



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

IANA RAFAELA FERNANDES SALES

Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

**Recife
2015**

IANA RAFAELA FERNANDES SALES

Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*

ORIENTADORA: Dr^a VALDÊNIA MARIA OLIVEIRA DE SOUZA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

**Recife
2015**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S237a Sales, Iana Rafaela Fernandes.
Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni* / Iana Rafaela Fernandes Sales. – Recife: O autor, 2015.
133 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Esquistossomose. 2. Leite humano. 3. Imunidade celular. 4. Peptídeos.
I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-121)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPEAQ)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

IANA RAFAELA FERNANDES SALES

No dia 27 de fevereiro de 2015, às 08h00, na Sala Prof. Murillo La Greca - no 3º. and. do CCS/UFPE, os Membros Doutores: a **Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa (Presidente da Banca – UFPE)**, a **Profa. Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva (UFPE)**, a **Profa. Dra. Patrícia d’Emery Alves Santos (UFPE)**, a **Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes (CPqAM/FIOCRUZ)** e a **Profa. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena (CPqAM/FIOCRUZ)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda **IANA RAFAELA FERNANDES SALES** sobre a sua Tese intitulada “**AVALIAÇÃO *in vitro* DO EFEITO IMUNOMODULADOR DO LEITE MATERNO DE CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *Schistosoma mansoni***”, a qual foi orientada pela **Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

APROVADA

Profa. Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

APROVADA

Profa. Dra. Patrícia d’Emery Alves Santos

APROVADA

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes

APROVADA

Profa. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena

APROVADA

Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

Profa. Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Profa. Dra. Patrícia d’Emery Alves Santos

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes

Profa. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena



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**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

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 Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

Aos meus pais pelo carinho dedicado durante todos os anos de minha formação acadêmica. Ao meu esposo Humberto pela paciência e tranquilidade que sempre me motivaram e ao meu filho Gabriel que me revelou o verdadeiro sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, meu pai amado que sempre me protege e me guia em minhas decisões, além de me auxiliar nas horas mais difíceis. Sem ele, meus sonhos não se tornariam realidade.

Meu muito obrigada aos meus queridos pais Inácio e Rosilda. Pessoas iluminadas e os melhores pais do mundo. Sempre me apoiaram, incentivaram e com muito amor e paciência me educaram. Abriam mão de minha companhia tão cedo para que eu pudesse trilhar meu caminho, mas, mesmo longe nunca estiveram ausentes.

Aos meus irmãos Rodolfo e Rodrigo pelo amor, incentivo e apoio.

Ao meu querido Humberto pelo amor e, principalmente, paciência. Sempre ao meu lado, presenciando e vivendo todas as minhas angústias e conquistas ao longo desses quatorze anos de convivência.

Ao meu filho Gabriel, meu anjo, que chegou ao meio de um turbilhão de compromissos profissionais e com seu sorriso me incentiva e confirma que tudo vale a pena por ele e para ele.

À Prof^a Valdênia Souza, responsável por esse trabalho, minha eterna gratidão pelos ensinamentos e pela orientação. Sempre presente me ensinando a melhor forma de escrever, analisar, pensar e, principalmente, demonstrando como um professor deve ensinar seus alunos. Além disso, ao longo desses nove anos de parceria, foi grande incentivadora dos meus projetos profissionais.

A Patrícia d'Emery por ter sido minha primeira madrinha científica. Obrigada por todos os ensinamentos, sem os quais eu não conseguiria realizar esse trabalho.

A Erica, excelente profissional e acima de tudo grande amiga e parceira. Esteve presente em todos os momentos na minha jornada científica. Sem sua ajuda, esse sonho não teria se tornado realidade.

As minhas companheiras de laboratório, Conceição e Gabriela que forneceram grande ajuda em todos os procedimentos experimentais, acompanharam o desenvolvimento da pesquisa e prestaram uma ajuda incondicional. O sucesso do trabalho só foi alcançado por suas grandes contribuições.

A Patrícia Evellin que contribuiu incansavelmente no final da tese. Sem dúvida, a conclusão do trabalho só foi possível devido seu auxílio.

A todos do setor de Imunologia do LIKA: às professoras Mônica e Vladia, e a todos os outros componentes: André, Fabiana, Wheverton, Roeckson, Raul, Cassia e Victor.

A todos do biotério e do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães e com grande carinho a Virgínia, por tanta atenção e dedicação.

Ao Prof Tercilio Calsa Junior que liberou nosso acesso ao Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas e a Fabiana Cavalcanti que prestou grande auxílio nas análises, repassando as técnicas e orientando em todos os procedimentos pacientemente.

A todos os meus colegas de trabalho do Centro Universitário Maurício de Nassau que me auxiliaram direta e indiretamente para finalização da tese.

A todos os meus queridos e grandes amigos, primas, toda minha família, além dos meus companheiros de graduação e aos colegas de doutorado. A todos meu muito obrigada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A alta prevalência de esquistossomose crônica em gestantes, bem como em mulheres em idade fértil, tem sido amplamente relatada. Esta condição materna é capaz de alterar a resposta imune do descendente em longo prazo. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito *in vitro* do leite materno de mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* em esplenócitos e caracterizar os peptídeos encontrados nesse leite. Para isso, camundongos fêmeas infectadas ou não, tiveram seu leite coletado no 12º dia após o parto. Os esplenócitos jovens (15 dias) e maduros (6 semanas) foram cultivados com o Leite de Mães Infectadas (LMI) e com Leite de Mães Não Infectadas (LMNI) na presença de estimulador policlonal. Além disso, foram utilizados controles experimentais: Células pulsadas na ausência (BASAL) e apenas com estimulador policlonal (MITÓGENO) e células cultivadas com LMNI adicionado de antígenos solúveis dos ovos do *S.mansoni* (LMNI+SEA). Posteriormente, os ensaios de citometria de fluxo foram realizados para dupla marcação: Linfócitos T (CD3+ ou CD4+) marcados com CD28, CD154, CTLA4, IL-10 ou FoxP3. Além disso, foram analisadas a expressão de CD80, CD86 e CD40 na superfície de Macrófagos (CD14) e Linfócitos B (CD45R), e ainda a expressão de IL-10 por esse último. Para a análise dos peptídeos presentes no leite materno, um gel unidimensional foi confeccionado e as bandas obtidas no LMI, LMNI+SEA e LMNI foram processados para análise por espectrometria de massa. Além disso, foram realizadas análises de antígenos parasitários: SEA e SWAP (antígeno solúvel do verme adulto). Esplenócitos jovens pulsados apenas com o mitógeno apresentaram maior frequência de células CD3+CD28+ e CD45R+IL10+. A adição de LMNI manteve aumento CD3+CD28+ e levou a menor frequência de Tregs, com aumento na expressão de células CD45R+CD40+. Ao ser introduzido o SEA (LMNI+SEA) foi identificada uma menor frequência de células CD3+CD28+ e aumento na expressão de IL-10. O LMI proporcionou menor frequência de linfócitos CTLA4+ e FoxP3+, porém com produção de IL-10 e maior frequência de CD45R+/CD80+. Para os esplenócitos maduros, o LMNI e LMI levaram à menor frequência de células CD3+/CD28+ e maior CD3+/CTLA4+, respectivamente, com aumento sustentado de Treg. Contudo, o LMI diminuiu a presença de células B IL-10+. A adição do SEA ao LMNI manteve a diminuição de células CD3+CD28+, mas aumentou a frequência de células CD3+/CD154+. O leite de mães esquistossomóticas apresentou peptídeos relacionados à presença do *S. mansoni* e com variabilidade de função. Destacamos a natureza imunomodulatória dos peptídios aqui identificados (Interleucina 17F, Glutathione S Transferase) que podem atuar na imunidade, seja para antígenos do parasita ou heterólogos, no descendente previamente amamentado. Estes achados enfatizam o caráter dicotômico do leite materno: estimulador em células jovens e tolerogênico em células maduras. Esses achados são relevantes em áreas endêmicas para esquistossomose e reiteram a importância da identificação e caracterização de antígenos parasitários, bem como, uma avaliação do seu papel na interação parasito-hospedeiro no início da vida.

Palavras-chave: Esquistossomose. Leite humano. Imunidade celular. Peptídeos.

ABSTRACT

The high prevalence of chronic schistosomiasis in pregnant women and women of childbearing age has been widely reported. Breastfeeding by mothers with schistosomiasis is capable of altering the long term immune response of offspring. The aim of this study was to undertake an *in vitro* analysis of the effect of breast milk of mothers with schistosomiasis on young and mature splenocytes and characterize the proteomics in this milk. The milk of female mice infected with *Schistosoma mansoni* and non-infected female mice was collected on the 12th day postpartum. Young (15 days) and mature (6 weeks) splenocytes were cultivated (24hs) with mitogen (CONTROL), added to the Milk of Infected Mothers (MIM), Milk of Non-Infected Mothers (MNIM) or Milk of Non-Infected Mothers with the addition of soluble egg antigens of parasites (MNIM+SEA), as well as those without *in vitro* stimulus (BASAL). Double cell labeling was performed for flow cytometry: T Lymphocytes (CD3+ or CD4+) marked with CD28, CD154, CTLA4, IL-10 or FoxP3; Macrophages (CD14) and B Lymphocytes (CD45R) marked with CD80, CD86 or CD40 on the surface and the expression of IL-10 by CD45R+ cells. For analysis of proteomics a one-dimensional gel was made and the bands obtained from MIM, MNIM, MNIM + SEA, were processed for analysis by mass spectrometry. Additionally, the parasite antigens SEA and SWAP (soluble adult worm antigen preparation) were included in the analysis. Young splenocytes pulsed only with mitogen had the greatest CD3+CD28+ and CD45R+IL10+ cell frequency. The addition of MNIM maintained an increase of CD3+CD28+ and produced the lowest frequency of Tregs, with an increase in the expression of CD45R+CD40+ cells. The introduction of SEA (MNIM+SEA) resulted in reduced CD3+CD28+ cell frequency and increased IL-10 expression. MIM resulted in reduced CTLA4+ and FoxP3+ lymphocyte frequency, although there was some IL-10 production and greater CD45R+/CD80+ frequency. MNIM and MIM resulted in the lowest frequency of CD3+/CD28+ and CD3+/CTLA4+ cell frequency, respectively, for mature splenocytes, with a sustained increase of Treg. However, MIM reduced the presence of B IL-10+ cells. The addition of SEA to MNIM maintained a reduction in CD3+CD28+ cells, but increased the frequency of CD3+/CD154+ cells. The breast milk of mothers with schistosomiasis presented peptides related to the presence of *S. mansoni* and variability of function. The immunomodulatory nature of the peptides identified in the present study (Interleukin 17F, Glutathione-S-Transferase) should be noted, as these can act in the immune process of breastfed offspring, whether for parasite antigens or heterologous antigens. These findings emphasized the dichotomous character of breast milk, which functions as a stimulator in young cells and is tolerogenic in mature cells, yet is capable of improving LB activation. These findings are relevant for areas in which schistosomiasis is endemic and emphasize the importance of the identification and characterization of parasite antigens and the evaluation of their role in parasite-host interaction in the early stages of life, in order to obtain a better understanding of immunoregulatory events.

