



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ERICA DE SOUZA FERNANDES

**PRODUÇÃO DE IL-2 E IL-10 POR LINFÓCITOS E
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS
DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS EM
RESPOSTA À OVALBUMINA**

RECIFE - PE

2013

ERICA DE SOUZA FERNANDES

**PRODUÇÃO DE IL-2 E IL-10 POR LINFÓCITOS E
MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS ADULTOS
DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS EM
RESPOSTA À OVALBUMINA**

Dissertação apresentada ao colegiado do
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Tropical do Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do título de
mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

RECIFE-PE

2013

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva - CRB4-1662

F363p Fernandes, Erica de Souza.
Produção de IL-2 e IL-10 por linfócitos e macrófagos de camundongos adultos descendentes de mães esquistossomóticas em resposta à ovalbumina / Erica de Souza Fernandes. – Recife: O autor, 2013.
69 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui referências apêndice e anexos.

1. Schistosoma mansoni. 2. Aleitamento Materno. 3. Gravidez. 4. Imunomodulação. 5. Camundongos. 6. Ovalbumina. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de. (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-019)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPEQ)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO

ÉRICA DE SOUZA FERNANDES

No dia 28 de fevereiro de 2013, às 14h00, na Sala de Aula do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Bloco A, Térreo do Hospital das Clínicas, os Membros Doutores a Prof^ª. Dr^ª. Vladia Maria de Assis Costa – Presidente da Banca (UFPE), a Prof^ª. Dr^ª. Joelma Rodrigues de Souza (UFPB) e a Prof^ª. Dr^ª. Sheilla Andrade de Oliveira (CPqAM/FIOCRUZ), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda ÉRICA DE SOUZA FERNANDES sobre a sua Dissertação intitulada “Produção de IL-2 e IL-10 por linfócitos e macrófagos de camundongos adultos descendentes de mães esquistossomóticas em resposta à ovalbumina”, a qual foi orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª Vladia Maria de Assis Costa

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª Joelma Rodrigues de Souza

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Sheilla Andrade de Oliveira

APROVADA



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

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vláudia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Ana Catarina de Souza Lopes

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Dedico este trabalho e tudo o que sou à minha mãe, Etiene, sempre presente, me encorajando e incentivando a seguir em frente. Meu alicerce, meu espelho, minha vida! Te amo mãe!

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

À minha mãe Etiene sempre, pelo apoio incondicional, pelas palavras certas nas horas certas, pela amizade, pelo amor que faz de mim o que sou. Pelas noites mal dormidas, por nunca me deixar desistir e nem esquecer que todo esforço vale a pena e que o sucesso é fruto de muita dedicação.

Ao meu irmão Gilberto (Bebeto), pelo companheirismo, pela amizade, lealdade e pelo amor que temos um pelo outro.

A todos os tios, primos, minhas avós, enfim, todos os familiares que me apoiaram nesta caminhada.

À Prof.^a Valdênia Souza pela confiança no meu trabalho e pela orientação, sem a qual nada disso seria possível. Pela disponibilidade em todos os momentos e por todos os conhecimentos a mim repassados.

À Rafaela, que além de companheira de trabalho se tornou uma grande amiga. Aprendi que posso contar com você a qualquer momento. Muito obrigada por tudo, madrinha científica, pelo apoio moral e profissional, por compartilhar comigo de todos os momentos deste trabalho, onde superamos juntas todas as dificuldades com muita determinação e alegria mesmo diante de 200 tubos de citometria.

À Patrícia, pelos ensinamentos e paciência desde o início. Pelo apoio e companheirismo.

A Cássia, Gabriela, Conceição, Marcelle, Patrícia, Wheverton, Roeckson e André companheiros de laboratório, pelo auxílio nos momentos de trabalho e aprendizado mútuo.

A todos do laboratório de Imunologia pela colaboração. Às professoras Mônica e Vláudia.

À Virgínia, sempre muito solícita e paciente contribuindo para realização deste trabalho.

Aos grandes amigos de sempre que participaram de todos os momentos, me apoiando e estimulando, mesmo de longe.

Aos amigos inesquecíveis que fiz durante a graduação, Mirela, Edvaldo, Raiana e Igor que de alguma maneira estão sempre presentes, me apoiando e incentivando.

Aos companheiros de turma do mestrado, especialmente Danielly, André e Lilian, pelos momentos de alegria e companheirismo que vivemos juntos nestes dois anos.

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

*“As oportunidades normalmente se
apresentam disfarçadas de trabalho árduo, e
é por isso que muitos não as reconhecem”.*

Ann Landers

RESUMO

Infecções maternas pelo *Schistosoma mansoni* modulam a imunidade dos descendentes adultos, sendo este fato relacionado com a transferência de antígenos parasitários ou anticorpos anti-parasita *in utero* ou através do leite materno. Observou-se que camundongos adultos, previamente amamentados em mães esquistossomóticas, apresentaram uma potencialização na produção de anticorpos anti-ovalbumina(OA), acompanhada de altos níveis de IL-2. Em contraste, a gestação levou a um potencial imunossupressivo no descendente, com produção de IL-10 e supressão na produção de anticorpos. Neste estudo, avaliamos a produção de IL-10 e IL-2 por linfócitos e macrófagos de camundongos nascidos e/ou amamentados em mães infectadas e linfócitos Treg(FoxP3+), quando imunizados com OA. Para isso, fêmeas *Swiss webster* não-infectadas (30 dias) ou infectadas (20 cercárias *S. mansoni*), no 60º dia, tiveram seus estros sincronizados e foram acasaladas. Após o nascimento, 4 grupos foram formados: MIAI: nascidos de Mães Infectadas/Amamentados em mães Infectadas imunizados com OA+adjuvante; MI: nascidos de Mães Infectadas imunizados com OA+adjuvante; AI - Amamentados em mães Infectadas imunizados com OA+adjuvante; CONTROLE – nascidos/amamentados em mães não-infectadas imunizados com OA+adjuvante; No 8º dia pós-imunização, esplenócitos foram cultivados, ou não, com OA (24hs) e marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos (anti-CD3, anti-CD4, anti-B220, anti-IL-10, anti-IL-2, anti-FoxP3, anti-CD14) e analisadas por FACS. Foi observado que os animais do grupo MI apresentaram alta frequência de células B220+/IL-10+ e menor de CD4+/IL-2+. No grupo AI foi baixa a frequência de células CD3+/IL-10, mas foi observada a presença de Treg (CD4+/FoxP3+). Sendo assim, tanto a gestação como a amamentação em mães infectadas favorece a ativação de células supressoras, no entanto o aleitamento materno melhora a resposta imune anti-OA.

Palavras-Chave: *Schistosoma mansoni*. Amamentação. Gestação. Imunomodulação. Camundongos. Ovalbumina.

ABSTRACT

Maternal infections by *Schistosoma mansoni* modulates the immunity of adults descendants, being this fact related with transfer of parasitic antigens or anti-parasitic antibodies *in útero* or through maternal milk. It have been seen that adults mice, previously breastfed in schistosomotic mothers, presented potentiation in the production of antibodies anti-ovalbumin(OA), accompanied by high level of IL-2. In contrast, gestation brought to a potential immunosuppressive descendant, with the production of IL-10 and supression on the production of antibodies. On this study, we evaluated production of IL-10 and IL-2 by lymphocytes and macrophages from mice born and breastfed by infected mothers and Treg (FoxP3+) lymphocytes, when immunized with OA. For that, females *Swiss webster* not infected (30 days) or infected (20 cercariae *S. mansoni*), on 60° day, had their estrous synchronized and were mated. After the born, 4 groups went formed BSIM+OA: born of infected mothers/breastfed in infected mothers and immunized with OVA+adjuvant; BIM+OA: born of infected mothers immunized with OVA+adjuvant; SIM+OVA: breastfed in infected mothers with OVA+ adjuvant; CONTROL: born/breastfed in not infected mothers immunized with OVA+adjuvant. On the 8th day after immunization, splenocytes were cultured with or without OVA, for 24h, and stained with fluorochrome-conjugated antibodies (anti-CD3, anti-CD4, anti-B220, anti-IL-10, anti-IL-2, anti-FoxP3, anti-CD14) and analized by FACS. BIM group showed high frequency of B220+/IL-10+ and less CD4+/IL-2+. In the SIM group CD3+/IL-10+ was low, but Treg was observed. BSIM mice had B220/IL-10 and Treg dromped. Both gestation and breastfeeding in infected mothers induced immunosuppressive cells, but the maternal milk improved the immunity anti-OA.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Breastfeeding. Gestation. Immunomodulation. Mice. Ovalbumin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Procedimentos experimentais.....	36
---	----

ARTIGO

Figura 1. Frequencia de células CD3+ /IL-10+, B220+/IL-10+ e CD14+/IL-10+ em animais imunizados	55
Figura 2. Frequencia de células CD4+ FoxP3+ e CD4+/IL-2+ animais imunizados.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
BCG	<i>Bacilo Calmette-Guérin</i>
Cepa SLM	Cepa São Lourenço da Mata
Com A	Concanavalina A
DCs	<i>Dendritic Cells</i> (Células dendríticas)
IFN-γ	Interferon γ
IgE	Imunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween 20
PGE2	Prostaglandina E2
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor das células T)
Th	Linfócitos T <i>helper</i> (XIIIuxiliaries)
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> tipo 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> tipo 2
Tregs	Linfócitos T regulatórios
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> tipo 17
TGB-β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
SEA	<i>“Soluble Egg Antigen”</i> (Antígeno Solúvel do Ovo)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Esquistossomose	18
2.2 A resposta imune adaptativa e a esquistossomose mansônica.....	20
2.3 Imunomodulação aos antígenos heterólogos na esquistossomose.....	24
2.4 Relação materno-fetal e a esquistossomose.....	25
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Desenho do estudo.....	32
4.2 Local do estudo.....	32
4.3 Animais.....	32
4.4 Operacionalização do estudo e grupos experimentais.....	33
4.5 Infecção e parasitológico.....	33
4.6 Sincronização do estro e acasalamento.....	35
4.7 Imunização com ovalbumina.....	34
4.8 Cultura de células esplênicas para os ensaios de citometria de fluxo.....	34
4.9 Ensaio e citometria de fluxo para imunofenotipagem.....	35
4.10 Procedimentos experimentais.....	36
4.11 Variáveis.....	37
4.11.1 Variável independentes.....	37
4.11.2 Variáveis dependentes.....	37
4.11 Análise estatística.....	37
5. CONCLUSÕES.....	38
REFERENCIAS.....	40
APÊNDICE.....	48
APÊNDICE 1 –ARTIGO - ESQUISTOSSOMOSE MATERNA EXPERIMENTAL: IL-2, IL-10 E LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS, EM RESPOSTA À OVALBUMINA, EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES ADULTOS.....	49
ANEXOS.....	60

ANEXO 1 - Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz Pernambuco (CEUA-FIOCRUZ)	61
ANEXO 2 - Normas para publicação na revista <i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>	63

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose, endêmica nas Américas, Ásia e África, é considerada um grave problema de saúde pública mundial (CHITSULO et al., 2000). Aproximadamente 230 milhões de pessoas estão infectadas por alguma das espécies de *Schistosoma* em 77 países por todo o mundo (WHO, 2012). No Brasil, onde esta parasitose é causada unicamente pela espécie *Schistosoma mansoni* (NEVES, 2007) a prevalência é de 25 milhões de pessoas vivendo em área endêmica e cerca de 4 a 6 milhões de indivíduos infectados (LAMBERTUCCI, 2010). Pernambuco está entre os estados que exibem uma das maiores prevalências da doença (BARBOSA, C. S.; SILVA; BARBOSA, F. S., 1996). Em regiões endêmicas, existe uma alta prevalência de mulheres grávidas ou em idade fértil infectadas por *Schistosoma*. Friedman et al (2007) descreveram que em média 10 milhões de gestantes e 40 milhões de mulheres em idade reprodutiva estão infectadas por alguma das espécies do gênero *Schistosoma*.

Infecções pelo *S. mansoni* podem modular a resposta imune do hospedeiro para antígenos homólogos, bem como para os heterólogos. Alguns autores destacam o papel da IL-10, na regulação negativa de ambos os perfis de resposta Th1 e Th2 do hospedeiro durante a infecção esquistossomótica. De fato, estudos sobre os mecanismos de modulação do granuloma, em modelos murinos, demonstraram que animais IL-10^{-/-} (geneticamente deficiente da produção de IL-10) desenvolvem um perfil misto Th1/Th2, havendo aumento de IFN- γ /IL-5, acompanhado de níveis maiores ou não alterados de IL-4 (WYNN et al., 1997).

