que tenho direito de receber, sempre que desejar, outras informações sobre o estudo, entrando em contato com a pesquisadora (Me. Adriele Ataidés de Queiroz). Fui informada ainda, que a minha participação é voluntária e que, se eu preferir não participar ou deixar de participar deste estudo em qualquer momento, isso NÃO influenciará no meu atendimento junto ao Hospital. Compreendendo tudo o que me foi explicado sobre o estudo e, estando de acordo em participar, assino embaixo.

**Assinatura do participante (ou do responsável, se menor):**

---

**Assinatura do pesquisador principal:**

---

Me. Adriele Ataidés de Queiroz. Rodovia BR-070, Km 5. Barra do Garças - Mato Grosso. CEP: 78600-000. E-mail: adrieleaqueiroz@hotmail.com

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

## ANEXO A – Aprovação do CEP - CUA/UFMT

UFMT - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE MATO GROSSO -  
CAMPUS DO ARAGUAIA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITOS DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS DO SANGUE E COLOSTRO MODULADAS PELOS HORMÔNIOS MELATONINA E CORTISOL NA INFECÇÃO POR *Giardia lamblia*.

**Pesquisador:** Adenilda Cristina Honorio França

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 05524918.0.0000.5587

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.151.830

#### Apresentação do Projeto:

O projeto está bem apresentado.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os mecanismos imunoregulatórios envolvidos na infecção por *G. lamblia* no que tange a modulação pelos hormônios melatonina e cortisol sobre o percentual de células T regulatórias e citocinas em sangue materno e colostro de mães soropositivas para giardíase.

Objetivo Secundário:

Analisar comparativamente em sangue materno e colostro de mães soropositivas para giardíase: A concentração dos hormônios melatonina e cortisol; Imunofenotipagem e percentuais de células CD4+, CD25+, FOXP3+ e a concentração de IL-10 e TGF-; Avaliar in vitro: Os efeitos dos hormônios melatonina e cortisol sobre a expressão de células T regulatórias na presença da *Giardia lamblia*; A expressão de células Treg produzindo IL-10 e TGF- intracelular na presença de melatonina e cortisol durante interações com a *G. lamblia*; A concentração de IL-10 e TGF- em sobrenadante de cultura de células T regulatórias e *G. lamblia* na presença dos hormônios melatonina e cortisol.

**Endereço:** Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

**Bairro:** Campus do Araguaia

**CEP:** 78.698-000

**UF:** MT

**Município:** PONTAL DO ARAGUAIA

**Telefone:** (66)3402-1121

**E-mail:** professoramarlyaugusta@gmail.com

UFMT - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE MATO GROSSO -  
CAMPUS DO ARAGUAIA



Continuação do Parecer: 3.151.830

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos relatados pelos autores: Desconforto pequeno ocasionado as puérperas. A colheita do colostro e sangue será um processo indolor, apresentando incômodo ou não.

Benefícios segundo os autores: Para as mães participantes do estudo será o incentivo à amamentação, assistência e orientações sobre a amamentação, melhora nos conhecimentos sobre os mecanismos de defesa imunológica presentes no leite, que são passados aos seus filhos durante a amamentação. Acredita-se que o benefício a ser obtido será um melhor conhecimento sobre a influência da giardíase na qualidade do leite materno e seus componentes imunológicos, favorecendo o desenvolvimento de condutas futuras que poderão beneficiar as pacientes, evitando maiores riscos aos recém nascidos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os autores destacam que a giardíase é uma doença parasitária reemergente devido a sua crescente e reconhecida importância em surtos de doenças diarreicas em creches e em epidemias transmitidas pelo consumo de água contaminada. Destacou-se ainda uma prevalência importante dessa parasitose no Brasil, atingindo principalmente a faixa etária das crianças. Ainda, foi relatado uma escassez na literatura de estudos sobre os mecanismos regulatórios envolvidos durante a giardíase, sobretudo associada à amamentação, assim como o efeito dos hormônios cortisol e melatonina sobre células Tregs durante interações com Giardia lamblia. Diante desse cenário, este projeto irá contribuir e trazer informações importantes para um maior conhecimento sobre essa patologia.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi apresentado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), incluindo justificativa, riscos e benefícios, elaboração em duas vias, bem como endereço e contato do pesquisador.

**Recomendações:**

Recomendo acrescentar endereço e contato telefônico ou outro do CEP local no TCLE.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O presente projeto apresentou cronograma apropriado.

Após avaliação, sou favorável a aprovação deste projeto e submeto meu parecer ao colegiado do Comitê de Ética local.

**Endereço:** Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

**Bairro:** Campus do Araguaia

**CEP:** 78.698-000

**UF:** MT

**Município:** PONTAL DO ARAGUAIA

**Telefone:** (66)3402-1121

**E-mail:** professoramarlyaugusta@gmail.com

**UFMT - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE MATO GROSSO -  
CAMPUS DO ARAGUAIA**



Continuação do Parecer: 3.151.830

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1246144.pdf	18/12/2018 16:11:46		Aceito
Outros	Instrumento_coleta.pdf	18/12/2018 15:44:53	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Cronograma	PLANO_TRABALHO_CRONOGRAMA.pdf	18/12/2018 15:43:41	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/12/2018 15:43:27	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa.pdf	18/12/2018 15:43:08	Adenilda Cristina Honório França	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	18/12/2018 12:25:22	Adenilda Cristina Honório França	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PONTAL DO ARAGUAIA, 18 de Fevereiro de 2019

---

**Assinado por:  
Olegário Rosa de Toledo  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

**Bairro:** Campus do Araguaia

**CEP:** 78.698-000

**UF:** MT

**Município:** PONTAL DO ARAGUAIA

**Telefone:** (66)3402-1121

**E-mail:** professoramartyaugusta@gmail.com