Keywords: Schistosomiasis. Human milk. Cellular immunity. Peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Caracterização fenotípica de esplenócitos jovens.....	53
Figura 2	Caracterização fenotípica de esplenócitos maduros.....	56
Figura 3	Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D).....	58
Figura 4	Anotação ontológicas dos peptídeos.....	59
Tabela 1	Anotação presumível dos peptídios detectados em secções de..... SDS-PAGE (1D).	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígeno
Bcl-X	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CD3	<i>Clusters of differentiation 3</i>
CD4	<i>Clusters of differentiation 4</i>
CD8	<i>Clusters of differentiation 8</i>
CD25	<i>Clusters of differentiation 25</i>
CD28	<i>Clusters of differentiation 28</i>
CD154	<i>Clusters of differentiation 154</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CD80	<i>Clusters of differentiation 80</i>
CD86	<i>Clusters of differentiation 86</i>
CD40	<i>Clusters of differentiation 40</i>
CD40L	Ligante da molécula CD40
CD14	<i>Clusters of differentiation 14</i>
CD45R	<i>Clusters of differentiation 45R</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CXCL	Quimiocina para neutrófilos
CXCR3	Receptor de Quimiocina CXC
DC's	Células Dendríticas

eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
GATA3	Fator de transcrição para diferenciação de células Th2
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócito
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócito-macrófagos
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IFN- γ	Interferom gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-10-/-	Camundongo deficiente para IL-10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17

IL-18	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
KDa	KiloDaltons
LMI	Leite de Mães Infectadas pelo <i>S.mansoni</i>
LMNI	Leite de Mães Não Infectadas
LMNI+SEA	Leite de Mães Não Infectadas adicionado de Antígeno Solúvel do ovo do <i>S.mansoni</i>
LNFPIII	Lacto-N-Fucopentose III
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
iT reg	Células T regulatórias induzíveis
nT reg	Células T regulatórias naturais
OVA	Ovalbumina
RORC2	Fator de transcrição para diferenciação de células Th17 humanas
ROR γ t	<i>Related orphan receptor gamma t</i> (Fator de transcrição para diferenciação de células Th17 murinas)
RPMI	Meio de cultura para células
SEA	Antígeno solúvel de ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>
SWAP	Antígeno solúvel de Vermes Adultos do <i>Schistosoma mansoni</i>
STAT1	Tradutor de sinal e ativador de transcrição 1
STAT4	Tradutor de sinal e ativador de transcrição 4
STAT6	Tradutor de sinal e ativador de transcrição 6

T reg	Célula T regulatória
T-bet	Fator de transcrição para diferenciação de células Th1
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
TCR	Receptor de Células T
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócito T auxiliar 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	A ESQUISTOSSOMOSE.....	24
2.2	RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA E A ESQUISTOSSOMOSE.....	25
2.3	A ESQUISTOSSOMOSE E A RELAÇÃO MATERNO-FETAL.....	31
2.4	DIFERENCIAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE CÉLULAS IMATURAS E..... MADURAS.	34
2.5	CARACTERIZAÇÃO DO LEITE MATERNO E SEU PAPEL DURANTE A. ESQUISTOSSOMOSE	36
2.6	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	38
3	OBJETIVOS.....	42
3.1	GERAL.....	42
3.2	ESPECÍFICOS.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	44
4.2	LOCAL DO ESTUDO.....	44
4.3	OPERACIONALIZAÇÃO E GRUPOS DE ESTUDO.....	45
4.4	ANIMAIS E INFECÇÃO PELO <i>S.MANSONI</i>	45
4.5	OBTENÇÃO DO LEITE MATERNO.....	45
4.6	CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS NA PRESENÇA DO LEITE..... MATERNO PARA OS ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO	46
4.7	ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA IMUNOFENOTIPAGEM....	47

4.8	PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS.....	47
4.9	SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE (SDS-PAGE) E... SELEÇÃO DAS BANDAS	48
4.10	DIGESTÃO COM TRIPSINA E SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS.....	48
4.11	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E DE BIOSSEGURANÇA.....	49
5	RESULTADOS	51
5.1	STATUS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS JOVENS FRENTE AO..... CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.	51
5.2	EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE CO-ESTIMULATÓRIAS EM..... MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS B JOVENS FRENTE AO CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.	51
5.3	<i>STATUS</i> DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS MADUROS FRENTE AO..... CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.	54
5.4	EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE CO-ESTIMULATÓRIAS EM..... MACROFAGOS E LINFÓCITOS B MADUROS FRENTE AO CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.	55
5.6	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE..... MASSAS	57
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÕES DA TESE.....	69
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICES	
	APÊNDICE A - Versão do artigo 1 em inglês.....	86
	APÊNDICE B - Versão do artigo 2 em inglês.....	106
	ANEXOS	

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA -..... CPqAM/FIOCRUZ).	129
ANEXO B – Comprovante eletrônico de submissão do Artigo 1 e Normas para publicação da revista: <i>Parasite Immunology</i> .	132
ANEXO C – Comprovante eletrônico de submissão do Artigo 2 e Normas para publicação da revista: <i>Molecular and Biochemical Parasitology (Print)- 1872-9428</i>	134



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A alta prevalência de esquistossomose crônica em gestantes, bem como mulheres em idade fértil, tem sido amplamente relatada (FRIEDMAN et al., 2007, SALAWU; ODAIBO., 2013). No Brasil, o único agente etiológico é o *Schistosoma mansoni* (FONSECA et al., 2014) que induz uma doença de curso crônico marcada por reação granulomatosa e fibrótica, ao redor dos ovos do parasito presos no fígado e intestino, e ocorrência de imunomodulação dependente de linfócito Th2 (IL4, IL5, IL10, IL13) e células T regulatórias (Tregs) (IL10, TGF- β) (GRYSSELS, 2012; BARSOUM et al., 2013; SCHEER et al., 2014). A infecção esquistossomótica materna foi capaz de alterar resposta imune do descendente ao longo prazo (EISSA et al. 1999; NOURELDIN et al. 1998; MALHOTRA et al. 1999; COLLEY et al. 1999; ATTALLAH et al. 2006; OTHMAN et al. 2010; SANTOS et al. 2010, 2014). Dentre estes estudos, experimentalmente, foi relacionado o efeito da gestação separada da amamentação, na reposta imune para o antígeno heterólogo - ovalbumina (OVA) (SANTOS et al. 2010, 2014, SALES et al., 2011). Foi observado que os descendentes adultos, previamente amamentados em mães infectadas, apresentaram uma potencialização da produção de anticorpos anti-OVA (SANTOS et al, 2010) e uma melhora na habilidade de apresentação antigênica dos Linfócitos B (SANTOS et al, 2014). Contudo, pouco é sabido sobre o efeito direto do leite materno de mães esquistossomóticas em células de ativação do sistema imune e sua, conseqüente, função imunomodulatória.

A funcionalidade das células apresentadoras de antígenos (APC's) é adquirida com a idade e seu *status* de maturação influencia diretamente na sua capacidade de apresentação antigênica e nos seus efeitos estimulatórios (ADKINS; LECLERC; CLARKE., 2004, WILLEMS et al., 2009; JIANG et al., 2009; DOWLING; LEVY., 2014). É sabido que a expressão de moléculas de membrana dos linfócitos T e os sinais intracelulares por elas elicitados configuram diferentes padrões de ativação da resposta imune. O CD28 e o CTLA-4 induzem sinais estimulador e inibitório, respectivamente, quando ligados às moléculas CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) nas APC's (linfócitos B, macrófagos e células dendríticas) (OLIVEIRA et al., 2009, RIHA e RUDD, 2010; BOUR-JORDAN et al., 2011). Enquanto a molécula CD154 interage com o CD40, presente na superfície das APC's, a fim de engatilhar as funções efetoras da imunidade mediada por células com melhora da captura e apresentação antigênica (MACDONALD et al., 2002; JENKINS et al., 2008; MA AND CLARK, 2009,

SHIPKOVA; WIELAND, 2012; HUANG et al., 2013). Dessa forma, a frequência desses marcadores na superfície dos linfócitos T e APC's podem influenciar no perfil da resposta imune induzido. Outro perfil imunológico importante é a produção de IL-10 pelos linfócitos T e B, bem como a expansão clonal dos linfócitos T regulatórios, onde já é estabelecida sua importância na manutenção da tolerância e sua atuação durante a infecção pelo *S.mansoni* (HESSE et al., 2004; BAUMGART et al., 2006; MBOW et al., 2013).

O leite materno humano apresenta fatores solúveis, dentre eles, proteínas, gorduras, carboidratos, minerais, eletrólitos, vitaminas e água (KENT et al., 2007). Além disso, possui compostos bioativos que são importantes como precursores da imunidade do recém-nascido (WEINER, 2001; BLEWETT et al., 2008, BALLARD; MORROW., 2013) e auxiliam na maturação das células do sistema imune (MALANCHÈRE et al., 1997; BALLARD; MORROW., 2013). Apesar de vários estudos relacionarem as proteínas presentes no leite materno (caseínas, imunoglobulinas, α - lactoalbumina, lactoferrina e soroalbumina), muitas questões relativas à expressão, estrutura e modificações desses peptídeos permanecem pouco esclarecidas (O'DONNELLA et al., 2004).