Além disso, diferentes subtipos de células T regulatórias (Treg) vêm sendo encontrados na presença de antígenos de *S. mansoni*. Um perfil característico de células Th3, produtoras de IL-10/TGF- β (MCGUIRIK; MILLS, 2002), bem como Treg (CD25+/Foxp3+) dependentes de IL-2, foram encontradas em resposta a injeção de ovos de *S. mansoni* (SEWELL et al., 2003; TAYLOR et al., 2006).

Com relação às infecções maternas, tem sido demonstrado que os seus descendentes sofrem imunomodulação em infecções pós-natais (ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010). Diferentes estudos têm relacionado a transferência de antígenos parasitários ou anticorpos anti-parasita *in útero* ou através do leite materno (ATTALLAH et al., 2003; CALDAS et al., 2008) com as alterações na imunidade dos descendentes. Foi verificada uma hiporresponsividade aos antígenos dos ovos, observada pela diminuição do tamanho do granuloma (ATTALLAH et al., 2006; HANG et al., 1974; LENZI et al., 1987; OTHMAN et al., 2010).

Com relação às alterações da resposta imune direcionadas aos antígenos heterólogos, em descendentes de mães esquistossomóticas, poucos estudos foram realizados. Noureldin et al (1998), em um estudo com humanos, observaram uma correlação positiva entre os níveis de IgE contra antígeno de *S. mansoni* e as manifestações de alergia gastrointestinal em crianças amamentadas em mães esquistossomóticas. Malhotra et al (1999), verificaram que a infecção materna pelo *Schistosoma haematobium* sensibiliza os recém-nascidos, e que estas crianças respondem de forma menos intensa para o BCG (bacilo *Calmette-Guérin*), ou seja, a eficácia da vacina é menor.

Estudos recentes de Santos et al (2010; 2013) têm analisado a influência da gestação e da amamentação, separadamente, em mães infectadas pelo *S. mansoni* na resposta imune dos seus descendentes, frente à imunização com o antígeno heterólogo, ovalbumina (OA). Com relação ao efeito da amamentação, foi observado que camundongos adultos previamente amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram uma potencialização na produção de anticorpos anti-OVA, acompanhada de altos níveis de IL-2. Em contraste, a gestação levou a um potencial imunossupressivo no descendente, com produção de IL-10 e supressão na produção de anticorpos (SANTOS et al, 2010). No entanto, pouco é sabido sobre a produção destas citocinas por linfócitos e macrófagos em resposta a este antígeno heterólogo.

Assim, o presente trabalho se propôs a investigar a produção em linfócitos e macrófagos das citocinas IL-2 e IL-10, em resposta à imunização com ovalbumina, de camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas. Deste modo, pretende-se fornecer uma melhor compreensão dos efeitos do contato prévio com antígenos parasitários, durante a gestação ou amamentação em mães infectadas, diante de resposta a antígenos vacinais, virais e alergênicos, em indivíduos de áreas endêmicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esquistossomose

Doença negligenciada e subnotificada em todo o mundo, a esquistossomose está relacionada principalmente às precárias condições de vida e de saneamento básico. É considerada a terceira causa de mortalidade por doenças endêmicas rurais, estando em primeiro e segundo lugares, a doença de Chagas e Leishmaniose, respectivamente (BARBOSA et al., 2000). Esta helmintíase é endêmica em 77 países e territórios (WHO, 2012) e continua sendo considerada um grave problema de saúde pública mundial, afetando 207 milhões de pessoas nos países em desenvolvimento. Estima-se que em média 779 milhões de indivíduos, principalmente crianças, estejam sob risco de adquirir esta infecção (ENGELS et al., 2002; TALLIMA et al., 2009).

A esquistossomose é a segunda parasitose em importância de saúde pública mundial (CHITSULO et al., 2000). São conhecidas cinco espécies capazes de parasitar o ser humano, o *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma intercalatum* (GRYSEELS et al., 2006).

No Brasil, a única espécie presente é o *Schistosoma mansoni* (NEVES, 2005). A doença é encontrada em 18 estados brasileiros, sendo endêmica em uma vasta área territorial que vai desde o Maranhão até os estados do Espírito Santo e Minas Gerais. Focos isolados da doença ocorrem nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COURA; AMARAL, 2004). Pernambuco está entre os estados que exibem uma alta prevalência de pessoas infectadas, embora a utilização da quimioterapia e medidas preventivas tenha sido apontada como um dos fatores responsáveis pela redução das formas graves, além de prevenir novos casos da doença em algumas áreas (BARBOSA, C. S.; SILVA; BARBOSA, F. S., 1996; FAVRE et al, 2001). Mas, a cobertura do tratamento ainda não é completamente satisfatória em muitas regiões do estado. (FAVRE et al, 2009).

Helminto da classe trematoda, o *S. mansoni* é um verme dioico. Uma característica importante desta espécie é que eles possuem diversas formas evolutivas de acordo com diferentes fases do seu ciclo biológico, por exemplo, vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos (NEVES et al, 2007). Esta diversidade interfere diretamente na capacidade do hospedeiro de eliminar os vermes.

O *S. mansoni* possui ciclo biológico do tipo heteroxênico, onde o caramujo do gênero *Biomphalaria* é o hospedeiro intermediário e o homem o hospedeiro definitivo (BLANCHARD, 2004). No hospedeiro definitivo (homem) ocorre a reprodução sexuada do

parasito, onde os vermes adultos são encontrados no sistema porta hepático acasalados em cópula e alcançam as veias mesentéricas inferiores. Nestas, ocorre a oviposição pelas fêmeas, onde cada uma delas põe, em média, 400 ovos/dia. Cerca de 50% desses ovos chegam à luz do intestino, aproximadamente uma semana após a deposição, atingem o meio exterior através das fezes e tem uma expectativa de vida de até 5 dias. Outra parte desses ovos permanece no hospedeiro e são levados para órgãos como o fígado e intestino, onde geram a patologia característica da fase crônica da doença que é a formação do granuloma. Uma vez no meio externo, estes ovos participarão da segunda parte do ciclo. Em contato com a água e influenciados pela temperatura do ambiente, os ovos eclodem e liberam os miracídeos que são atraídos pelos caramujos (hospedeiros intermediários), por quimiotaxia, e assim podem infectá-los através da penetração no seu tegumento. Os únicos caramujos que albergam o *S. mansoni* são os do gênero *Biomphalaria*, cujas espécies predominantes no Brasil são: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (NEVES, 2007; TUAN, 2009). No caramujo, os miracídeos transformam-se em esporocistos que se reproduzem de forma assexuada e dão origem a várias larvas denominadas cercárias.

A depender da espécie do caramujo, os mesmos liberam na água, em média, 4.500 cercárias/dia, como no caso do *B. glabrata*. As cercárias liberadas nadam ativamente e possuem a capacidade de penetrar na pele e mucosas do homem, fixam-se através de ventosas e por ação lítica dos componentes das glândulas de adesão e penetração e do movimento da cauda, penetram o corpo cercariano no hospedeiro definitivo. Após essa penetração, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos (vermes imaturos), migram pelo tecido cutâneo, ganham o sistema sanguíneo ou linfático e chegam aos pulmões. Posteriormente, migram para o sistema porta hepático e dentro de 28 a 30 dias, após a penetração, tornam-se vermes adultos e copulam, liberando ovos (BLANCHARD, 2004; CALDAS et al., 2008; GRYSEELS et al., 2006; NEVES, 2007).

São observadas duas manifestações clínicas distintas no curso da doença, aguda e crônica, as quais cursam com sintomatologias diferentes. A forma aguda, raramente observada nos indivíduos de área endêmica, geralmente é assintomática. Alguns sintomas agudos, tais como febre e diarreia, são observados nos indivíduos de áreas não endêmicas e que não tiveram contato anterior com o parasita (CALDAS et al., 2008).

Em alguns pacientes, quer tenham sido previamente infectados ou não, a penetração das cercárias pode induzir uma dermatite, conhecida como dermatite cercariana, caracterizada por sensação de formigamento que resulta na formação de máculas (LAMBERTUCCI, 2010).

Esta dermatite é decorrente de uma reação de hipersensibilidade mediada por IgE (BURKE et al., 2009).

Algumas espécies podem produzir uma forma aguda de esquistossomose, conhecida como Síndrome de Katayama, que ocorre nos pacientes recém-infectados (2-6 semanas após a exposição). Consiste em uma reação febril à infecção, freqüentemente acompanhada por urticária e eosinofilia. É mais comum nas infestações por *S. japonicum*, mas também pode ocorrer na forma mansônica (BLANCHARD, 2004; BURKE et al., 2009; GAZZINELLI et al., 1985).

A fase crônica da doença é caracterizada pela formação de granulomas, principalmente no tecido hepático, devido à presença de ovos de *S. mansoni*, uma vez que o fluxo sanguíneo leva a maioria dos ovos para este sítio. Inicialmente há um recrutamento de macrófagos para o local de desenvolvimento do processo inflamatório, posteriormente, os linfócitos T CD4+ são atraídos e se acumulam neste sítio e, através da liberação de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), recrutam mais linfócitos e eosinófilos. Neste local, ocorre um acúmulo de células ao redor dos ovos, com predomínio de eosinófilos, macrófagos e linfócitos T, e o resultado é a formação do granuloma clássico da esquistossomose (PEARCE; MACDONALD, 2002).

O granuloma é o evento patogênico mais importante da fase crônica da doença (GRYSEELS et al., 2006) e a princípio tem o papel de conter a disseminação de antígenos dos ovos, porém, pode evoluir e induzir um estado de fibrose, devido a deposição de colágeno no local da inflamação (MACDONALD et al, 2010). A principal citocina envolvida no processo de formação da fibrose hepática é a IL-13 (CALDAS et al., 2008). A fibrose formada em decorrência da cronicidade da doença pode levar a uma oclusão progressiva dos ramos intra-hepáticos, com hipertensão portal, varizes gastroesofágicas, hiperesplenismo e episódios de hemorragia digestiva alta (GRYSEELS et al., 2006; HAGAN, NDHLOVU; DUNNE, 1998; PEARCE; MACDONALD, 2002). Estudos demonstram que animais que não desenvolvem os granulomas (tolerizados para antígenos do *Schistosoma*) desenvolvem graves danos hepatotóxicos, sugerindo que, paradoxalmente, o granuloma pode ser um tipo essencial de proteção para o hospedeiro (PEARCE; MACDONALD, 2002). No entanto apenas 10% dos indivíduos infectados evoluem para a fase crônica da doença, com sintomatologia grave. (BLANCHARD, 2004; CALDAS et al, 2008)

2.2 A resposta imune adaptativa e a esquistossomose mansônica

Os linfócitos, T e B, são as principais células envolvidas na resposta imune adaptativa. Os linfócitos B são os mediadores da resposta imune humoral, promovendo a produção e secreção de anticorpos. Já os linfócitos T são os reguladores centrais da imunidade celular e são divididos em dois tipos, linfócitos T auxiliares (Th) ou CD4+, classicamente subdivididos em Th1 e Th2, e linfócitos T citotóxicos ou CD8+ (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MOSMANN et al., 1989; ROCHA; TANCHOT, 2004; STOCKINGER;BOURGEOIS; KASSIOTIS, 2004). Existem outros tipos de célula TCD4+ descritos, e que tem sido alvo de muitos estudos, as células T regulatórias (Tregs), e as células Th17(WAKKACH et al., 2003; REINER, 2007; MACLEOD et al., 2009; SOUZA et al, 2012). Tem sido descritas também as células Th9 e Th22, produtoras de IL-9, IL-10 e IL-21(Th9) e IL-22 e IFN- γ (Th22), que desempenham papel crucial em doenças autoimunes e resposta inflamatória, além da atuação na rejeição a enxertos, assim como Th17, como revisado por Liu et al (2013).

A infecção por helmintos é descrita como o maior exemplo de ativação da resposta imune Th2, tanto em modelos experimentais como em seres humanos (MAIZELS; YAZDANBAKHSH, 2003). Esta mediação é feita pela secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e pela produção de anticorpos IgE em humanos e IgG1 em camundongos, que ativam eosinófilos e mastócitos. Este perfil também pode ser observado nos processos alérgicos (ABBAS; LICHTMAN, 2005; LEDERER et al., 1996; STOCKINGER et al., 2004).

Durante a fase crônica da esquistossomose, este fenômeno de imunomodulação ocorre em resposta aos antígenos dos ovos com predomínio de resposta imune Th2 (produção de IL-4, IL-13, IL-10, infiltrado de eosinófilos) (ZACCONE et al., 2010) que regula negativamente a expressão da resposta Th1 inicial (IFN- γ , TNF- α , ativação de macrófagos) (BURKE et al., 2009; PEARCE et al., 1991; WILSON et al., 2007). Além do perfil Th2, que atua através da secreção de IL-10, o controle da resposta granulomatosa ao redor dos ovos, levando à proteção e a fase crônica da infecção, foi também associada a mecanismos dependentes de células T regulatórias (Treg) (McKEE;PEARCE, 2004; TAYLOR et al., 2006).

As células T regulatórias têm sido identificadas como células secretoras de IL-10 e TGF- β (ARAÚJO et al., 2008). Estas células estão envolvidas na imunossupressão durante a esquistossomose e têm sido relacionadas com o controle da patogenia da doença (BURKE et al., 2009; WAKKACH et al., 2003).

Alguns autores destacam o papel da IL-10, na regulação de ambos os perfis de resposta Th1 e Th2. De fato, estudos sobre os mecanismos de modulação do granuloma, em modelos murinos, demonstraram que animais IL-10^{-/-} (geneticamente deficiente da produção de IL-10)

desenvolvem um perfil misto Th1/Th2, havendo aumento de IFN- γ /IL-5, acompanhado de níveis maiores ou não alterados de IL-4 (WYNN et al., 1997).

Neste contexto, estudos de Hoffmann et al. (2000), também utilizando animais IL-10^{-/-}, verificaram que essa citocina é essencial para prevenir o excesso da polarização da resposta Th1 e Th2 durante a infecção. Em seres humanos, outros autores também associam a participação da IL-10 e a diminuição da resposta de citocinas Th1 (MONTENEGRO et al., 1999). A ação supressora da IL-10 se deve, principalmente, à sua capacidade de inibir a ativação de macrófagos, diminuir a expressão de moléculas co-estimulatórias e do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) nas células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells* – APC's) (MOORE et al., 2001; STADECKER; FLORES VILLANUEVA, 1994;).

Os antígenos solúveis nos ovos (SEA) do *Schistosoma* são compostos por centenas de proteínas e glicoconjugados, aproximadamente 30 elementos, que variam em seu peso molecular (10 a 200 kDa) e incluem aqueles que são secretados ativamente pelos ovos ou os produtos de sua desintegração (STEINFELDER et al., 2009).

Okano et al. (1999) demonstraram que o SEA favorece a elevada produção de IgE total e específica, além de citocinas Th2. Esta propriedade foi associada à presença dos açúcares (glicanos), uma vez que sua ausência prejudicou a resposta imune Th2, mas não alterou a resposta Th1. Entretanto, uma das proteínas mais abundantes do SEA, o polipeptídeo 40kDa (Sm-p40), que representa aproximadamente 10% da constituição deste antígeno, está presente nos granulomas e tem sido associado a uma resposta Th1.

Appelmelk et al. (2003), observaram que glicanos, contendo fucose ou manose, que estão presentes nos antígenos de *S. mansoni* se ligam a receptores de lectina tipo C (DC-SIGN-CD209), em células dendríticas (Dendritic Cells – DC's). Estes autores sugeriram que a polarização da resposta para o perfil Th2 induzida pelo *S. mansoni*, pode ser decorrente desta ligação. Straw et al. (2003) observam o aumento de MHC-II, CD80 e CD40 em células dendríticas de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e estimuladas com SEA, bem como a indução do perfil Th2.

Estudos mais recentes relataram a presença de glicoproteínas secretórias denominadas alfa-1, peroxirredoxin e ômega-1. A primeira induz a liberação de IL-4 através de sua ligação à imunoglobulina E na superfície de basófilos e o desenvolvimento de macrófagos alternativamente ativados. O ômega-1 é uma ribonuclease excretada/secretada abundantemente pelos ovos vivos, a qual tem sido associada com indução direta de uma resposta Th2. Já o peroxirredoxin é um antioxidante produzido em altos níveis em resposta à

produção, pelos fagócitos, de espécies reativas de oxigênio, devido à infecção pelo helminto (HEWITSON et al., 2009). Steinfelder et al. (2009) demonstraram que essa proteína modifica a morfologia das células dendríticas e sua interação com os linfócitos T CD4+, envolvidas com a polarização da resposta Th2.

Além da resposta Th2, característica na fase crônica da esquistossomose, os antígenos dos ovos vem sendo descritos como indutores de linfócitos T regulatórios. Foi demonstrado que células T regulatórias CD4+CD25+, chamadas de Tregs naturais (CD4+CD25+FoxP3+), eram necessárias para manutenção da resposta Th2 e, portanto essenciais no processo de imunomodulação presente na esquistossomose (McKEE; PEARCE, 2004). Interessantemente, apesar da capacidade das células Tregs de produzir IL-10 após injeção dos ovos, a participação desta citocina neste processo não foi evidenciada, sugerindo outros mecanismos para o controle da resposta Th2 e Th1 pelas células Tregs (TAYLOR et al., 2006). Estudos demonstram, por exemplo, a necessidade de contato célula-célula, entre Treg e T convencional para que haja inibição das células T convencionais pelas células T regulatórias (COLLISSON et al, 2009).

Células Treg podem ser encontradas no tecido hepático de animais infectados, principalmente ao redor dos granulomas (LAYLAND et al, 2010). El-ahwany et al (2012), em um estudo com animais, demonstraram um aumento significativo no percentual destas células no tecido hepático de animais infectados, que foram imunizados com SEA 7 dias antes da infecção, em comparação com os animais infectados não imunizados. El-ahwany et al (2012) constatarem também que a quantidade destas células nesta região aumenta à medida que a doença evolui.

Taylor et al (2006), também em estudo experimental, demonstrou que o antígeno de ovo (SEA) de *Schistosoma* é capaz de estimular tanto células Treg como T convencionais. Verificaram também que 14% das células Treg de animais imunizados com SEA produzem IL-10, sob estímulo antígeno específico, enquanto que apenas 1,7% das células dos animais não imunizados produzem esta citocina sob o mesmo estímulo. Da mesma forma, observou-se uma maior ativação de células CD4+CD25+FoxP3+ em resposta à ovalbumina, em animais alérgicos quando imunizados com SEA (PACÍFICO et al, 2009).

Com relação aos linfócitos B, foi relatado que os oligossacarídeos na superfície dos ovos do *Schistosoma*, com ênfase para o Lacto-N-Fucopentose III (LNFPIII), ativam diretamente células B, induzindo proliferação e a síntese de IL-10 e Prostaglandina e2 (PGE2) (THOMAS; HARN, 2004). Contudo, Mangan et al (2004) relataram que os antígenos dos vermes do *S. mansoni* estão relacionados com a geração de linfócitos B regulatórios, CD5+/CD1d+. Do

mesmo modo, a IL-10 produzida por células B durante a esquistossomose favorece a diminuição da eosinofilia e da resposta Th2 ova-específica em camundongos com asma induzida por OVA. (VAN DER VLUGT et al, 2012).

2.3. Imunomodulação a antígenos heterólogos na esquistossomose

Do ponto de vista imunológico, outro aspecto importante da infecção pelo *S. mansoni* é o fenômeno imunomodulatório da resposta imune a antígenos não-relacionados ao parasito. Estudos anteriores demonstram que o perfil Th2 no período da deposição dos ovos (PEARCE et al., 1991), modifica a resposta imune à mioglobina, com supressão da resposta Th1 e aumento da produção de IL-4 (KULLBERG et al., 1992). Foi constatada também a supressão de linfócitos Th1 e citotóxicos para antígenos virais em camundongos esquistossomóticos (ACTOR et al., 1993, 1994).

A presença de ovos do *S. mansoni* foi capaz de prevenir a resposta inflamatória auto-imune experimental. Sewell et al. (2003), relataram uma redução na progressão da resposta imune específica para proteína básica da mielina e, conseqüente melhora da encefalomielite autoimune experimental. Este fenômeno foi associado com uma redução nos níveis do IFN- γ e produção de IL-4. Neste mesmo ano, Zaccone et al. (2003) observaram a prevenção do diabetes tipo 1, devido ao prévio contato com SEA.

Foi demonstrada a diminuição da gravidade do quadro alérgico em pacientes esquistossomóticos (MEDEIROS et al., 2003), bem como, uma produção menor de IL-5, IL-4 e maior de IL-10 em resposta a *Dermatophagoides pteronyssinus*, quando comparada com a produção destas citocinas em pacientes asmáticos e não-parasitados (ARAÚJO et al., 2006). Experimentalmente, camundongos parasitados ou tratados com antígenos dos ovos do *S. mansoni* adquiriram uma maior resistência ao desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar anti-ovalbumina, sendo evidenciado menores níveis de citocinas Th2, eosinófilos, anticorpos IgE anti-OVA e maior indução de células T regulatórias CD4+CD25+ (SMITS et al., 2007; PACÍFICO et al., 2009).

De modo interessante, Amu et al. (2010) relataram que células B regulatórias (CD5+/CD1d+/IL-10+), em camundongos adultos infectados pelo *S. mansoni*, foram relacionadas com o recrutamento de células Tregs para o pulmão e conseqüente supressão de resposta alérgica anti-ovalbumina (OVA).

A influência da esquistossomose na resposta imune vacinal foi também relatada. Sabin et al. (1996) verificaram, em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, uma menor produção de

IFN- γ em resposta ao toxóide tetânico, após a vacinação com este antígeno, em relação aos indivíduos não infectados sob mesmo esquema de vacinação. Elias et al. (2005), mostraram que a infecção pelo *S. mansoni*, em camundongos, reduziu o efeito protetor da vacina BCG contra a *Mycobacterium tuberculosis*. Estes animais apresentaram número maior de unidades formadoras de colônias de bacilos da tuberculose, redução da capacidade pulmonar, menor produção de IFN- γ e óxido nítrico e polarização para um perfil Th2 (produção de IL-4 e IL-5).

2.4 A relação materno-fetal e a esquistossomose

As condições imunológicas da gestação e do aleitamento materno são necessárias para manutenção do feto e geração de proteção ao recém-nascido, respectivamente. Contudo, a exposição materna aos alérgenos, citocinas ou os processos infecciosos, podem alterar o grau de competência imune dos seus descendentes (FUSARO et al., 2007; HERZ et al., 2000; LIMA et al., 2005).

Tem sido relatada a alta prevalência de mulheres grávidas (~10 milhões) ou em idade fértil (~40 milhões) infectadas em áreas endêmicas para esquistossomose (FRIEDMAN et al., 2007) e a consequência da infecção materna na imunidade dos descendentes vem sendo investigada.

A passagem transplacentária e pelo leite materno de antígenos do *S. mansoni* e anticorpos anti-parasita foi descrita tanto em humanos (SANTORO et al., 1977), como em camundongos (HASSAN et al., 1997). Attalah et al. (2003) corroboraram estes achados ao detectarem o antígeno 63-kD (identificado em diferentes fases do ciclo do *S. mansoni*) no leite, soro e cordão umbilical de mães infectadas esquistossomóticas. Já Lenzi et al. (1987), estudando camundongos recém-nascidos e ao mesmo tempo lactentes de mães infectadas pelo *S. mansoni*, observaram a transferência de anticorpos contra antígenos de cercárias, de ovos e de vermes adultos, através da avaliação do soro dos descendentes.

Estudos experimentais relacionaram a exposição tanto de antígenos do parasita (HANG et al., 1974) como de anticorpos anti-*Schistosoma* (ATTALLAH et al., 2006; COLLEY et al., 1999; LENZI et al., 1987) durante o período da gestação e da amamentação, com alterações na resposta imune do descendente frente à infecções pós-natais. Os descendentes eram tolerantes aos antígenos do parasita, apresentando uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni*. Recentemente, Othman et al. (2010) estudando a progressão da esquistossomose mansônica em camundongos provenientes ou não de mães infectadas, observaram que a intensidade da infecção (número de granulomas

e fibrose hepática) foi menor em descendentes de mães esquistossomóticas, com maior expressão do gene da IL-12 e do TGF- β , citocinas reguladoras para o perfil Th2, nos animais nascidos e amamentados em mães infectadas.