Em relação ao leite de mães esquistossomóticas, é sabido do seu potencial em alterar o grau de competência imune dos seus descendentes devido à presença de antígenos parasitários ou de anticorpos anti-parasito (THOMAS; HARN, 2005; BHARGAVA et al., 2012). De fato, Colley et al., 1999, observaram que camundongos que receberam, no período de amamentação, anticorpo específico para os antígenos solúveis dos ovos de *Schistosoma* (SEA) e foram, na vida adulta, infectados, apresentaram um incremento na produção de anticorpos anti-SEA. Outros autores destacam a presença de carboidratos na superfície dos ovos do *Schistosoma*, com ênfase para o pentassacarídeo Lacto-N-Fucopentose III (LNFPIII) que também está presente no leite materno humano e que apresenta capacidade imunomodulatória (THOMAS; HARN, 2004). Outros autores observaram ainda a melhora da apresentação antigênica dos Linfócitos B em animais amamentados em mães esquistossomóticas (SANTOS et al., 2014). Apesar de essa capacidade estimulatória ter sido anteriormente descrita, os constituintes proteicos presentes nesse leite permanecem não elucidados.

Nas últimas duas décadas, a proteômica tem se tornado uma ferramenta fundamental para a caracterização proteica e para a descoberta de biomarcadores. Essa técnica tem sido utilizada para identificação de proteínas do *Schistosoma* oriundas de amostras complexas

(CHENG et al., 2005; CURWEN et al., 2004; VAN HELLEMOND et al., 2007). Entre elas, proteínas expressas em diferentes fases do ciclo de vida do parasito (CURWEN et al., 2004), bem como, aquelas expressas de acordo com o gênero (CHENG et al., 2005) e no tegumento do helminto (CURWEN et al., 2006; KNUDSEN et al., 2005; PEREZ-SANCHEZ et al., 2006). Devido ao papel do SEA na regulação de citocinas e na subsequente imunopatologia da esquistossomose, a identificação desses componentes é de considerável interesse. Estudos anteriores demonstram que o SEA é composto 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). No entanto, a descrição de componentes do *S.mansoni* no leite de camundongos infectados e a correlação de seu efeito imunomodulador sob células de ativação do sistema imune permanece não esclarecida.

Portanto, nesse estudo avaliamos em esplenócitos, jovens e maduros, cultivados com Leite de camundongos Infectados pelo *S.mansoni* e Leite de Mães Não Infectadas adicionado ou não de Antígeno Solúvel dos Ovos quanto ao *status* de ativação dos Linfócitos T (CD3+/CD28, CD154+ ou CTLA-4; CD4+/IL10+ e FoxP3+) e de células apresentadoras de antígenos (CD45R+ e CD14+/CD80,CD86 ou CD40; CD45R+/IL10+). Além disso, realizamos a análise dos peptídeos do leite materno de camundongos infectadas ou não, bem como de antígenos solúveis dos ovos e vermes.

Este estudo tornar-se-á relevante para a comunidade científica no aspecto imunológico, bem como na saúde pública da relação hospedeiro-parasito. Os resultados encontrados poderão fornecer melhor entendimento e uma revisão do impacto que o leite materno de mães parasitadas provoca na resposta imune de indivíduos de área endêmica.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose está classificada entre as enfermidades tropicais negligenciadas e é considerada como a segunda doença parasitária mais importante, constituindo um dos principais problemas de saúde pública mundial (BRASIL., 2013; ENGELS et al., 2002). Existem cinco espécies capazes de parasitar o ser humano, que são o *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma intercalatum*, sendo os três primeiros os mais difundidos pelo mundo (GRYSEELS et al., 2006).

Estatísticas globais demonstram que aproximadamente 200-250 milhões de indivíduos estão infectados por alguma das espécies do gênero *Schistosoma* e, destes, 120 milhões apresentam os sintomas clínicos e 20 milhões a doença grave. Esta helmintíase é endêmica em 78 países e em média 600 - 780 milhões de indivíduos estão sob risco de adquirir a infecção, sendo a maioria crianças (STEINMANN et al., 2006; TALLIMA et al., 2009; UTZINGER et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013, 2014).

A única espécie que causa a doença no Brasil é o *S.mansoni* (NEVES et al., 2007; BRASIL., 2013) e sua transmissão ocorre em uma vasta área endêmica que está localizada principalmente na região Nordeste e Sudeste. No entanto, focos isolados têm sido identificados em vários estados brasileiros e casos da doença descritos em todo país (PEREIRA et al., 2010). Pernambuco é um dos estados que exibem uma das mais altas taxas de prevalência, ocupando o 3º lugar na Região Nordeste (COURA; AMARAL, 2004, SILVA; DOMINGUES, 2011) e onde tem sido verificada uma mudança no perfil epidemiológico da esquistossomose. Além da infecção persistente em muitos municípios rurais da zona da mata, os locais de transmissão e os casos de infecção aguda têm sido verificados na zona costeira, especialmente em localidade de praias turísticas (PEREIRA et al., 2010, BARBOSA et al., 2014).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é do tipo heteroxênico. O homem é o hospedeiro vertebrado definitivo onde ocorre a fase sexuada do ciclo, no qual os vermes adultos são encontrados acasalados em cópula no sistema porta hepático. Centenas de ovos são postos

diariamente por cada fêmea e nas veias mesentéricas inferiores, a maioria atravessa a parede intestinal, sendo encontrados ao longo do intestino e eliminados nas fezes. Em contato com a água e notavelmente influenciados pela temperatura, esses ovos eclodem e liberam os miracídeos, que infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria* (hospedeiros intermediários), transformam-se em esporocistos que assexuadamente dão origem a numerosas larvas (as cercárias). Devido à alta motilidade, as cercárias penetram através da pele do hospedeiro definitivo, perdem a cauda e adquirem a forma de esquistossômulos (verme imaturos) que migram pelo tecido cutâneo, ganham o sistema sangüíneo 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, reiniciando o ciclo (BATISTA, et al., 2001; BLANCHARD, 2004; SCHRAMM; HAAS, 2010).

Duas condições clínicas principais podem ser observadas – a esquistossomose aguda e crônica (CALDAS et al., 2008). A fase aguda da doença é na maioria das vezes assintomática, principalmente nos indivíduos de áreas endêmicas. Porém, algumas espécies do gênero *Schistosoma* podem produzir uma forma aguda da doença conhecida como dermatite cercariana e síndrome de Katayama (BLANCHARD, 2004).

A dermatite cercariana é uma reação de hipersensibilidade mediada por anticorpos IgE e direcionada contra a penetração das cercárias no hospedeiro recém infectado. É caracterizada por um quadro clínico de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido que se manifesta algumas horas após o contato e pode persistir por vários dias. A síndrome de Katayama também ocorre nos pacientes recém-infectados e consiste em reação de hipersensibilidade mediada por imunocomplexos em resposta à migração dos esquistossômulos e ao início da deposição dos ovos e é caracterizada por uma forte reação febril, freqüentemente associada à urticária e eosinofilia (PEARCE, 2002; BLANCHARD, 2004; GRYSEELS et al., 2006; BURKE et al., 2009).

Em áreas endêmicas, muitos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentam a doença crônica e assintomática (CALDAS et al., 2008), as complicações são eventos relativamente incomuns em humanos, só afetando aproximadamente 10% dos indivíduos infectados (BLANCHARD, 2004). Baseados nos critérios clínicos, os pacientes podem ser classificados como portadores de esquistossomose intestinal, hepatointestinal ou hepatoesplênica (ANDRADE, 2004). A esquistossomose gastrointestinal é caracterizada por desconforto e dor abdominal, perda de apetite e diarréia que usualmente apresenta sangue oculto. Esses sintomas são causados pela resposta granulomatosa aos ovos, na mucosa

intestinal, que leva a formação de pseudopólipos, microulcerações e sangramentos superficiais (KING, 2001; ROSS et al., 2002).

O evento patogênico mais significante da fase crônica é o granuloma, o qual é caracterizado por uma reação inflamatória e fibrótica que pode ser desenvolvida nos tecidos hepáticos e intestinais em decorrência do acúmulo dos ovos liberados pelas fêmeas (BLANCHARD, 2004). O fígado é o principal órgão afetado e a fibrose, decorrente da deposição de colágenos e de outros componentes da matriz extracelular, pode evoluir para fibrose periportal e oclusão progressiva dos ramos intra-hepáticos, com hipertensão portal, varizes gastroesofágicas, hiperesplenismo e episódios de hemorragia digestiva alta (HAGAN et al., 1998; GRYSEELS et al., 2006; BURKE et al., 2009).

2.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA E A ESQUISTOSSOMOSE

Durante o processo de ativação da resposta imune, a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens em células efetoras (Th1, Th2 ou Th17) é influenciado pela apresentação antigênica, especialmente pelas Células Dendríticas (DC's) e macrófagos (AKKOC et al., 2008; MOSER; LEO, 2010; REINER, 2007; REINHARDT et al., 2006). As APC's reconhecem os patógenos e regulam positivamente as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*) e as moléculas co-estimulatórias. Posteriormente, migram para os linfonodos, interagem com as células T patógeno-específica e secretam citocinas apropriadas. A transdução dos sinais através da ativação dos receptores de células T (TCR), o estabelecimento do segundo sinal mediado por moléculas co-estimulatórias e os tipos de citocinas produzidas pelas APC's, determinam a diferenciação das células efetoras (MACAGNO et al., 2007; GEGINAT et al., 2013).

Para que ocorra a ativação dos Linfócitos T, após o reconhecimento do peptídeo pelo TCR, há necessidade de um segundo sinal que é mediado pela interação de moléculas co-estimulatórias, presentes na superfície das células T e das APC's e os sinais intracelulares por elas elicitados que configuram diferentes *status* de ativação da resposta imune.

O CD28 é uma das moléculas mais importantes que estão envolvidas no desencadeamento da resposta imune e é expresso constitutivamente na superfície dos Linfócitos T *naive* ou ativados. A sua ligação aos receptores B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86), presentes na superfície das APC's, resulta em um potente sinal co-estimulatório que favorece a transcrição da IL-2, expressão de CD25 e entrada no ciclo celular (CHATENOUD, L.;

SALOMON, B.; BLUESTONE, J.A., 2001). O bloqueio da sinalização do CD28 resulta em ineficiente ativação, demonstrando seu papel fundamental para emissão de sinais críticos de sobrevivência das células T via aumento na expressão de fatores anti-apoptóticos Bcl-X (BOISE et al., 1995; BOUR-JORDAN et al., 2011; CARRENO E COLLINS., 2002; OLIVEIRA et al., 2009; RIHA AND RUDD, 2010). Diante disso, o bloqueio da sinalização do CD28 apresenta relevante implicação terapêutica na prevenção de doenças autoimunes (CHATENOUD, L.; SALOMON, B.; BLUESTONE, J.A., 2001).

Outro ligante importante na indução da resposta imunológica é o CTLA-4 que divide 30% de homogeneidade com o CD28 e apresenta maior afinidade aos ligantes B7, contudo, desempenha função distinta. O CTLA-4 é identificado apenas em células ativadas e amplamente regulado, devido suas funções supressoras (CARRENO E COLLINS., 2002; SHIPKOVA; WIELAND, 2012). Estudos experimentais demonstram que animais deficientes dessa molécula evoluem para óbito entre três e quatro semanas após o nascimento, devido infiltração de linfócitos e destruição de órgão críticos, indicando que essa molécula atua como regulador negativo da ativação das células T (CHAMBERS et al., 1997; WATERHOUSE et al., 1995).

A função efetora da imunidade mediada por células e a melhora da captura e apresentação antigênica são observadas após a interação da molécula CD154 com seu ligante CD40, presente na superfície das APC's (HUANG et al., 2013; JENKINS et al., 2008; MACDONALD et al., 2002; MA AND CLARK, 2009). O CD154 está presente predominantemente nas células T maduras e ativadas, mas, também já foi descrito em pequenas populações de células T CD8+, plaquetas, mastócitos e células B. Sua ativação está associada à regulação positiva da apresentação antigênica, ativação e maturação das células T efetoras. Além disso, regula a função dos Linfócitos B (SHIPKOVA; WIELAND, 2012).

O perfil de resposta modulado pelas células Th1 é caracterizado pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF- α . Esse processo se inicia após a ligação da IL-12 com o receptor específico na célula T, ativando o fator de transcrição STAT4 (STEINMAN, 2007) que induz a produção de IFN- γ . Este, por sua vez, ativa o fator de transcrição STAT1 que induz a expressão de T-bet, cuja atividade induz a secreção adicional de IFN- γ e induz o receptor de quimiocina CXCR3, o qual permite que as células Th1 efetoras sejam encaminhadas aos tecidos periféricos (GEGINAT et al., 2013, STEINMAN, 2007; YAMANE; PAUL, 2012). Uma vez diferenciadas, esses linfócitos expressam altos níveis do receptor para IL-18, o qual é dependente da sinalização IL-12/STAT4 e da produção de IFN- γ (ANNUNZIATO; ROMAGNANI, 2009). O resultado desse perfil de resposta é favorecer a

ativação de macrófagos, proteção contra bactérias intracelulares e eliminação de vírus. Sendo, portanto, capazes de promover uma resposta imune direcionada para patógenos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; MOSER; LEO, 2010).

As células Th2 são importantes no combate aos parasitos extracelulares, por exemplo, os vermes e estão envolvidas nos processos alérgicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; MOSER; LEO, 2010). Esse perfil de linfócitos T CD4⁺ é induzido pela presença da citocina IL-4 e a expressão do fator de transcrição GATA-3, o qual induz citocinas do perfil Th2, entre elas IL-5, IL-13 e a própria IL-4. Além disso, o GATA-3 induz o receptor de quimiocina CCR4 e o receptor de prostaglandina D2 (CRTh2) em seres humanos (STEINMAN, 2007). A IL-4 inibe as células Th1 e Th17 e induz células B a produzir anticorpos IgE, enquanto a IL-5 ativa eosinófilos. A prostaglandina D2 é produzida por mastócitos e organiza a interação entre linfócitos Th2 e suas células-alvo durante a asma alérgica (GEGINAT et al., 2013).

Esses subtipos regulam-se mutuamente, uma vez que o IFN- γ inibe a diferenciação Th2 (GAJEWSKI; FITCH, 1988; SEDER et al., 1993; STEINMAN, 2007) e o GATA3 inibe a diferenciação Th1 (FIORENTINO; BOND; MOSMANN, 1989; STEINMAN, 2007), favorecendo, assim, a polarização da resposta para uma única direção.

As células Th17 são um subgrupo diferenciado dos linfócitos T CD4⁺, cujo desenvolvimento é promovido através da secreção das citocinas IL-6, TGF- β , bem como IL-1, IL-21 e IL-23 (GEGINAT et al., 2013; HARRINGTON et al., 2005; BURGLER et al., 2009). Essas citocinas são capazes de promover a diferenciação desses linfócitos através da ativação do fator de transcrição ROR γ T em camundongos ou RORC2 em humanos (PETERS; LEE; KUCHROO, 2011). Esse perfil de células T CD4⁺ tem sido associado com doenças auto-imunes (KIMURA; KISHIMOTO, 2010; MOSER; LEO, 2010), bem como, a repostas contra bactérias extracelulares, por mecanismos dependentes da produção de anticorpos (NAKAE et al., 2002; GHILARDI et al., 2004).

Existem diferentes tipos de células T regulatórias que variam no seu mecanismo de ação e na sua origem. Essas células são categorizadas em dois subtipos, as naturais e as adaptativas. As Tregs naturais expressam constitutivamente CD25⁺, são originadas no timo e tem sido extensivamente estudadas em modelos murinos. Ensaio *in vitro* demonstram que as Tregs naturais necessitam da ativação do TCR e, uma vez ativadas, sua atividade supressiva parece ser mediada pelo contato direto célula-célula com os linfócitos T efetores e independente da atuação das citocinas. Além disso, as Tregs naturais expressam o FoxP3 (“*Forkhead Box P3*” - um fator de transcrição que controla o desenvolvimento e a função das

células Tregs) (NIZAR et al., 2010). Por outro lado, as células Tregs adaptativas (Th3, Tr1 e iTregs) podem ou não expressar o FoxP3, são derivadas de linfócitos T CD25- da periferia, previamente estimulados (por antígenos e citocinas) e produzem IL-10 e TGF- β (VIEIRA et al., 2004; RONCAROLO et al., 2006; NIZAR et al., 2010).

Os helmintos são capazes de induzir diferentes tipos de resposta de células TCD4+ no hospedeiro. Esta imunomodulação favorece a permanência do parasito por longo período e a manutenção da transmissão do mesmo. Em humanos, a infecção pelo *S. mansoni* está associada a um predomínio da resposta imunológica de perfil Th2 onde os antígenos dos ovos são os principais indutores (ZACCONE et al., 2010). Muitos estudos têm traçado um esboço da importância das moléculas co-estimulatórias e, conseqüente ativação dos linfócitos T *helper* na resposta imune à infecção esquistossomótica, tanto em humanos, quanto em modelos experimentais.

Em camundongos, as respostas imunes que caracterizam as fases aguda e crônica são bem caracterizadas. Durante as primeiras semanas pós-infecção, uma resposta Th1 é desencadeada para as formas infectantes e para os vermes imaturos. Essa resposta é caracterizada por um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, o TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ (DE JESUS et al., 2002). Após 5 a 6 semanas, com o início da deposição dos ovos, uma resposta Th2 com secreção de IL-4, IL-13, síntese de IgE, bem como eosinofilia é verificada. Caso a resposta Th2 não se desenvolva adequadamente, a resposta proinflamatória inicial se intensifica, causando morte precoce dos animais infectados. Esse fenômeno foi observado em estudo realizado com camundongos C57BL/6 deficientes na produção de IL-4 e infectados pelo *S. mansoni*. Esses animais desenvolveram doença aguda similar à humana, caracterizada por caquexia e significativa mortalidade no início da deposição de ovos. Nesses camundongos, a resposta granulomatosa foi relativamente normal, mas as alterações patológicas no intestino foram mais evidentes na ausência da IL-4 (BRUNET et al., 1997; FALLON et al., 2000).

À medida que a infecção torna-se crônica, a liberação dos ovos pelas fêmeas permanece e é observada uma diminuição da resposta Th2 com menor número e tamanho dos granulomas recém formados (PEARCE et al., 1991; PEARCE; MACDONALD, 2002; WILSON et al., 2007; BURKE et al., 2009). O perfil de resposta Th2 foi associado com a proteção e a geração da cronicidade das infecções esquistossomóticas por controlar a resposta granulomatosa ao redor dos ovos (FINKELMAN et al., 1991). Contudo, esta

imunomodulação parece ser mediada pela IL-10 que é liberada não apenas pelos clones Th2, mas também pelas células T regulatórias (WILSON et al., 2007).

Estudos sobre os mecanismos de modulação do granuloma na esquistossomose murina mostraram que animais IL-10^{-/-} desenvolveram 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). Nesse 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 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 MHC nas APC's (STADECKER; FLORES VILLANUEVA, 1994; MOORE et al., 2001). Todos esses estudos mostraram que a expressão da IL-10 durante as fases aguda e crônica da esquistossomose é importante para a sobrevivência do hospedeiro (ABATH et al., 2006). Alguns antígenos, como açúcares presentes nos ovos e vermes de *S. mansoni* (APPELMELK et al., 2003) têm a capacidade de induzir a produção de IL-10 pelas APCs (GEIJTENBEEK et al., 2003), a qual é importante na geração e manutenção de células T reg (WAKKACH et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que as células nT reg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, são essenciais no processo de imunomodulação da esquistossomose, pois promovem a manutenção da resposta Th2 (McKEE; PEARCE, 2004).