Embora a gestação e a amamentação em mães esquistossomóticas tenham capacidade de alterar a resposta imune, ainda no início da vida dos seus descendentes, poucos são os estudos sobre esse efeito, para os antígenos heterólogos durante vida adulta.

Malhotra et al (1999) realizaram um estudo com humanos infectados pelo *Schistosoma haematobium* e demonstraram que a infecção materna por este trematódeo, durante a gravidez, sensibiliza aproximadamente 50% dos recém-nascidos *in útero*, e que esta imunidade pré-natal persiste na criança diminuindo a eficácia da vacinação ao BCG (Bacilo *Calmette-Guérin*). Eles observaram que as células T das crianças nascidas de mães não-infectadas durante a gestação produzem muito mais IFN- γ em resposta a proteínas purificadas da micobactéria do que as crianças nascidas de mães infectadas.

Enquanto que, Noureldin et al (1998), em um outro estudo com humanos, observaram uma potencialização da resposta imune humoral nas crianças que tiveram contato com o leite de mães esquistossomóticas. Estes pacientes apresentavam uma correlação positiva entre os níveis de IgE contra antígeno de *S. mansoni* e as manifestações de alergia gastrointestinais.

Em um modelo experimental, temos avaliado, separadamente, a influência da gestação e da amamentação em mães esquistossomóticas na resposta imune dos descendentes na vida adulta, a um antígeno não-relacionado. Em um modelo de imunização subcutânea de ovalbumina em adjuvante, camundongos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* apresentaram uma supressão na resposta imune humoral anti-OVA e alta produção de IL-10. O tratamento com anticorpos anti-IL-10 reverteu a imunossupressão humoral nestes descendentes (SANTOS et al, 2010).

Do contrário, camundongos previamente amamentados em mães infectadas tiveram uma potencialização da imunidade humoral anti-OVA e uma maior produção de IL-2 (SANTOS et al., 2010). De modo interessante, foi observado que quando os camundongos nascidos de mães infectadas são também amamentados em mães infectadas ocorre uma reversão da supressão de anticorpos anti-OVA, acompanhada do aumento da produção de IL-2 e diminuição de IL-10 (SANTOS et al., 2010). Estes últimos resultados corroboram o efeito estimulador da imunidade pela amamentação em mães esquistossomóticas.

De fato, durante a gestação, na interface útero e placenta, um ambiente potencialmente imunossupressor é encontrado (macrófagos inibitórios, células dendríticas imaturas inibitórias e células T regulatórias) (BLOIS et al., 2004; HEIKKINEN et al., 2004; LAGADARI et al.,

2004), o qual pode ser mantido no recém-nascido (TASKER et al., 1997; TAYLOR; BRYSON, 1985). A propriedade intrínseca do antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni* em estimular a produção de IL-10 pelas APCs já foi demonstrado (THOMAS; HARN, 2004). Assim, o antígeno do parasita nas células da interface útero-placentária podem acentuar a capacidade das APCs uterinas para a produção de IL-10. Deste modo, é possível que a gestação em mães esquistossomóticas confira às APCs do descendente um potencial imunossupressivo.

Por outro lado, é sabido que o leite materno tem função nutritiva e, ao mesmo tempo, contém substâncias antimicrobianas e fatores imunomodulatórios como células, citocinas, oligossacarídeos e anticorpos (BLEWETT et al., 2008). Dentre os fatores solúveis, as citocinas IL-10 e TGF- β estão envolvidas com a diferenciação e maturação de células produtoras de anticorpos e maturação de células intestinais. Estas citocinas são também conhecidas por suas funções imunossupressoras e tolerogênicas (BLEWETT et al., 2008). Além disso, anticorpos IgG maternos, transferidos ao recém-nascido através do leite, são importantes para desenvolvimento da linhagem de células B no neonato (MALANCHÈRE et al., 1997). Mães esquistossomóticas transferem aos seus descendentes anticorpos parasito-específicos (LENZI et al., 1987). Colley et al. (1999) demonstraram que a administração de anticorpos anti-SEA, logo após o nascimento, diminuiu a intensidade da reação granulomatosa Th2 em infecções pós-natais dos descendentes, levando a um perfil Th1.

É importante ressaltar que o LNFP-III, oligossacarídeos na superfície dos ovos do *Schistosoma* que atua sobre linfócitos B, induzindo proliferação e a síntese de IL-10 e PGe2, é também um componente do leite materno (THOMAS; HARN, 2004). Contudo, a participação dos antígenos dos vermes na geração de linfócitos B regulatórios CD5+/CD1d+, produtores de IL-10, foi demonstrada por Mangan et al. (2004) em modelo de infecções unissexuais.

Ensaio *in vitro* de indução de células Treg (CD25+/FoxP3+) a partir de células T “naive” (CD25-/FoxP3-) têm demonstrado que linfócitos B, produtores de IL-2 podem induzir e expandir o clone de células Treg com maior capacidade que células dendríticas imaturas (ZHENG et al., 2010). De modo interessante, os linfócitos B que guardavam esta propriedade foram estimulados via interação CD40:CD40L *in vitro* e apresentaram um aumento de CD80 e MHC-II em sua membrana em comparação com as células dendríticas (ZHENG et al., 2010). Recentemente, foi observada uma maior frequência de linfócitos B expressando CD80 e CD40 em descendentes, apenas amamentados em mães esquistossomóticas, quando imunizados com OVA em adjuvante (Santos et al., 2013, *in press*). Em conjunto, estas

informações apontam a possibilidade de células Treg, geradas por linfócitos B (produtoras de IL-2 ou IL-10), em consequência da infecção esquistossomótica materna.

Embora a gestação, bem como a amamentação, em mães esquistossomóticas tenha o potencial de alterar a resposta imune dos seus descendentes, com alta produção de IL-10 e IL-2, respectivamente, pouco é sabido sobre a produção destas citocinas por linfócitos e macrófagos em resposta a um antígeno heterólogo, ovalbumina, na vida adulta. Devido à alta prevalência de esquistossomose na nossa região, o contato prévio com antígenos parasitários, durante a gestação ou amamentação em mães infectadas, pode ser relevante diante de resposta a antígenos vacinais, virais e alergênicos em indivíduos de áreas endêmicas para *S. mansoni*.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Comparar em células esplênicas de camundongos nascidos e/ou amamentados em mães infectadas, submetidos à imunização com ovalbumina, a frequência de linfócitos T, T regulatórios, linfócitos B e macrófagos produtores de IL-2 e IL-10, além de avaliar a expressão de linfócitos (CD3+), frente à estimulo ova-específico.

3.2 Objetivos específicos:

Comparar nas células esplênicas de camundongos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas e de camundongos nascidos e amamentados em mães não infectadas, submetidos à imunização com ovalbumina:

3.2.1 A frequência de linfócitos T e B produtores de IL-10 em resposta ao antígeno heterólogo ovalbumina.

3.2.2 A frequência de macrófagos produtores de IL-10 em resposta à ovalbumina.

3.2.3 A frequência de linfócitos T regulatórios em resposta à ovalbumina.

3.2.4 A frequência de linfócitos T produtores de IL-2 em resposta à ovalbumina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo experimental, em que um grupo de camundongos fêmeas sofreu a intervenção (infecção com *S. mansoni*) e o outro grupo serviu para termos de comparação dos resultados. Como vantagens do estudo, além das condições controladas de observação, têm a facilidade de o modelo experimental mimetizar a esquistossomose humana e as dificuldades de realização por questões éticas são menores. Entretanto, não é possível afirmar que os resultados obtidos são reprodutíveis em seres humanos.

Os animais do estudo foram escolhidos de forma não aleatória, uma vez que a randomização não foi necessária já que as características dos mesmos são semelhantes, por apresentarem o mesmo tempo de vida, fazerem parte da mesma linhagem e serem criados nas mesmas condições alimentares. Devido ao processo utilizado, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção.

4.2 Local do estudo

As etapas do estudo relacionadas à infecção, acasalamento e manutenção das mães infectadas foram realizadas no Biotério de experimentação animal do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Posteriormente, todos os procedimentos laboratoriais (cultura das células esplênicas) foram realizados nas dependências do Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). As análises por citometria de fluxo foram realizadas no Núcleo de Integração Tecnológica (NIT) do CPqAM/FIOCRUZ.

4.3 Animais

Foram utilizados 20 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com 4 semanas de idade para infecção com *S. mansoni* e 20 animais não-infectados foram utilizadas como controle. Vinte camundongos machos da mesma espécie foram utilizados para o acasalamento. Os animais foram fornecidos e mantidos em condições ideais no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Os protocolos experimentais

foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz Pernambuco (CEUA-FIOCRUZ), sob o protocolo de número 25/2011 (Anexo 1).

4.4 Operacionalização e grupos de estudo

Foram utilizados 40 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* com 4 semanas de idade. Destas, 20 fêmeas foram infectadas e transcorridos 45 dias realizou-se a confirmação da infecção. No 60º dia de infecção, ocorreu sincronização do estro e acasalamento. Paralelamente, para formação do grupo controle, outras 20 fêmeas não-infectadas também tiveram seu estro sincronizado e acasalaram.

Para formação dos grupos de estudo, parte dos filhotes de mães infectadas foi amamentada em mães não-infectadas e a outra parte permaneceu amamentando em suas próprias mães. Assim como, parte dos filhotes de mães não infectadas foi amamentada em mães infectadas e a outra parte permaneceu amamentando em suas próprias mães. Após 45 dias, os filhotes machos foram selecionados e imunizados com Ovalbumina em adjuvante completo de Freund (CFA) de acordo com os seguintes grupos: **Grupo 1 (MIAI)** - dez animais machos nascidos de Mães Infectadas e Amamentados em mães Infectadas e imunizados com OVA+adjuvante; **Grupo 2 (MI)** - dez animais machos nascidos de Mães Infectadas (MI) e imunizados com OVA+adjuvante; **Grupo 3 (AI)**- dez animais machos apenas Amamentados em mães Infectadas (AI) e imunizados com OVA+adjuvante. Como grupo controle, utilizaremos filhotes nascidos e amamentados em fêmeas não-infectadas, resultando na formação dos seguintes grupos: **Grupo 4 (Controle)** - dez animais machos nascidos e amamentados em mães não-infectadas (Controle) e imunizados com OVA+adjuvante (Quadro 1).

4.5 Infecção e Parasitológico de fezes

A infecção foi realizada por via percutânea, com 20 cercárias de *S. mansoni* recentemente emitidas e obtidas de exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e infectados por miracídios da cepa SLM (São Lorenzo da Mata). Após 45 dias de infecção, os camundongos fêmeas foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram então confeccionadas 3 lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de

Kato-Katz (KATZ et al., 1972) para determinação da infecção e quantificação do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

4.6 Sincronização do estro e acasalamento

Sessenta dias após a infecção, as fêmeas tiveram seus estros sincronizados (FOWLER; EDWARDS, 1957; WANG et al., 2001) com a administração de hormônios. No primeiro dia foi administrado 5 UI (100µL) de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e no terceiro dia 5 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). Posteriormente, as fêmeas foram acasaladas (duas fêmeas para um macho), onde foi observada a formação do “plug” vaginal para confirmação do acasalamento. O mesmo procedimento foi realizado com as fêmeas não-infectadas.

4.7 Imunização com ovalbumina

Os filhotes adultos distribuídos de acordo com os diferentes grupos de estudo, foram imunizados com ovalbumina em Adjuvante Completo de Freund (ACF) no 45º dia de nascimento. Para a imunização foi injetado na base da cauda (via sub-cutânea) 100µg/camundongo de Ovalbumina (OA) 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), emulsificada na proporção 1:1 (vol/vol) em ACF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) em um volume total de 0,1mL.