A participação dos linfócitos Th17 na esquistossomose tem sido associada com o desenvolvimento da doença grave, em animais polarizados para o perfil Th1. (RUTITZKY; STADECKER, 2006). Rutitzky et al., (2005) em seu estudo que verificou a exacerbação de patologia granulomatosa e a grave morbidade na infecção pelo *S. mansoni*, demonstraram que a neutralização da IL-17 (com anticorpos monoclonais anti-IL-17) controla o tamanho do granuloma, restaurando-o ao tamanho encontrado na fase crônica, indicando que apesar da capacidade dos antígenos parasitários de induzir clones de linfócitos Th17, a proliferação destas células deve ser controlada negativamente na fase crônica da doença.

No que se refere à participação das moléculas co-estimulatórias durante a esquistossomose, estudos *in vitro* realizados para avaliar a influencia do antígeno solúvel do verme adulto, PIII, sobre o CD28, revelam diminuição na expressão desse marcador tanto em células CD4⁺, quanto em linfócitos T CD8⁺. Além disso, foi observado aumento na

expressão de CTLA-4 e de CD86. Como resultado desse efeito, os autores observaram prevenção na formação do granuloma, bem como maior produção de IL10. Outros autores observaram que camundongos deficientes para algumas moléculas co-estimulatórias apresentaram menor capacidade em mostrar uma resposta Th2 eficaz. Esse achado foi dependente da expressão do CD28, uma vez que, nos animais CD28^{-/-} a produção de IL-4 e IL-5 foi significativamente reduzida e a produção de IFN- γ não foi alterada (HECTOR et al., 1997).

Outras moléculas co-estimulatórias envolvidas com a resposta imune durante a esquistossomose incluem o CD40 e CD40L. Em modelos de camundongos *knock out* para o gene codificante do CD40L, foi demonstrado que a interação CD40/CD40L é necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada durante a infecção pelo *S.mansoni*, e que a ausência do CD40L interfere na ativação dos Linfócitos B. Estes, por sua vez, apresentam reduzido *status* de ativação demonstrado pela baixa expressão do MHCII (MACDONALD et al., 2002). Como resultado, a montagem da resposta imune específica durante a esquistossomose fica prejudicada, demonstrando a importância dessas moléculas co-estimulatórias na imunorregulação.

2.3 A ESQUISTOSSOMOSE E A RELAÇÃO MATERNO-FETAL

Em áreas endêmicas é comum observar gestantes e mulheres em idade fértil, cronicamente infectadas pelo *Schistosoma* (FRIEDMAN et al., 2007; HILLIER et al., 2008). Quando estes pacientes não são tratados, a infecção crônica persistirá durante todo o período de gestação e amamentação (LEBEAUD et al., 2009) e como consequência, os produtos solúveis derivados do parasito podem sensibilizar a criança por meio de sua passagem transplacentária e/ou através do leite materno.

Lees e Jordan (1968) já demonstravam a transferência de anticorpos específicos para o *S. mansoni*, através da placenta, e sua permanência nas crianças por até seis meses após o nascimento. Nesse contexto, Carlier et al. (1980), utilizando anticorpos policlonais, observaram uma correlação positiva entre os níveis de antígenos solúveis do *S. mansoni* no soro proveniente de mães infectadas e do cordão umbilical de seus filhos, indicando a transferência desse componente parasitário. Outros autores detectaram antígenos de *S. mansoni*, por ELISA de captura, em 66% de amostras de urina de crianças nascidas de mulheres parasitadas (HASSAN et al., 1997). Em relação ao leite de mães infectadas, foi

observada a presença de produtos solúveis do *S.mansoni* (antígeno “M” e antígeno “4”) (SANTORO et al., 1977), bem como de antígenos parasitários (ATTALLAH et al., 2003).

Baseados nesses achados, outros estudos foram desenvolvidos com o intuito de elucidar as alterações na resposta imune para antígenos homólogos, no recém-nascido previamente exposto aos componentes parasitários.

Lenzi et al. (1987) estudando camundongos recém-nascidos e lactentes de mães infectadas pelo *S. mansoni*, verificaram a transferência de anticorpos específicos para antígenos de cercárias, de ovos e de vermes adulto, através da placenta e pelo leite materno. Estes autores observaram que esses animais, quando submetidos à infecção pós-natal, apresentavam diminuição da reação granulomatosa hepática, indicando uma hiporresponsividade aos ovos do *Schistosoma* e associando que a melhor proteção é adquirida após o período de lactação. Attallah et al. (2006) também demonstraram que a exposição pré-natal dos recém-nascidos aos antígenos ou anticorpos anti-*S. mansoni* pode atenuar a patogênese da esquistossomose numa infecção subsequente. Eles observaram a persistência de antígenos parasitários maternos nos filhotes de mães infectadas por até 8 semanas após o parto, com a presença de antígenos maternos nos tecidos hepático e renais. Após 8 semanas, os filhotes foram infectados e foi observado que os níveis de IgG, tamanho e número de granulomas hepáticos, bem como recuperação de vermes foram significativamente reduzidos nos animais nascidos de mães infectadas, quando comparados aos nascidos de mães não-infectadas.

Mais 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 significativamente menor em descendentes de mães esquistossomóticas. Esses autores demonstraram também que os níveis de expressão do gene da IL-12 e do TGF- β , citocinas reguladoras, foram maiores nos animais nascidos e amamentados em mães infectadas. Contudo, uma potencialização da resposta imune nos descendentes foi observada e associada com prévia amamentação em mães infectadas pelo *S.mansoni*. Eissa et al. (1989) ao estudar a imunidade mediada por células, para antígenos parasitários, e correlacionar esses resultados com a prévia amamentação, demonstraram um aumento da hipersensibilidade celular aos antígenos do helminto em 56% dos filhos, previamente amamentados em mulheres infectadas (por no

mínimo até o 1º mês de vida). Esta mesma relação não foi observada nas crianças que receberam o leite de vaca e/ou cabra.

Com relação à resposta dos recém-nascidos aos antígenos heterólogos, após exposição *in útero* e/ou através da amamentação às infecções helmínticas maternas, os estudos ainda são poucos. 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 utero*, e que esta imunidade pré-natal favorece a formação de uma memória imunológica que persiste na criança (resposta de células T antígeno-específica persistente por até 14 meses) e influencia a resposta para antígenos heterólogos, diminuindo a eficácia da vacinação ao BCG. 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. Uma correlação positiva foi observada entre os níveis de IgE contra antígeno de *S. mansoni* e as manifestações de alergias gastrointestinais em crianças que receberam leite de mães esquistossomóticas (NOURELDIN et al., 1998).

O estudo da influência da gestação e da amamentação, separadamente, em mães infectadas pelo *S. mansoni* na resposta imune dos seus descendentes adultos, frente ao antígeno heterólogo, ovalbumina (OVA), tem sido foco do nosso grupo de estudo.

Com relação ao efeito da amamentação, experimentalmente, foi observado que os descendentes adultos previamente amamentados em mães esquistossomóticas (amamentação adotiva) ou nascidos e amamentados apresentaram uma potencialização da produção de anticorpos anti-OVA, verificada no 8º dia pós imunização com OVA (SANTOS et al, 2010). Antígenos ou anticorpos anti-parasita da infecção materna parece interferir na produção de anticorpos anti-OVA junto com leite, visto que, descendentes que tiveram contato com leite de mães não-infectadas, não produziram níveis de anticorpos anti-OVA tão elevados quando comparado aos que foram amamentados em mães infectadas.

Além disso, foi relatado que a amamentação ameniza o potencial imunossupressivo adquirido durante a gestação (SANTOS, et al 2010). Descendentes adultos que nasceram de mães infectadas e não foram amamentados por estas mães apresentaram alta produção de IL-10 e baixa produção de anticorpos anti-OVA. Entretanto, 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.

Com intuito de avaliar a longevidade dessa potencialização, Sales et al (2010) observaram que antígenos do *S. mansoni*, em baixas doses e administrados por via oral ou subcutânea, na fase de lactação, antecipa o pico de produção de anticorpos e leva a uma potencialização sustentada da síntese de IgG1. Estes últimos resultados corroboram o efeito estimulador da imunidade adaptativa através da amamentação em mães esquistossomóticas.

Recentemente, Santos et al (2014) em seu estudo *in vivo*, desmonstraram que a amamentação em mães esquistossomóticas induziu uma melhora na apresentação antigênica pelos Linfócitos B, através de um aumento na frequência de células B CD40+/CD80+. Em contrapartida, a gestação induziu um efeito oposto com baixa apresentação antigênica durante a resposta imune a um antígeno não relacionado.

Apesar da capacidade imunomodulatória do leite materno de mães esquistossomóticas tenha sido anteriormente descrita, o estudo do efeito direto em células de ativação do sistema imune e a descrição dos constituintes proteicos presentes nesse leite, permanecem não esclarecidas.

2.4 DIFERENCIAÇÃO IMUNOLÓGICA ENTRE CÉLULAS IMATURAS E MADURAS

A primeira infância é caracterizada por um aumento na susceptibilidade à infecções devido a uma relativa imaturidade do sistema imune, o qual apresenta uma contínua maturação desde o nascimento até os primeiros anos de vida (HOLT e JONES., 2000; SUI-LING et al., 2013), com aquisição de funcionalidade das células e completa capacidade de ativação (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE., 2004, WILLEMS et al., 2009; JIANG et al., 2009; DOWLING; LEVY., 2014).

Embora os recém-nascidos sejam capazes de elaborar respostas imunes, uma relativa imunodeficiência ainda é observada e pode ser associada às diferenças funcionais e numéricas entre células de idades distintas (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE., 2004; MARSHALL-CLARKE et al., 2000). As diferenças qualitativas e quantitativas são descritas, não apenas para os linfócitos T e B, mas, também para APC's (ADKINS; LECLERC; MARSHALL-CLARKE., 2004).

Em animais recém-nascidos, o número de células T está consideravelmente reduzido, em comparação aos adultos. Após um desafio com a mesma dose antigênica, os neonatos foram mais limitados para induzir uma resposta protetora devido ao menor número de células imunes (FORSTHUBER et al., 1996; GARCIA et al., 2000; RIDGE et al., 1996). Essas discrepâncias entre as respostas podem ser atribuídas às diferenças de compartimento de células T, que em animais recém-nascidos resultam em polarização para um perfil Th2 (ADKINS et al., 2004). Esse achado explica porque até a poucas décadas atrás, os neonatos eram referidos como imunodeficientes, uma vez que, esse conceito estava associado à limitada capacidade de produção de IL-2 e, portanto, baixa proliferação. No entanto, com os avanços na imunologia e descobertas de novos conceitos, torna-se claro que os neonatos apresentam modulação da resposta imune (ADKINS et al., 2000; GARCIA et al., 2000; SIEGRIST et al., 2000) e não exclusivamente via células T imaturas, mas, também através da ação dos Linfócitos B e Células Dendríticas (MARSHALL-CLARKE et al., 2000). Apesar da limitação na indução de resposta Th1 em células imaturas já ter sido amplamente descrita (ADKINS et al., 2000; GARCIA et al., 2000; SIEGRIST et al., 2000), Qureshi e Garvy (2001), observaram que a transferência de esplenócitos jovens oriundos de animais sensibilizados com *Pneumocystis carinii*, para um ambiente maduro, foi capaz de induzir uma resposta Th1 eficaz. Esses resultados demonstram a influência do ambiente, no qual as células estão atuando, para polarização da resposta, independente da idade da célula.

A resposta humoral, no período neonatal, difere daquela obtida na vida adulta, no que se refere à duração, afinidade, heterogeneidade e distribuição dos isótipos de imunoglobulinas (MARSHALL-CLARKE et al., 2000; SIEGRIST., 2001). As deficiências que normalmente são encontradas na produção de anticorpos dos recém-nascidos podem ser atribuídas às diferenças, idade-dependente, entre as células B, embora os mecanismos de sinalização permaneçam pouco escalrecidos (ADKINS et al., 2004; MARSHALL-CLARKE et al., 2000). Os Linfócitos B imaturos (IgM+/IgD⁻) compreendem a principal população no baço de camundongos recém-nascidos e, diferentemente das células B maduras, são sinalizadas negativamente pela ligação do Receptor de Células B (BCR) e falham em aumentar as moléculas co-estimulatórias, por exemplo, CD86 e o MHCII que são essenciais para interação efetiva com as células T (BENSCHOP et al., 2001; KING et al., 1999; MARSHALL-CLARKE et al., 2000). No entanto, já foi demonstrada a ativação dessas células pela indução de IL-4 ou ligação do CD40. Outro aspecto interessante refere-se à diferença entre o grau de funcionalidade das células B em camundongos recém-nascidos. Adkins et al (2004), relatam

que os Linfócitos B presentes nos linfonodos são fenotipicamente e funcionalmente mais maduros do que as células encontradas no baço desses animais.

No que se refere às DC's, já está bem estabelecido que o número absoluto dessas células, em camundongos neonatos, é ~~extremamente~~ reduzido quando comparado aos adultos (ADKINS et al., 2004). Contudo, quanto às diferenças funcionais ainda existem controversas. Estudos anteriores revelam que as DC's de camundongos jovens, após desafio antigênico, foram deficientes na indução da expressão do MHCII e de moléculas co-estimulatórias, e consequente capacidade limitada para promover a proliferação dos linfócitos T (MUTHUKKUMAR et al., 2000). Em contrapartida, outros autores não identificaram diferenças na produção de IFN- γ entre DC's oriundas de animais recém-nascidos e adultos, além de demonstrar que essas células (CD11c^{low}) perfaziam 30% a 40% das DC's de animais com 7 dias, em comparação a 10% a 15% nos adultos (DAKIC et al., 2004; SUN et al., 2003).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO LEITE MATERNO E SEU PAPEL DURANTE A ESQUISTOSSOMOSE

O leite materno humano apresenta fatores solúveis, dentre eles, proteínas (~~caseínas, alfa lactoalbumina, imunoglobulinas, enzimas, hormônios, fatores de crescimento~~), gorduras (~~triglicérides e ácidos graxos~~), carboidratos (~~lactose, glicose, galactose e oligossacarídeos~~), minerais, eletrólitos, elementos traços, vitaminas e água (KENT et al., 2007). Além disso, possui compostos bioativos que são importantes como precursores da imunidade do recém-nascido (WEINER, 2001; BLEWETT et al., 2008, BALLARD; MORROW., 2013) e auxiliam na maturação das células do sistema imune (MALANCHÈRE et al., 1997; BALLARD; MORROW., 2013). Apesar de vários estudos relacionarem as proteínas presentes no leite materno (caseínas, imunoglobulinas, α - lactoalbumina, lactoferrina e soroalbumina), muitas questões no que se refere à expressão, bem como estrutura e modificações pós-traducionais, permanecem pouco esclarecidas (O'DONNELL et al., 2004).

As proteínas do leite materno podem ser agrupadas em três classes principais: caseína, proteínas da fração da membrana globular de gordura e proteínas desnatadas. Estudos anteriores revelam a presença de 22 peptídios oriundos do colostro humano, embora o trabalho tenha observado 400 spots (MURAKAMI; LAGARDE; YUKI., 1998). Mais recentemente, outros autores identificaram 107 spots, os quais correspondiam a 39 genes

responsáveis pelos peptídios da fração globular de gordura (FORTUNATO et al., 2003; CAVALETTO, GIUFFRIDA, CONTI., 2004). Outros autores, utilizando diferentes técnicas, demonstram resultados variados no que se refere à proteômica do leite (O'DONNELLA et al., 2004). Nesse contexto, foi demonstrado um total de 285 peptídios não redundantes encontrados em banco de dados, incluindo um "core" de 106 proteínas que eram compartilhadas com o proteoma do leite bovino (ALESSANDRO, SCALONI, ZOLLA., 2010). Mais recentemente, Picariello et al (2013) identificaram proteínas no leite materno com diversas funções, entre elas, funções fisiológicas, por exemplo, transporte e sinalização celular, metabolismo da gordura, processos metabólicos, síntese de proteínas e modulação da resposta imune.

Diante do exposto, a proteômica tem se tornado uma ferramenta fundamental para caracterização das proteínas e descobertas de biomarcadores. Essa técnica vem sendo definida como a análise do conjunto de proteínas presentes em tecidos, células ou compartimentos subcelulares, usada para identificar proteínas diferencialmente expressas e potencialmente relacionadas a processos biológicos, ou para fins tão complexos quanto à caracterização de modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína (VAN WIJK, 2001).

Com relação às características imunológicas, a amamentação confere proteção ao recém-nascido, visto que o leite contém substâncias antimicrobianas e fatores imunomodulatórios, por exemplo, citocinas, oligossacarídeos, anticorpos, fatores de crescimento, bem como vários tipos celulares, por exemplo, macrófago, neutrófilos, linfócitos e células epiteliais (FIELD, 2005; BLEWETT et al., 2008).

A amamentação não é unicamente uma fonte de nutrição, mas, ao mesmo tempo proporciona os mecanismos reguladores que favorecem a manutenção da homeostase (PENTTILA, 2010). Dentre os fatores solúveis, como as citocinas, destacam-se a IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e TGF- β . A IL-6, junto com IL-10 e TGF- β , estão envolvidas com diferenciação e maturação de células produtoras de IgA e de células intestinais. Enquanto, a IL-10 e TGF- β , são também conhecidas por suas funções imunossupressoras e tolerogênicas (WEINER, 2001; BLEWETT et al., 2008). Sendo assim, estes fatores imunomodulatórios conferem ao leite materno um caráter dicotômico. Durante a tenra infância, o neonato deve desenvolver tolerância (dependente de células T) a moléculas não-patogênicas (como antígenos alimentares) e sensibilização aos patógenos (com a maturação do sistema imune e estimulação da produção de anticorpos). Sabe-se também que os anticorpos IgG maternos, passados ao recém-nascido através do leite, são importantes para desenvolvimento da

linhagem de células B e formação dos anticorpos no neonato. De fato, Malanchère et al. (1997), quando estudaram camundongos nascidos de mães geneticamente deficientes na produção de anticorpos ou mães normais, verificaram que a progênie nascida de mães normais continha 2 a 3 vezes mais células pré-B e células B, comparadas com camundongos nascidos de mães deficientes.

Entretanto, tem sido demonstrado que a exposição materna aos alérgenos, citocinas ou aos processos infecciosos, durante o período de amamentação, podem alterar o grau de competência imune dos seus descendentes (LIMA et al, 2005; LEME et al, 2006; RODRIGUES et al., 2006; FUSARO et al, 2007).