4.8 Cultura de células esplênicas para os ensaios de citometria de fluxo.

Foram obtidos os baços dos camundongos dos diferentes grupos de estudo, 8 dias após imunização com ovalbumina. As suspensões de células esplênicas foram então obtidas assepticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640 suplementado. Após centrifugação (1.500rpm por 10min. / 4°C), as hemácias provenientes do órgão foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 20 segundos. As células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA), mantidas no gelo por 5 min para deposição do estroma e, após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo a contagem das células e o teste

de viabilidade realizados com o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10% (90µl de Azul de Trypan a 10% + 10µl de suspensão de células)

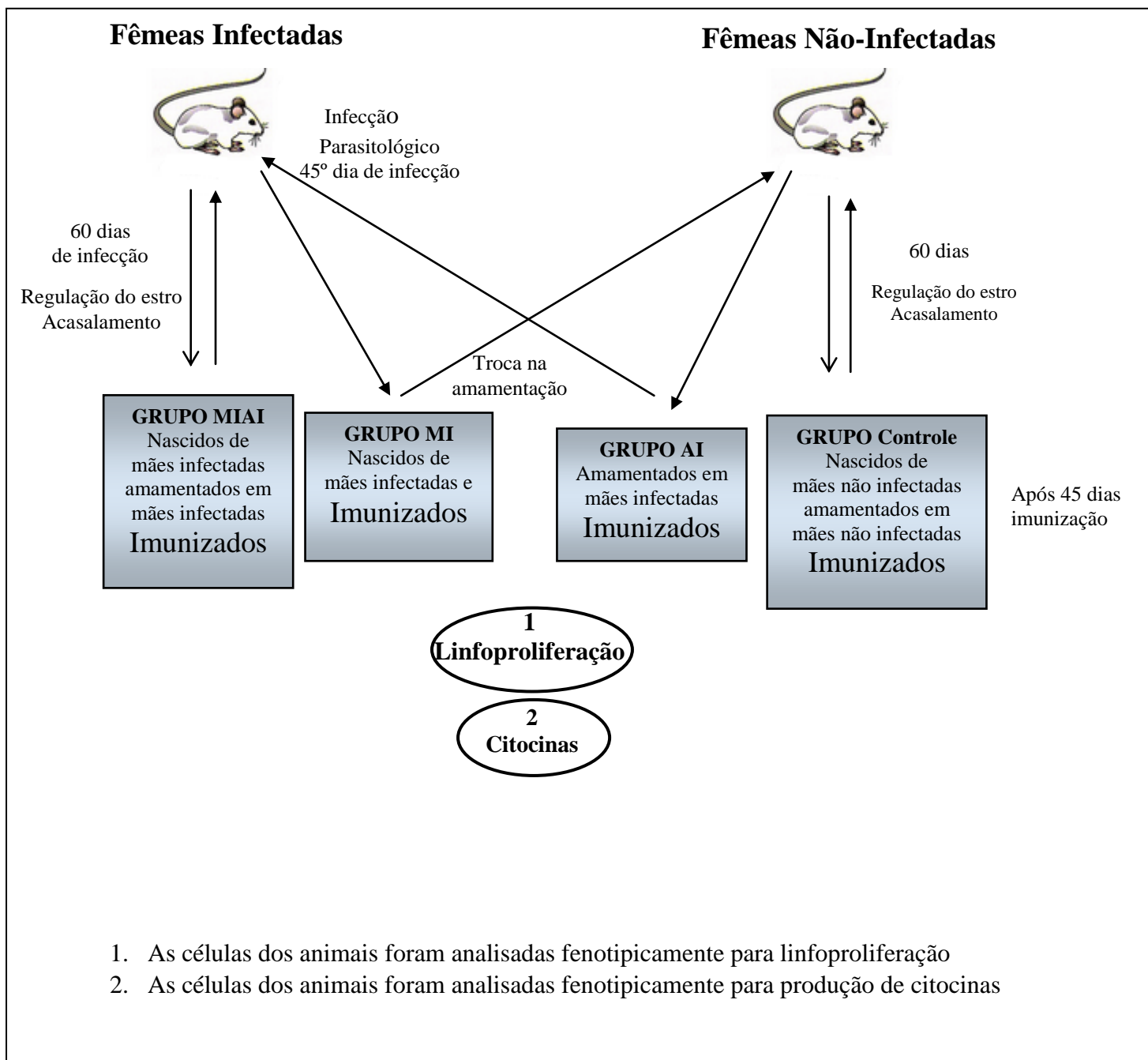
As células foram cultivadas (5×10^6 células/poço), em tubos de cultura de 8mL e submetidas a estímulo antigênico com ovalbumina (500 µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C em estufa de CO₂ humidificada, no intervalo de 24h.

4.9 Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem

Após 24 horas de cultivo foi adicionado a cada tubo contendo as suspensões de células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos, 5µl de Golgi Stop (para cada 5×10^6 células), agitados em vórtex e devolvidas a estufa de CO₂ a 37°C por um intervalo de 4 horas. Passado este período de incubação, as células foram lavadas com 6ml de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado, em seguida foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos sob a temperatura de 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em PBS 0,01M + 5% de SBF estéril, no mesmo volume da cultura inicial e distribuídas nos tubos de citometria, sendo 100µl por tubo com concentração final de 1×10^6 células por tubo. Procedeu-se então à marcação células com os anticorpos de superfície (anti-CD4, anti-CD3, anti-B220 e anti-CD14), sendo acrescentado ao tubo 0,5µl de cada anticorpo em ambiente escuro, seguido de agitação em vórtex e incubação por 30 minutos à 4°C no escuro. Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas uma vez com 1ml de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado com agitação em vórtex e posterior centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Depois o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 200µl de tampão de fixação e as células foram incubadas por 15 minutos a 4°C no escuro. Após este tempo, procedeu-se nova lavagem com 1ml de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se aos tubos 500µl da solução de permeabilização, diluída 4x e incubados por 30 minutos a 4°C no escuro. Posteriormente as células foram lavadas com 1ml de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se a cada tubo 1µl dos anticorpos para marcação intracelular (anti-IL-2 e anti-IL-10) e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente em ambiente escuro. Procedeu-se nova lavagem com 1ml por tubo da solução de permeabilização diluída 10x em água destilada estéril, seguida de agitação no vórtex e centrifugação em 1500 rpm por 5 minutos a 4°C. Depois o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se a cada tubo 300µl da solução de fixação para posterior leitura em citômetro de fluxo. Os eventos (10.000 para linfócitos e 1000 para macrófagos) foram adquiridos e analisados com o programa

CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos pela média dos percentuais de células duplo-marcadas obtidos no “pool” dos baços de todos os animais em cada grupo \pm desvio padrão.

4.10 Procedimentos experimentais



Quadro 1. Infecção, parasitológico, regulação do estro, acasalamento e formação dos grupos de estudo.

4.11 Variáveis

4.11.1 Variável independente

Foi considerada variável independente a infecção pelo *S. mansoni*. Foram infectadas fêmeas *Swiss Webster* para a obtenção de descendentes nascidos ou amamentados em mães infectadas. Esta variável é considerada dicotômica (sim/não).

4.11.2 Variáveis dependentes

Nos diferentes grupos de estudos foram consideradas variáveis dependentes as frequências de linfócitos T produtores de IL-2 e IL-10, linfócitos B e macrófagos produtores de IL-10, bem com de linfócitos T Regulatórios, em resposta à imunização com ovalbumina.

4.12 Análise estatística

Os resultados das contagens das células por citometria de fluxo foram analisados através da comparação entre os diferentes grupos utilizando-se uma análise de variância para dados paramétricos (ANOVA), seguida pela comparação múltipla segundo o método de Mann–Whitney. O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e foram considerados significativos valores de $p < 0.05$. Todas as etapas foram realizadas em triplicata, para confirmação dos resultados.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1. A gestação em mães infectadas com *S. mansoni* favorece uma maior frequência de células CD14+/IL-10+, B220+/IL-10+ e CD3+/IL-10+, em resposta a OA.
2. O fato de ser apenas amamentado em mães esquistossomóticas predispõe a uma frequência aumentada de células Treg(CD4+/FoxP3+) em resposta OA, após imunização com OA.
3. A produção de IL-2 em resposta à OA não foi prejudicada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. Mecanismos Efetores da Imunidade Mediada por Células. Elsevier, Rio de Janeiro:5ª ed, p. 307-326. 2005.
- ACTOR, J.K. et al. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 90, n. 3 p. 948-52. 1993.
- ACTOR, J.K.et al. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. **Eur. J. Immunol.**,v. 24, n. 12, p. 3050-3056, 1994.
- AMU, S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **J Allergy Clin Immunol**. v. 125, p. 1114-24. 2010.
- APPELMELK, B. J.; VAN DIE, I.; VAN VLIET, S.J.; et al. Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. **J. Immunol**. v. 170, n. 4, p.1635-1639. 2003.
- ATTALLAH, A.M. et al. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, New Damietta City, v. 68, n.6, p. 647-651. 2003.
- ATTALLAH, A.M. et al. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. **Parasitol. Res**, New Damietta City, v. 99, n. 2, p.137-145. 2006.
- ARAÚJO, M. I. et al. Sistema de regulação da resposta imune alérgica. **Gaz. Méd. da Bahia**,Salvador, v. 78, p. 18-25, 2008.
- BARBOSA, C.S.; SILVA, C.B.; BARBOSA, F.S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 609-616. 1996.
- BARBOSA, C.S. et al. Urban schistosomiasis in Itamaracá, Pernambuco, Brazil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 93, p.265-266. 2000.
- BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Trav. Med. and Infect. Disease**, v. 2, p. 05-11. 2004.
- BLEWETT, H.J.H. et al. In:_____The immunological components of human milk. **Adv. Food Nutr. Res**. v. 54, p. 45-80. 2008.
- BLOIS, S.M.et al.Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 70, n. 4, p.1018-1023, 2004.

- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Paras.Immunol.**, v.31, p. 163–176, 2009.
- CALDAS, I.R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune response during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop.**, v. 108, p. 109-117. 2008.
- CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v. 77, n.1, p. 41-51. 2000.
- COLLEY, D.G. et al. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. **Microbes Infect.** v. 1, n. 7, p. 517-524. 1999.
- COLLISON, L. W. et al. Regulatory T Cell Suppression Is Potentiated by Target T Cells in a Cell Contact, IL-35- and IL-10-Dependent Manner. **J Immunol.** v. 182, p. 6121-6128. 2009.
- COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v. 99, n.5, p. 9-13. 2004.
- EL-AHWANY, E. et al. T Regulatory Cell Responses to Immunization with a Soluble Egg Antigen in *Schistosoma mansoni*-Infected Mice. **Korean J Parasitol.** v. 50, n.1, p 29-35. 2012.
- ELIAS, D.; AKUFFO, H. et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine.** v. 23, n. 11, p.1326–1334, 2005.
- ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Tropica**, v. 82, p. 139–146. 2002.
- FAVRE T.C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 34, p.569-576. 2001.
- FOWLER, R.E.; EDWARDS, R.G. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. **J. Endocrinol.** v. 15, n. 4, p. 374-384. 1957.
- FRIEDMAN, J.F. et al. Schistosomiasis and pregnancy. **Trends Parasitol**, v. 23, n. 4, p. 159-164. 2007.
- FUSARO, A.E. et al. Maternal–fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. **Immunology.** v. 122, p. 107-115. 2007.
- GAZZINELLI, G. et al. Immune responses during human schistosomiasis mansoni: Immunological status of patients with acute infection after treatment. **J. Immunol**, v. 135, p. 2121–2127. 1985.
- GRYSEELS, B. et al. Human Schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118. 2006.

HAGAN, P.; NDHLOVU, P.D.; DUNNE, D.W. Schistosome Immunology: More Questions than Answers. **Parasitol. Today**, v. 14, n.10, p. 407-412. 1998.

HANG, L.M.; BOROS, D.L.; WARREN, K.S. Induction of immunological hyporesponsiveness to granulomatous hypersensitivity in *Schistosoma mansoni* infection. **J. Infect. Dis**, Chicago, v. 130, n.5, p. 515-522. 1974.

HASSAN, M.M. et al. Transmission of circulating schistosomal antigens from infected mothers to their newborns. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, v. 27, n. 3, p. 773-80. 1997.

HEIKKINEN, J. et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 136, n. 2, p. 373-378, 2004.

HERZ, U. et al. Prenatal sensitization in a mouse model. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.162, n. 3, p. S62-S65, 2000.

HEWITSON, J.P.; GRAINGER, J. R.; MAIZELS, R.M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v. 167, n.1, p. 1–11. 2009.

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

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 14, p. 397-400. 1972.

KULLBERG, M.C et al. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. **J. Immunol.**, v.148, n. 10, p. 3264-3270, 1992.

LAGADARI, M. et al. Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2004.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435. July 2010.

LAYLAND, L. E. et al. Pronounced Phenotype in Activated Regulatory T Cells during a Chronic Helminth Infection. **J. Immunol.** v. 184, p.713-724. 2010.

LEDERER, J.A. et al. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. **J. Exp. Med**, v. 184, n.2, p. 397-406. 1996.

LENZI, J.A .et al. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, supl.4, p. 257-267. 1987.

LIMA, C. et al. Modulation of the induction of lung and airway allergy in the offspring of IFN- γ -treated mother mice. **J. Immunol.**, v. 175, n. 6, p. 3554-3559, 2005.

MACLEOD, M. K.L. et al. CD4 memory T cells:What are they and what can they do? **Seminars in Immunology**, v. 21, p. 53–61. 2009.

MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHSH, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature**, v. 3; p.733-744, 2003.

MALANCHERE, E., HUETZ, F., COUTINHO, A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. **Eur. J. Immunol**, v. 27, n.3, p. 788-793. 1997.

MALHOTRA, I. et al. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. **J. Immunol**, v. 162, n.11, p. 6843-6848. 1999.

MANGAN, E. N. et al. Helminth Infection Protects Mice from Anaphylaxis via IL-10-Producing B Cells. . **J. Immunol**. v.173, p.6346-6356. 2004.

MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 1224-31. 2004.

MCGUIRK, P.; MILLS, K.H. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends Immunol.**, v. 23,n. 9, p. 450-5. 2002.

MEDEIROS, M., JR. et al. Schistosoma mansoni infection is associated with a reduced course of asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v.111, p.947-951. 2003.

MOORE, K.W.; de WALL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunol**. v. 19, p. 683-765, 2001.

MONTENEGRO, S.M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin- 10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J. Infect. Dis.** v. 179, n. 6, p. 1502–1514. 1999.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol**, v. 7, p. 145-173. 1989.

NEVES, R. H. et al. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni*(Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. **Parasitol. Res**, v. 95, n. 1, p. 43-49. 2005.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. In: MELO, A.L., COELHO, P.M.Z., *Schistosoma mansoni* e a doença. Atheneu, São Paulo:13^a ed., p. 193-212. 2007.

NOURELDIN, M.S.; SHALTOUT, A.A. Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 28, p. 539-550. 1998.

OKANO, M., SATOSKAR A.R., NISHIZAKI, K., et al. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. **J. Immunol.** v. 163, n., p. 6712–6717. 1999.

OTHMAN, A.A.; SHOHEIB, Z.S.; SAIED, A.M.; et al. Congenital exposure to *Shistosoma mansoni* infection: Impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiology**, v. 215, p.101-112. 2010.

PACÍFICO, L.G.G.; MARINHO, F.A.V.; FONSECA, C.T.; et al. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent of Interleukin-10. **Infection and Immunity**. v. 77, n. 1, p. 98–107. 2009.

PEARCE, E.J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Exp. Medicine**, v. 173, p. 159-166. 1991.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 499–511. 2002.

REINER, S. L. Development in Motion:Helper T Cells at Work. **Cell.**, v 129. 2007.

ROCHA, B.; TANCHOT, C. CD8 T cell memory. **Semin. Immunol.**, v.16, n. 5, p. 305-314. 2004.

SABIN, E.A. et al. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 269-272. 1996.

SANTOS, P. E. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **Parasitol. Res.**,v. 101, n. 1, p. 95-102. 2010.

SANTOS, P.E.A. et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2013 (in press).

SANTORO, I.; BOROJEVIC, R.; BOUT, D. Mother-child relationship in human schistosomiasis mansoni. I Parasitic antigens and antibodies in milk. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 26, n. 6, p. 1164-1168. 1977.

SEWELL, D. et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. **Int. Immunol.**, v. 15, n. 1, p. 59-69. 2003.

SOUZA, R. P. et al. Cytokine and chemokine profile in individuals with different degrees of periportal fibrosis due to *schistosoma mansoni* infection. **Journal of Parasitology Research**. v.2012. 2012.

STADECKER, M. J.; FLORES VILLANUEVA, P. O. Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. **Immunol. Today**. v. 15, n.12, p. 571-574, 1994.

STEINFELDER, S. et al. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). **J Exp Med.** v. 206, n. 8, p. 1681-1690. 2009.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. CD4 T-cell memory. **Semin. Immunol.**, v. 16, n. 5, p. 295-303. 2004.

STRAW, A.D. et al. CD154 Plays a Central Role in Regulating Dendritic Cell ctivation During Infections That Induce Th1 or Th2 Responses. **J Immunol.** v. 170, p. 727–734. 2003.

TALLIMA, H. et al. Transforming growth factor-b and Th17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis mansonii. **Cytokine**, v. 48, p. 239-245. 2009.

TAYLOR, S.; BRYSON, Y.J. Impaired production of gamma-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage. **J. Immunol.**, v. 134, n. 3, p. 1493-1497, 1985.

TAYLOR, J.J.; MOHRS, M.; PEARCE, E.J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J. Immunol.**, v. 176, n. 10, p. 5839-47. 2006.

THOMAS, P. G.; HARN JR, D. A. Immune biasing by helminth glycans. **Cell. Microb.**, v. 6, n. 1, p. 13–22. 2004.

VAN der VLUGT, L. E. P. M. et al. Schistosomes Induce Regulatory Features in Human and Mouse CD1dhi B Cells: Inhibition of Allergic Inflammation by IL-10 and Regulatory T Cells. **PLoS ONE.** v. 7, n.2. 2012.

WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, v. 18, n.5,p. 605-617. 2003.

WANG, H. et al. Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. **Reprod.**, v. 122, n. 5, p. 809-816. 2001.

WILSON, M.S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell. Biol.** v. 85, n. 2, p. 148–154. 2007.

WILSON, M.S.; MENTINK-KANE, M.M.; PESCE, J.T.; et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell. Biol.** v. 85, n. 2, p. 148–154. 2007.

WYNN, T. A. et al. A. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. **J. Immunol.**, v. 159 n. 10, p. 5014-23. 1997.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/>>. Acesso em: 13 Fev. 2013.

WYNN, T. A. et al. A. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. **J. Immunol.**, v. 159 n. 10, p. 5014-23. 1997.

ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **Eur. J. Immunol.** v. 33, p. 1439–1449. 2003.

ZACCONE, P. et al. Immune Modulation by *Schistosoma mansoni* Antigens in NOD Mice: Effects on Both Innate and Adaptive Immune Systems. **J. Biomed. Biotechnol.** doi:10.1155/2010/795210. 2010.

ZHENG, J.; LIU, Y.; LAU, Y.L.; TU, W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4 regulatory T cells. **Cell Mol Immunol.** v. 7, p.44-50. 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

ARTIGO

SHORT-COMMUNICATION

ESQUISTOSSOMOSE MATERNA EXPERIMENTAL: IL-2, IL-10 E LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS, EM
RESPOSTA À OVALBUMINA, EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES ADULTOS

Running title: IL-2, IL-10 Treg in offspring of schistosomotic mothers

Erica de Souza Fernandes¹, Virgínia Maria de Barros Lorena², Iana Rafaela Fernandes Sales¹,
Patrícia d'Emery Alves Santos¹, Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda¹, Mônica Campelo
Pessoa de Azevedo Albuquerque^{1,3}, Yara de Miranda Gomes², Vláudia Maria Assis Costa^{1,3},
Valdênia Maria Oliveira de Souza^{1,4}

¹Laboratório de Imunologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA),
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Laboratório de Imunologia, Fundação
Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil

³Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal
de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

*Corresponding author: valdenia.souza@gmail.com

Tel.: + 55 81 2126 8484; Fax: + 55 81 2126 8485.

Financial support: CNPq, FACEPE.

Abstract

We evaluated IL-10, IL-2 and regulatory T cells (Treg) anti-ovalbumin (OA), from adult offspring born and, separately, breastfed by schistossomotic mothers. The groups were animals born from infected mothers (BIM); animals suckled by infected mothers (SIM); mice born and suckled in infected mothers (BSIM). After OA+adjuvant immunization, spleen cells were cultured with OA and doubly marked for FACS. BIM group showed more B220+/IL-10+ and less CD3+/IL-2+ cells. SIM group CD3+/IL-10+ was low, but Treg was observed. BSIM mice had B220/IL-10 and Treg damped. Isolated gestation and breastfeeding in infected mothers induced immunosuppressive cells, but when together improved the anti-OA immunity.

Key words: Maternal schistosomiasis. Breastfeeding. Gestation. Immunomodulation. Adult offspring

Introdução

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* é altamente prevalente nas regiões tropicais, que incluem Nordeste e Sudeste do Brasil (WHO, 2011). Em regiões endêmicas, existe uma alta prevalência de mulheres grávidas ou em idade fértil infectadas pelo *Schistosoma* (FRIEDMAN et al, 2007). Na fase crônica da esquistossomose é observada uma imunomodulação em resposta aos antígenos dos ovos, Th2 dependente (IL-4, IL-13, IL-5 e eosinófilos), que regula negativamente a resposta Th1 (IFN- γ , TNF- α e macrófagos) desencadeada pelas formas infectantes (CALDAS et al, 2008). A IL-10, liberada pelos linfócitos T e B regulatórios, também atua regulando negativamente a resposta imune do tanto tipo Th1 como Th2 (EL-AHWANY et al, 2008; VAN DER VLUGT et al, 2012).

Este fenômeno de imunomodulação é passado aos descendentes em infecções pós-natais (ATTALLAH et al, 2006; OTHMAN et al, 2010) e foi relacionado com a transferência de antígenos parasitários ou anticorpos anti-parasita *in utero* ou através do leite materno (ATTALLAH et al, 2003). Entretanto, pouco é sabido sobre as alterações da resposta imune direcionadas aos antígenos heterólogos, em descendentes de mães esquistossomóticas (NOURELDIN et al, 1998; MALHOTRA et al, 1999). Em estudo experimental foi avaliado o efeito da gestação e da amamentação, separadamente, em mães infectadas pelo *S. mansoni* na resposta imune à ovalbumina (OA) (SANTOS et al, 2010). A amamentação em mães infectadas aumentou a resposta imune humoral OA-específica e a secreção de IL-2. Em contraste, a gestação em camundongos infectados com *S. mansoni* diminuiu a imunidade humoral OA-específica de forma IL-10 dependente. Aqui, investigou-se a produção de IL-10 e IL-2 em células do sistema imunológico, bem como, Treg em resposta a OA nos descendentes adultos.

Materiais e Métodos

Infecção materna e imunização dos descendentes adultos

Camundongos fêmeas *Swiss Webster*, com quatro semanas de idade, foram infectados com 20 cercárias de *S. mansoni*, cepa São Lourenço da Mata (SLM). 60 dias após a infecção, as fêmeas foram acasaladas com camundongos machos, sendo 1 macho para cada duas fêmeas 1:2. O mesmo procedimento foi realizado com as fêmeas não infectadas. Imediatamente após o nascimento, os filhos de mães infectadas pelo *S. mansoni* ou não infectadas, tiveram suas mães trocadas para amamentação adotiva. Depois da amamentação adotiva, quatro grupos de camundongos machos foram formados (n = 5): parte dos camundongos filhos de mães infectadas foi amamentado por mães não infectadas (MI), filhos de mães não infectadas foram amamentados por mães infectadas (AI) e outros dois grupos que foram camundongos nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI) ou mães não infectadas (CONTROLE). Com seis semanas de idade, os camundongos dos diferentes grupos foram imunizados por via subcutânea, com 100 µg de ovalbumina (OA) (grau V; Sigma - Aldrich), emulsionado em adjuvante completo de Freund ' s (CFA) (Sigma - Aldrich , na base da cauda (0,1 mL / animal). Os camundongos foram alojados nas instalações do biotério experimentação animal do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRIZ , Recife, PE , Brasil. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FIOCRUZ -PE (CEUA - FIOCRUZ - 25/2011) .