Em relação ao leite de mães esquistossomóticas, é sabido do seu potencial em alterar o grau de competência imune dos seus descendentes devido à presença de antígenos parasitários ou de anticorpos anti-parasito (THOMAS; HARN, 2005; BHARGAVA et al., 2012). Nesse contexto, Attallah et al (2003) verificaram que os recém nascidos amamentados em mães infectadas apresentam o antígeno 63 Kd por até 24 meses após o parto. Contudo, nas crianças não amamentadas, o antígeno foi identificado na urina até 28 dias após o parto. Para os anticorpos anti-*Schistosoma*, Colley et al. (1999) observaram que camundongos que receberam, no período de amamentação, anticorpo específico para os antígenos solúveis dos ovos de *Schistosoma* (SEA) e foram, na vida adulta, infectados, apresentaram um incremento na produção de anticorpos anti-SEA. Outros autores destacam a presença de carboidratos na superfície dos ovos do *Schistosoma*, com ênfase para o pentassacarídeo Lacto-N-Fucopentose III (LNFPIII) que também está presente no leite materno humano e que apresenta capacidade imunomodulatória (THOMAS; HARN, 2004). Ainda nesse contexto, recentemente foi demonstrada uma melhora da apresentação antigênica dos Linfócitos B em animais amamentados em mães esquistossomóticas (SANTOS et al., 2014). Apesar de essa capacidade estimulatória ter sido anteriormente descrita, os constituintes proteicos presentes nesse leite permanecem não elucidados.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DO *Schistosoma mansoni*

A técnica de proteômica tem sido aplicada para identificação e para o estudo de proteínas expressas no *Schistosoma sp*, com ênfase na descrição diferencial das fases do ciclo biológico (CURWEN et al., 2004 e LIU et al., 2006), gêneros (CHENG et al., 2005), cercária

(YANG et al., 2009) e ovos imaturos e maduros (Mathieson & Wilson, 2011). No que se refere à relação hospedeiro-parasito, outros estudos revelam as proteínas do tegumento (BRASCHI & WILSON, 2006; BRASCHI et al., 2006; PEREZ-SANCHEZ et al., 2008; PEREZ-SANCHEZ et al., 2006; VAN BALKOM et al., 2005; CASTROBORGES et al., 2011a e CASTRO-BORGES et al., 2011b), proteínas secretadas/excretadas (CASS et al., 2007; CURWEN et al., 2006; GUILLOU et al., 2007; HANSELL et al., 2008; KNUDSEN et al., 2005; LIU et al., 2009; PEREZ-SANCHEZ et al., 2006 e WU et al., 2009), bem como os peptídios do proteassoma 20S de *S. mansoni* (CASTRO-BORGES et al., 2006).

Os estudos proteômicos revelam, para as diferentes formas evolutivas, a existência de funções essenciais e mecanismos adaptativos que quando interrompidos impedem o desenvolvimento da doença, sendo, portanto, potenciais alvos vacinais. Já os estudos de proteínas que são expostas na superfície do parasito, provável sítio de interação com o hospedeiro, indicam alvos que poderiam ser mais acessíveis a drogas e aos anticorpos (VERJOVSKI-ALMEIDA & DEMARCO, 2008).

Nesse contexto, a comparação entre as proteínas solúveis de quatro fases evolutivas do *S. mansoni* (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos) demonstram homogeneidade de 70%. Ou seja, foi verificada a presença de proteínas semelhantes nas diferentes fases do ciclo biológico, sugerindo a participação desses peptídios em vias elementares e essenciais para sobrevivência do helminto (CURWEN et al., 2004). Em estudo nos diferentes gêneros, foi detectado um perfil de 2D similar entre vermes machos e fêmeas, com poucas proteínas expressas exclusivamente em cada sexo (CHENG et al., 2005). Utilizando diferentes técnicas aplicadas em estudos proteômicos, entre elas, 2D e LCMS/MS, foram analisadas proteínas secretadas de ovos, cercárias e vermes adultos. Em ovos, foram identificadas 188 proteínas relacionadas ao desenvolvimento e sinalização, vias metabólicas, modulação da resposta imunológica, manutenção do equilíbrio de oxi-redução, conformação proteica e outras ainda não caracterizadas em *Schistosoma spp* (CASS et al., 2007). Os produtos de secreção de cercárias de *S. mansoni* contêm proteases e algumas proteínas imunorreguladoras, as quais se correlacionam, respectivamente, com a função de penetração do parasito na pele e a subsequente sobrevivência no hospedeiro (CURWEN et al., 2006 e KNUDSEN et al., 2005).

Devido ao importante papel dos antígenos dos ovos do *Schistosoma* (SEA) na regulação imune e na, subsequente, imunopatologia da esquistossomose, o estudo dos seus componentes e de suas funções tem despertado interesse. Esses antígenos 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). Semelhantes aos ovos do parasito, o SEA induz uma resposta Th2 quando injetado em animais. Além disso, análogo a outros produtos ou extratos de helmintos, pode ser descrito como um adjuvante devido sua habilidade em induzir efetiva resposta imune (PEARCE, 2005). O estudo da habilidade do SEA em induzir a proliferação dos Linfócitos T CD4+, isolados de camundongos infectados pelo *S.mansoni*, revelam que não apenas a proteína Sm-p40 está presente nessa modulação, mas também outros peptídios, entre eles, p150/166 (albumina), a carboxiquinase fosfoenolpiruvato, a Glutathione S transferase, o peroxiredoxin 1 e o SmEP25 tem sido identificados (ASAHI; STADECKER., 2003). Estudo mais recente relata a presença de glicoproteínas secretórias denominadas (IPSE)/alpha-1 e ômega-1 (HEWITSON et al., 2009).

Uma das proteínas mais abundantes do SEA é o polipeptídio 40kDa (Sm-p40) que representa aproximadamente 10% da constituição desse antígeno. Está presente nos granulomas e tem sido associado a uma resposta Th1. Uma mistura complexa de glicoconjugados, por exemplo, glicoproteínas e glicolipídios são responsáveis pela ativação do sistema imune (VAN LIEMPT et al., 2007). Alguns estudos destacam os oligossacarídeos na superfície dos ovos do *Schistosoma*, com ênfase para o Lacto-N-Fucopentose III (LNFPIII) (THOMAS; HARN, 2004), o qual parece ativar diretamente células imunes para produzir mediadores relacionados com a resposta Th2, incluindo a proliferação de células B e a síntese de IL-10 e PGE2. Appelmelk et al. (2003), observaram que glicanos, contendo fucose ou manose, que estão presente nos antígenos de *S. mansoni* se ligam em receptores de lectina tipo C (DC-SIGN- CD209), em células dendríticas. Estes autores sugeriram que a polarização da resposta para o perfil Th2 induzida pelo *S. mansoni*, pode ser decorrente dessa ligação.

A demonstração dos peptídios presentes em diferentes fases do ciclo de vida do *S.mansoni*, bem como o estudo de seus mecanismos imunomoduladores são relevantes para o entendimento da resposta imunológica durante a esquistossomose. Nesse contexto, a proteômica do leite de camundongos infectados e a correlação de seu efeito imunomodulador sob células de ativação do sistema imune permanece não esclarecida.

Dessa forma, esse estudo se propõe a avaliar o *status* de ativação de Linfócitos T, bem como a expressão de moléculas co-estimulatórias em Macrófagos e Linfócitos B, cultivados com o leite materno de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e descrever a proteômica desse leite.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o *status* de ativação de linfócitos T, bem como, a expressão de moléculas co-estimulatórias em macrófagos e linfócitos B, cultivados com o leite materno de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e identificar peptídeos encontrados no leite.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Comparar em cultura de células esplênicas, imaturas e maduras, cultivadas *in vitro* sob ativação mitogênica, com leite materno de camundongos infectados pelo *S.mansoni* e com leite de mães não infectadas, adicionado ou não de antígeno solúvel do ovo do verme, quanto a:

- A frequência de Linfócitos T (CD3+) que expressavam CD28, CD154 e CTLA-4;
- A frequência de Linfócitos T (CD3+) e Linfócitos B (CD45R+) produtores de IL10;
- O número de Células T Regulatórias (CD4+ FoxP3+);
- A frequência de Células apresentadoras de antígenos (CD14+ e CD45R+) que expressavam as moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 ou CD40).

3.2.2 Identificar os peptídeos presentes do leite de camundongos fêmeas infectadas pelo *S.mansoni* via espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF.



MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental e intervencionista, onde células esplênicas, imaturas e funcionais, de animais não infectados foram cultivadas *in vitro* com leite de fêmeas infectadas pelo *S.mansoni*, para avaliar sua atividade imunomodulatória. Como controle, as células também foram cultivadas com o leite de fêmeas não infectadas e com leite de mães não esquistossomóticas, adicionado de SEA. Além disso, amostras do leite e de antígenos parasitários foram analisadas por espectrometria de massa para descrição dos constituintes proteicos.

Os animais do estudo foram escolhidos de forma não aleatória, uma vez que a randomização não foi necessária já que as características dos mesmos eram semelhantes, por apresentarem o mesmo tempo de vida, fazerem parte da mesma linhagem e serem criados nas mesmas condições alimentares.

Como vantagens do estudo, além das condições controladas de observação, a facilidade de o modelo experimental mimetizar a esquistossomose humana e as dificuldades de realização por questões éticas serem menores. Entretanto, não foi possível afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis em seres humanos.

4.2 LOCAL DE ESTUDO

As etapas do estudo relacionadas à infecção, acasalamento, manutenção das mães infectadas e coleta do leite foram realizadas no Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Posteriormente, os procedimentos laboratoriais (cultura das células esplênicas e preparação das amostras) foram realizados nas dependências do Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e as análises de citometria de fluxo foram realizadas no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM/FIOCRUZ.

No que se refere às etapas da preparação das amostras para proteômica do leite materno, os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genômica e Proteômica de

Plantas (Departamento de Genética – UFPE) e a Espectrometria de Massa no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.3 OPERACIONALIZAÇÃO E GRUPOS DE ESTUDO

Foram utilizados 10 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com 4 semanas de idade para infecção com *S. mansoni* e 15 animais não-infectados como controle. Vinte e cinco camundongos machos da mesma espécie foram utilizados para o acasalamento. Os animais foram fornecidos e mantidos em condições adequadas no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

As células utilizadas para os ensaios *in vitro* foram obtidas do baço de camundongos machos sem contato prévio com o parasito, ou seja, nascidos e amamentados em mães não infectadas. Os esplenócitos foram obtidos de animais em diferentes idades: 1- Jovens com duas semanas de vida (imaturas) e 2- Adultos com seis semanas de vida (maduras).

O leite materno utilizado para os ensaios *in vitro*, sob ativação mitogênica, foi agrupado em três tipos: Leite de Mães Infectadas pelo *S.mansoni* (LMI); Leite de Mães Não Infectadas pelo *S. mansoni* (LMNI) e LMNI acrescido de Antígeno Solúvel do Ovo (LMNI+SEA). Além disso, como controles experimentais, os esplenócitos foram cultivados na ausência (BASAL) e presença (MITÓGENO) de ativador policlonal. Para proteômica foram utilizados os diferentes perfis de leite materno, descritos acima, bem como os antígenos solúveis dos ovos (SEA) e vermes adultos (SWAP) do *S.mansoni*.