Cultura celular e citometria de fluxo

No 8º dia após a imunização, a suspensão de células do baço foi obtida de forma asséptica, como anteriormente descrito (SANTOS et al, 2010) e cultivadas (a 37 ° C , CO₂; 24h) . Numa concentração final de 5×10^6 células / ml , na presença , ou não , de OA (500 ug / ml)

. Dupla marcação foi realizada após a incubação (4 ° C , 30 min) com as soluções de anticorpo marcado com fluorocromo, a uma concentração de 0,5 mg/10⁶ células : PE - Cy5 anti-mouse CD45R/B220 , CD3 ou CD14 , mais PE anti-mouse IL - 10 , PE - Cy5 anti-mouse CD4 e PE - anti - mouse IL - 2 ou FoxP3 (BD Biosciences). Após a lavagem, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur (BD- Pharmingen , San Diego, CA, EUA). A frequência de células positivas foi analisada utilizando o programa Cell Quest : A região de linfócitos foi determinada utilizando granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). Células apresentadoras de antígenos foram selecionados com base na granulosidade e expressão de CD14 + ou B220 + . Limites para os marcadores foram sempre definidos com base em populações negativas e controle isotípico. Uma análise descritiva da frequência de células no quadrante superior direito (células duplo - positivas) foi realizada. Diferenças estatísticas (p <0,05) entre os grupos foram avaliados por meio da análise One-way de variância e teste de Mann -Whitney. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes.

Resultados

CD3+, B220+ e CD14+ e a produção de IL-10 em descendentes adultos, imunizados com OA, e previamente amamentados ou gerados em mães esquistossomóticas

Após a reestimulação *in vitro* com OA, a frequência de células CD3+/IL-10+ (Fig1a) foi menor nos camundongos apenas amamentados em mães infectadas, quando comparados com os outros grupos (AI=0,07%; MIAI=0,18%; MI=0,22%; CONTROLE=0,26%). Para o grupo MI foi observada uma alta frequência de células B220+/IL-10+ (Fig 1b) (AI=0,5%; MIAI=0,4%; MI=1,7%; CONTROLE=0,6%).

Observou-se uma frequência muito menor de células CD14+ / IL-10 + (Fig. 1c) para todos os grupos experimentais em relação ao controle. No entanto, nos grupos AI e MIAI

havia menos destas células quando se comparados ao grupo MI (AI = 1,4%; MIAI = 2,0%; MI = 4,5%; CONTROLE = 7,0%).

Frequencia de células CD4+ expressando IL-2 e FoxP3 em descendentes adultos previamente amamentados ou gerados em mães esquistossomóticas

Quando imunizados *in vivo* com OA, foi observada uma frequência significativamente menor de células CD4+/IL-2+, nos descendentes gerados em mães esquistossomóticas (MI e MIAI=0,1%). Não houve diferença na frequência destas células entre os grupos, frente à restimulação *in vitro* com OA (Fig 2a).

Diferentemente, uma frequência maior de linfócitos CD4+/FoxP3+ foi observada no grupo AI, bem como, quando reestimuladas com OA (Fig 2b).

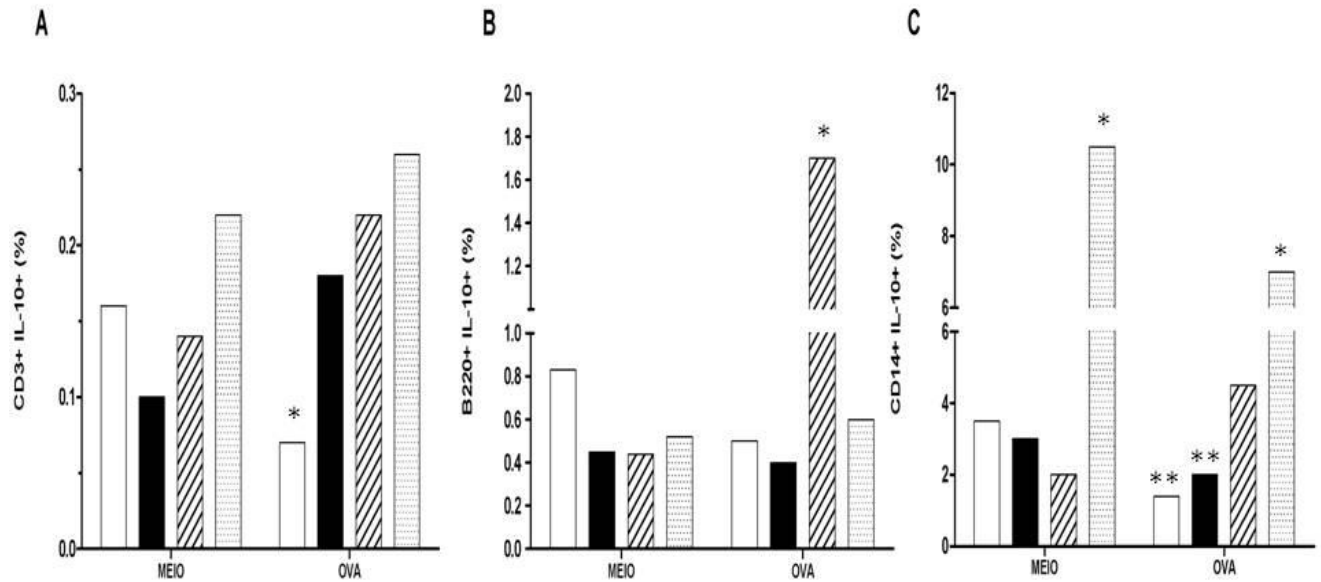


Figura 1: Frequencia de células CD3+(A), B220+(B) e CD14+(C) produtoras de IL-10 nas células de camundongos adultos nascidos de mães infectadas (MI), apenas amamentados em mães infectadas (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MAI) e nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE), imunizados com OA+CFA .5x10⁵ células cultivadas com Meio RPMI, OA (500 µg/mL) e marcadas com anticorpos anti-CD3 PeCy 5 (A), anti-B220+ PeCy5 (B), anti-CD14+ FITC (C) e anti-IL-10 PE. * p <0,05 comparado a todos os outros grupos ** p <0,05 comparado ao grupo MI.

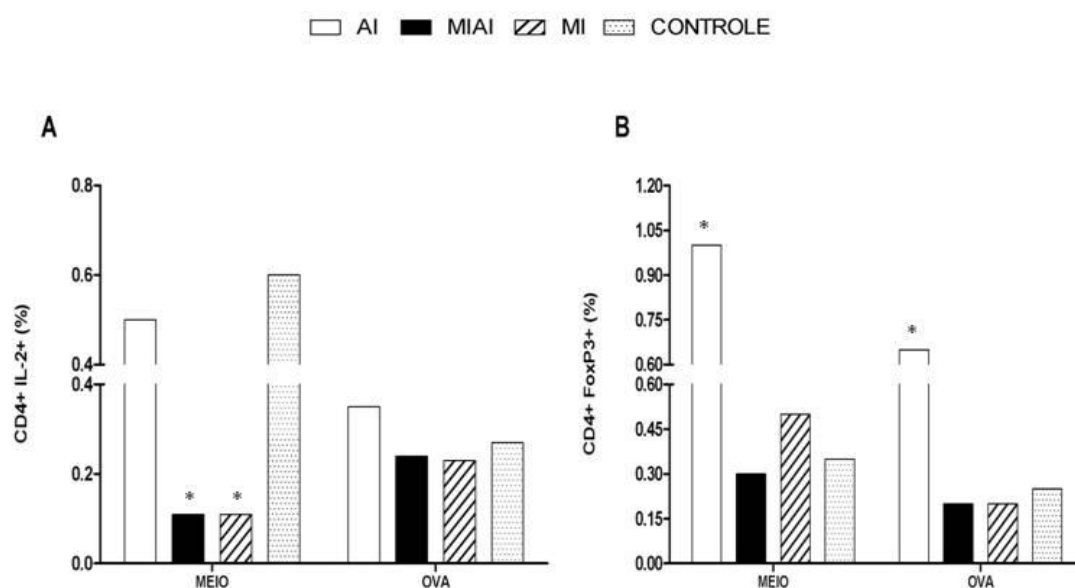


Figura 2: Frequencia de células CD4+ produtoras de IL-2(A) e Treg(CD4+FoxP3+) (B) nas células de camundongos adultos nascidos de mães infectadas (MI), apenas amamentados em mães infectadas (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI) e nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE), imunizados com OA+CFA. 5×10^5 células cultivadas com Meio RPMI, OA (500 $\mu\text{g/mL}$) e marcadas com anticorpos anti-CD4 FITC (A e B), anti-FoxP3 PE (A) e anti-IL2 PerCP(B). * $p < 0,05$ comparado a todos os outros grupos.

Discussão

Este estudo avaliou a produção de IL-2 e IL-10 por células imunes para um antígeno heterólogo, a ovalbumina, em descendentes adultos de mães esquistossomótica. Por se tratar de um modelo experimental, foi possível investigar o efeito da gestação, separadamente, da amamentação em mães infectadas.

A gestação levou a menor produção de IL-2 por linfócitos T e maior de IL-10 por linfócitos B nos descendentes. Este cenário supressor pode ser devido à passagem de

antígenos dos ovos e dos vermes do *S. mansoni*, pela placenta, que predis põem a geração de linfócitos B altamente produtores de IL-10 (HARRIS et al, 2011). É importante ressaltar que nos animais MI houve maior quantidade de macrófagos (CD14) e linfócitos (CD3) com IL-10 intracelular, em comparação ao grupo que receberam leite de mães infectadas (AI e MIAI). Foi demonstrado que a infecção pelo *S. mansoni* induz um estado de ativação não-convencional das APCs (alta frequência de células CD80+ e CD40+) (STRAW et al, 2003). A interação entre APC TLR2-e TLR-4-/C-type lectinas para lípidos e carboidratos em diferentes de fases do ciclo de vida, respectivamente (HOKKE et al, 2005; VAN LIEMPT et al, 2007), induziram células T potencialmente anti-inflamatórias e produtoras de IL-10 (LAYLAND et al, 2007). Assim, antígenos do parasita, presentes nas células da interface do útero-placentária, estimulam uma maior produção de IL-10 pelas APCs uterinas, condição que é sustentada por um longo período. Além disso, estas APCs podem permitir que células Th produzam IL-10 em resposta à OA.

Apesar do estado de imunossupressão (CD3, CD14 e B220) nos camundongos MI, a produção de IL-2 foi recuperada após re-estimulação antigênica (OA *in vitro*). Em conjunto, estes achados corroboram o comprometimento parcial da resposta imune anti-OA, via IL-10, em camundongos MI (SANTOS et al, 2010). De fato, observou-se uma menor produção de anticorpos e leve comprometimento da imunidade celular em resposta a OA.

De modo interessante, o contato prévio com leite de mães infectadas levou a uma baixa frequência de linfócitos CD3+/IL-10+, porém revelou a presença de uma frequência considerável de células Treg nestes animais. É sabido que antígenos do parasita (EL-AHWANY et al, 2012) bem como o microambiente supressor da mucosa intestinal tem a propriedade de estimular células Treg (HOWARD et al, 2011). No entanto, a reestimulação com OA *in vitro*, levou a uma diminuição nos níveis de células Treg (Fig.2a, barras brancas).

Curiosamente, os camundongos submetidos ao efeito conjunto da gestação e da amamentação em mães infectadas (grupo MIAI) apresentaram uma diminuição na imunossupressão. Baixos níveis de células B220+IL-10+ e CD14+IL-10+ foram semelhantes aos do grupo AI. Foi observada uma baixa frequência de células Treg, acompanhada de baixos níveis de IL-2, como no grupo MI. Este último resultado demonstra a exigência de IL-2 células Th para sustentação dos níveis de Treg (ANTONY et al, 2006; COLLISON et al, 2009).

Então, nossos resultados demonstram que a gestação junto com amamentação podem atenuar o caráter immunosupressor dos descendentes oriundos de áreas endêmicas. Adicionalmente, traz à tona os possíveis benefícios, ou não, do contato com antígenos parasitários no início da vida para doenças auto-imune, alergias e infecção heteróloga, a longo prazo.

Referências

- Antony PA, Paulos CM, Ahmadzadeh M, Akpinarli A, Palmer DC, Sato N 2006. Interleukin-2-dependent mechanisms of tolerance and immunity in vivo. *J Immunol* 176(9): 5255-5266.
- Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-Emshaty HM, Elsheikha HM 2006. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitol Res* 99: 137-145.
- Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G 2008. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 108: 109-117.
- Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DAA 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182: 6121-6128.
- El-Ahwany E, Bauimy IR, Nagy F, Zalat R, Mahmoud O, Zada S 2012. T Regulatory Cell Responses to Immunization with a Soluble Egg Antigen in *Schistosoma mansoni*-Infected Mice. *Korean J Parasitol* 50(1): 29-35.
- Friedman JF, Mital P, Kanzaria HK, Olds GR, Kurtis JD 2007. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol* 23:159-164.
- Harris N, Gause WC 2011. B cell function in the immune response to helminths. *Trends Immunol* 32: 80-88.

Hokke CH, Yazdanbakhsh M 2005. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol* 27: 257-264.

Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 19(6): 362-371.

Layland LE, Rad R, Wagner H, da Costa CU 2007. Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *Eur. J. Immunol* 37: 2174-2184.

Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW *et al* 1999. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. *J Immunol* 162: 6843-6848.

Noureldin MS, Shaltout AA 1998. Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. *J Egypt Soc Parasitol* 28: 539-550.

Othman AA, Shoheib ZS, Saied EM, Soliman RH 2010. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology* 215: 101-112.

Santos PEA, Sales IRF, Schirato GV, Costa VM, Albuquerque MC, Souza VM, *et al* 2010. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res* 107: 95-102.

Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ 2003. CD154 Plays a Central Role in Regulating Dendritic Cell Activation During Infections That Induce Th1 or Th2 Responses. *J Immunol* 170: 727-734.

Van der Vlugt LEPM, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhan A, Lievers E, Gloudemans AK, Kit-Yeng L *et al* 2012. Schistosomes Induce Regulatory Features in Human and Mouse CD1dhi B Cells: Inhibition of Allergic Inflammation by IL-10 and Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 7(2).

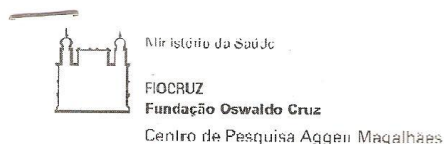
Van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, Garcia Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez Hernandez M, van Kooyk Y, van Die I 2007. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol. Immunol* 44: 2605-2615.

Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H 2011. Oral tolerance. *Immunol Rev* 241(1): 241-259.

World Health Organization (WHO). Schistosomiasis, 2011. Available from :www.who.int/tdr/diseases/schisto.

ANEXOS

ANEXO 1



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado **PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS E CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS DE CAMUNDONGOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS EM RESPOSTA AO LEITE MATERNO E OVALBUMINA**, protocolado sob o Nº 25/2011, coordenado pelo (a) pesquisador(a) **YARA DE MIRANDA GOMES** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 24/11/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até janeiro de 2014

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo <i>Mus musculus</i> Genitores 240 Macho 80 Fêmea 160 Fêmea Idade 30 dias Peso 11-15g Descendentes 400 160 Macho 240 Fêmea Dia zero	
TOTAL	1.280

We certify that the project entitled "**PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS E CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS DE CAMUNDONGOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS EM RESPOSTA AO LEITE MATERNO E OVALBUMINA**" (CEUA Protocol Nº 25/2011), coordinated by **YARA DE MIRANDA GOMES** according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on november 24, 2011. In the present version this project is licensed and valid until january 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Recife (Pe, Brazil) february 13, 2012.

Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D
Pesquisadora Emérita de FIOCRUZ
Coordenadora da CEJAC/CPAM
Recife - Brasil

Dra Eridan de Medeiros Coutinho
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

ANEXO 2



MEMÓRIAS DO
INSTITUTO
OSWALDO
CRUZ

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Produtos naturais](#)

ISSN 0074-0276 versão
impressa
ISSN 1678-8060 versão on-
line

Escopo e política

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz é uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da **medicina tropical** (incluindo patologia, **epidemiologia de campo** e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão somente através de convite. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos em inglês. Inglês de baixa qualidade é a principal causa de atraso na publicação; então, sugerimos aos autores que tenham inglês como **língua estrangeira** submeterem seus manuscritos à verificação de alguém com o inglês como língua nativa e, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às *Memórias* requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação do material.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos no seguinte

link: <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

Com este serviço, você poderá submeter manuscritos e

verificar o conteúdo de sua submissão. Os [arquivos eletrônicos](#) serão usados para avaliação editorial e arbitragem online. Além disso, a decisão editorial do manuscrito será comunicada diretamente a você.

Usando o serviço de [submissão eletrônica](#), você vai garantir rapidez e segurança no envio de seu manuscrito e agilizar o processo de avaliação.

Produtos naturais

Ads by PlusHD.1Ad Options

Enfatizamos que artigos sobre [Produtos Naturais](#) e Investigações farmacológicas devem satisfazer os seguintes requisitos.

1. Qualquer extrato natural, fração ou composto deve ser totalmente caracterizado e a [informação relacionada](#) a origem, localização e período/ano que foi coletado, deve ser fornecida. Especialmente, o extrato em estudo, deve ser fracionado e as substâncias ativas deste [produto natural](#) devem ser identificadas.
2. Técnicas de isolamento e purificação devem ser descritas em detalhes.
3. Autores devem declarar em seus artigos que o material em estudo é livre de endotoxinas.
4. [Ensaio de Citotoxicidade](#) com células normais devem ser apresentados
5. Materiais de plantas (assim como de outros organismos) devem ser devidamente identificados. O nome científico deve aparecer (em itálico), o autor deste nome e o nome de família devem ser fornecidos; mencionar quem identificou o material. O manuscrito deve incluir referências aos espécimes da planta (depositada em herbário regional) ou ao material examinado;
6. Artigos que tratam de vigilância biológica de séries de extratos descaracterizados de plantas ou outros organismos não serão considerados para publicação nas Memórias.
7. Investigações farmacológicas de extratos requerem detalhamento na caracterização do extrato. O perfil cromatográfico (e.g., HPLC com de sinais identificados) deve ser realizado, ou a informação qualitativa e quantitativa em componentes ativos e típicos deve ser fornecida;
8. Artigos meramente descritivos não serão aceitos. As Memórias só consideram manuscritos em que conclusões são baseadas em estatísticas adequadas. Em cada caso os controles positivos (substâncias ativas de referência) devem ser utilizados e a dependência da dose/atividade devem ser demonstrada;
9. Qualquer estudo envolvendo indivíduos deve ser apresentado Aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número de protocolo deve ser informado;
10. Trabalhos experimentais com animais, referências devem ser feitas aos princípios de cuidados com os animais de laboratório ou regulamentos semelhantes e a aprovação do comitê de ética local;
11. Estudos que envolvem plantas da Biodiversidade brasileira devem ter autorização para acesso a recursos genéticos, e se for o caso, acesso também a associação de conhecimento tradicional. O número da autorização deve ser informado.

Submissão de Sequencias

Informações sobre sequências genéticas relatadas no manuscrito, devem ter seu número de acesso GeneBank mencionadas no manuscrito.

O manuscrito deve ser preparado de acordo com as instruções aos autores.

Os autores que submetem um manuscrito à apreciação compreendem que, se aceito para publicação, transferem o direito exclusivo do manuscrito às Memórias, incluindo o de reprodução em todas as formas e meios de comunicação. A revista não recusará aos autores solicitação razoável de permissão para reproduzir qualquer contribuição.

1. No caso de ensaios clínicos a obrigatoriedade de informar o número do registro na Plataforma REBEC.
2. Informamos que os trabalhos submetidos às Memórias são encaminhados a uma triagem para detecção de Plágio através do uso de um software. Ferramenta utilizada na prevenção de plágio profissional e outras formas de má conduta acadêmica.
3. Todos os autores devem assegurar e garantir que as pesquisas relatadas não são resultados de má conduta tais como dados produzidos, falsificação, plágio ou duplicidade. No caso de confirmação de má conduta na pesquisa, emitiremos uma notificação de retratação para corrigir o registro científico. Favor consultar o Singapore Statement em: <http://www.singaporestatement.org/statement.html>.
4. Todos os estudos que envolvem seres humanos de ter a aprovação do Conselho de Ética Institucional. Número do Protocolo deve ser fornecido.
5. Trabalhos que envolvem animais experimentais devem fazer referência aos princípios de cuidados com animais de laboratório, ou regulamentos semelhantes e aprovação do comitê de ética local.
6. Manuscritos submetidos às Memórias serão submetidos a revisão de Inglês "Premium Editing" pela empresa Ameican Journal Experts que propõem sugestões.
7. Declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados em qualquer outro meio previamente.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou consultar a home-page (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>) ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2562.1222), ou e-mail (memorias@ioc.fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Formato e estilo

O manuscrito deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado, figuras legendadas e referências. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e legendas de figuras devem ser submetidas juntas em único arquivo. Somente figuras deverão ser encaminhadas como arquivo suplementar.

O MANUSCRITO DEVE SER ORGANIZADO NA SEGUINTE ORDEM:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: nome do autor, seção, departamento, laboratório, instituição e localização geográfica (cidade, estado e país); endereço completo somente do autor correspondente.

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Fonte de financiamento: Indicar as fontes de apoio financeiro e a mudança de endereço.

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, além de especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética, de acordo com o **sobrenome do primeiro autor**.

NO TEXTO USE O SOBRENOME DOS AUTORES E A DATA:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910)

Com dois autores, é:

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912)

Quando há mais de dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus.

Consultar: <http://www2.bq.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

Ao final do trabalho, use os seguintes estilos de referências:

REVISTAS

1. Artigo de periódico padrão

1.1. Impresso

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected

patients. *N Engl J Med* 25: 284-287.

1.2. On line

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL 2002. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 25: e12140307.

1.3. DOI

Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK 2009. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. *BMJ* doi: 10.1136/bmj.a2752.

2. Organização como autor

Diabetes Prevention Program Research Group 2002. Hypertension, insulin and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 40: 679-686.

3. Autores pessoais e organização como autor

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ, Alf-One Study Group 2003. Sexual dysfunction in 1,274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 169: 2257-2261.

4. Volume com suplemento

Geraud G, Spierings EL, Keywood C 2002. Tolerability and safety of frovatriptan with short and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 42 (Suppl. 2): S93-S99.

5. Artigo com errata publicada

Malinowski JM, Bolesta S 2000. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther* 22: 1151-1168. Erratum in *Clin Ther* 2001 23: 309.

6. Artigo publicado eletronicamente antes da versão impressa

Yu WM, Hawley TS, Hawley RG, Qu CK 2002. Immortalization of yolk sac-derived precursor cells. *Blood* Nov 15 100: 3828-3831. Epub 2002 Jul 5.

LIVROS E OUTRAS MONOGRAFIAS

1. Autor pessoal

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA 2002. *Medical microbiology*, 4th ed., Mosby, St. Louis, 255 pp.

2. Capítulo em um livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM 2002. Chromosome alterations in human solid tumors. In B Vogelstein, KW Kinzler (eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, p. 93-113.

3. Anais de Conferências

Harnden P, Joffe JK, Jones WG 2002. Germ cell tumours. Proceedings of the 5th Germ Cell Tumour Conference, 2001 Sep 13-15, Leeds, UK, Springer, New York, 102 pp.

4. Dissertação e Tese

Borkowski MM 2002. *Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans*, PhD Thesis, Central Michigan University, Michigan, 78 pp.

MATERIAIS NÃO PUBLICADOS

1. No prelo

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M 2002. Signature of balancing selection in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.

2. CD-ROM

Anderson SC, Poulsen KB 2002. Anderson's electronic atlas of haematology [CD-ROM]. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

3. Artigo de periódico na Internet

Abood S 2002. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [Internet] [cited 2002 Aug 12]102. Available from: nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle.

ILUSTRAÇÕES

figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) como na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Como uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

Tabelas devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

OUTROS FORMATOS E ESTILOS DE ARTIGOS

Notas Técnicas: Notas Técnicas devem comunicar sucintamente novas técnicas individuais ou avanços técnicos originais. A nota inteira deve ocupar no máximo três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas (que significa em torno de 10 laudas em espaço duplo). O texto não deve ser dividido em seções. Assim, o estado da arte deve ser muito brevemente apresentado e resultados devem ser ligeiramente apresentados e discutidos ao mesmo tempo. Tabelas e figuras complementares poderão ser publicadas como dados complementares. Referências devem ser limitadas às essenciais e citadas no final da nota, com o mesmo formato, como em artigos completos. Devem ser apresentados um resumo breve e três palavras-chave.

Comunicações breves: devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter

referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, com o mesmo formato usado em artigos completos. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifregr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

No caso de ensaios clínicos, é obrigatório informar o número de inscrição da plataforma REBEC.

Os autores também devem fornecer uma declaração de que os dados/resultados do manuscrito não são plágio e não foram publicados anteriormente.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

1. uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista e assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;
2. uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor correspondente;
3. **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação;
4. **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.