4.4 ANIMAIS E INFECÇÃO PELO *S.MANSONI*

Fêmeas *Swiss Webster* com 4 semanas de idade foram infectadas, via percutânea, com 20 cercárias da cepa São Lourenço da Mata de *S. mansoni*. No 45º após a infecção, foi realizado o parasitológico de fezes (KATZ et al., 1972) e sessenta dias após a infecção, as fêmeas tiveram seus estros sincronizados (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, foram acasaladas individualmente e observada a formação do “plug” vaginal. O mesmo procedimento foi realizado para as fêmeas não-infectadas.

4.5 OBTENÇÃO DO LEITE MATERNO

Entre 10 e 12 dias após o parto, as mães foram separadas dos seus filhotes por ~2 horas, anestesiadas (Xilazina-0,1µl e Ketamina-0,2 µl) e receberam ocitocina (100 µl -1 UI), minutos antes da ordenha. Foi utilizada, sobre as tetas, gaze estéril umedecida com água aquecida (~30°C) e posteriormente realizada uma massagem manual. O leite foi coletado (~200µL/ animal) com auxílio de uma pipeta (200 µl/animal) e acondicionado em tubos de vidro esterilizados. Posteriormente, os tubos foram centrifugados em centrífuga refrigerada (25°/4500 rpm - por 20 minutos) (MORIYA et al., 2011). A camada superior de gordura foi descartada e a parte solúvel passou por filtração esterilizante e foi estocado (-80°C). A ausência total de células foi verificada com auxílio câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%.

4.6 CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS NA PRESENÇA DO LEITE MATERNO PARA OS ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Camundongos sem contato com o *S. mansoni* tiveram seus baços retirados com 15 dias (células jovens) e com 6 semanas (células maduras) de idade e colocados em placas de vidro por 1h a 37°C, na presença de colagenase (1 mg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). As suspensões de células esplênicas foram lavadas em RPMI 1640 suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal (SBF) (Sigma-Aldrich), 0,1 mM L-glutamina, 0,5 mM 2-mercaptoethanol e 1% penicilina e estreptomicina. Após centrifugação (1.500rpm por 10min. / 4°C), as hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 18 segundos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) e mantidas no gelo (10 minutos) para deposição dos grumos e, após esse período, transferidos 10mL. Posteriormente, foi realizada a contagem das células e o teste de viabilidade, realizados como o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%.

Após o ajuste da concentração das células (5×10^6 células/poço), diferentes grupos de análises foram delineados: Células Esplênicas sem a presença de Ativadores Policlonais (BASAL) e com os ativadores policlonais - Forbol Miristato Acetato – PMA e Ionomicina (MITÓGENO). Além disso, os esplenócitos também foram cultivados na presença de PMA e Ionomicina e adicionados de Leite de Mães Infectadas pelo *S. mansoni* (LMI), Leite de camundongos Não Infectados (LMNI) e Leite de Fêmeas Não Infectadas adicionado de SEA

(LMNI+SEA). Todas as culturas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ humidificada, por 24hrs.

4.7 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO PARA IMUNOFENOTIPAGEM

Suspensões de células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos, foram coletadas 24 horas após o cultivo, lavadas e submetidas às marcações para identificação e contagem dos Linfócitos e Macrófagos, com anticorpos monoclonais conjugados a substâncias fluorescentes, específicos para as moléculas de membrana das células: Linfócitos T (CD3-PECy5 e CD4-PECy5), Macrófagos (CD14- FITC) e Linfócitos B (CD45R- PECy5). O perfil dos linfócitos T foi avaliado pela marcação de anticorpos anti-CD28 (PE), anti-CD154 (PE), anti-CTLA4 (PE), anti-IL10 (PE) e anti- FoxP3 (PE). Foram avaliados quanto à expressão de moléculas co-estimulatórias pela dupla-marcação com anticorpos anti-CD80 (PE), anti-CD86 (PE) ou anti-CD40 (PE) em macrófagos e nos linfócitos B, sendo esses últimos também marcados com anti-IL-10 (PE).

As células foram adquiridas em FACS Calibur (BD- Pharmingen, San Diego, CA, USA), onde 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os linfócitos foram analisados (Cell Quest) quanto a sua Granulosidade (SSC) e tamanhos (FSC) e as APC's baseadas na sua granulosidade e expressão de CD14+ ou CD45R.

A análise descritiva foi feita da frequência de células duplo-positivas e a diferença estatística ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$), entre os estímulos, realizada por análise de variância para dados paramétricos (ANOVA), seguida pela comparação múltipla segundo o método de Mann–Whitney. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para análise da reprodutibilidade dos resultados.

4.8 PREPARAÇÃO DOS ANTÍGENOS SOLÚVEIS

Os antígenos solúveis do *S. mansoni* foram preparados segundo o método descrito por Gazzinelli et al. (1983). Os vermes adultos e ovos foram coletados de camundongos *Swiss Webster* infectados com cercárias da cepa SLM e foram ressuspensos separadamente em salina 1,7%, triturados e homogenizados com pistão de teflon (WIRTS, DTL). O homogenato resultante foi centrifugado (50.000 g /1 hora a 4°C) e o sobrenadante coletado e dialisado contra PBS 0,05M, pH 7,4 (SIGMA. E.U.A), durante 48 horas a 4°C e filtrado em filtro de 0,45µm (Filter millex -HA- Millipore Produtos Division, Bedford, MA). Após as dosagens de

proteínas dos antígenos de vermes adultos (SWAP) e do ovo (SEA), as soluções antigênicas foram fracionadas e conservadas a -20°C , para uso posterior.

4.9 SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ELETROFORESE (SDS-PAGE) E SELEÇÃO DE BANDAS

Um gel unidimensional foi construído para verificação da integridade e identificação de peptídeos via espectrometria de massas no Leite de Mães Infectadas. Como controles experimentais, também foi realizado gel unidimensional no Leite de Mães Não Infectadas adicionados ou não de Antígeno Solúvel do Ovo do *S.mansoni*. Além disso, também foram inseridos antígenos solúveis dos ovos (SEA) e dos vermes adultos (SWAP) nas análises.

O gel SDS-PAGE (12,5% de poliacrilamida) foi submetido à eletroforese, em uma cuba vertical OmniPhor com 20 cm x 20 cm com voltagem constante de 150 V. Foram aplicados 40 μg de proteínas totais juntamente com 5 μL de marcador de baixo peso molecular (LMW Calibration, GE Life Sciences) e aplicadas no gel. Após a eletroforese, os géis foram corados com azul de *Coomassie Brilliant R*, conforme Candiano *et al.* (2004) e posteriormente digitalizados em scanner ImageScanner III (GE Life Sciences).

4.10 DIGESTÃO COM TRIPSINA E SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS

As bandas selecionadas foram excisadas manualmente dos géis e estocadas a -20°C em água deionizada. Em seguida, foi realizada a descoloração e remoção de SDS por incubação em solução com 50% de metanol e 2,5% de ácido acético por 3 h a temperatura ambiente, seguido de desidratação com solução de acetonitrila (100%). Posteriormente, as proteínas foram reduzidas com solução de DTT (Ditiotreitol) a 10 mM por 30 minutos, alquiladas em solução de IAA a 50 mM (30 minutos). Em seguida, as bandas foram lavadas com bicarbonato de amônio a 100 mM e novamente desidratadas com acetonitrila (100%) por três vezes. Finalizadas estas etapas, foi adicionada a solução contendo tripsina na concentração de $20\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e incubado a 37°C em banho seco, overnight, garantindo a máxima digestão da proteína. Após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Às bandas foi adicionada a solução de extração (5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila) e após 40 minutos, em banho de gelo, a solução foi retirada e adicionada a solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram

totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises por espectrometria de massas.

Os peptídeos obtidos a partir das bandas foram analisados via espectrometria de massas para identificação presumível em analisador MALDI-ToF/ToF (Brüker Daltonics), localizado no CETENE. Após a eluição dos peptídios concentrados em Solução de Matriz (1% ácido α -ciano-4-hidrocinâmico), os espectros de massa foram submetidos à identificação presumível pelo programa *online* MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>), com os parâmetros de: busca com digestão por tripsina até um sítio de clivagem ignorado; organismo *Mus* e as modificações pós-traducionais: oxidação em resíduo de metionina como modificação variável e carboximetilação. O banco de dados SWISSPROT e NCBI nr foram consultados para análise das seguintes variáveis: Peptídeo, Acesso, Identificação, Anotação presumível, Score, *e-value*, Peso molecular e porcentagem de Identificação.

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E BIOSSEGURANÇA

Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CPqAM/FIOCRUZ) e encontram-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) os quais são adotados como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA- CPqAM/FIOCRUZ (ANEXO A).



RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 STATUS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS JOVENS FRENTE AO CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.

O *status* de ativação dos Linfócitos T CD3+ pôde ser verificado através da frequência de células que expressavam as moléculas CD28, CD154 e CTLA-4. Para as células jovens na Figura 1A, foi possível observar maior frequência de células CD3+ expressando a molécula CD28 quando cultivadas com o mitógeno, em comparação ao cultivo apenas com o meio de cultura, e não houve diferença no número de células CD3+ expressando CD154 ou CTLA-4. Esta frequências não foram alteradas após a adição do leite materno de mães não-infectadas. Contudo, frequência de células CD3+/CD28+ foi significativamente menor na presença do leite de mãe não infectada adicionado de SEA (Mitógeno (2,15%); LMNI+SEA (0,93%)), enquanto que os esplenócitos cultivados na presença do Leite de Mães Infectadas apresentam menor frequência de células CD3+CTLA4+ em comparação ao Mitógeno (0,87% x 0,29%). Não houve diferença estatística na frequência de células T jovens CD3+CD154+, independente do estímulo utilizado (Basal (0,43%); Mitógeno (0,6%); LMI (0,37%); LMNI+SEA (0,45%); LMNI (0,4%).

Os Linfócitos T (CD3+) e os Linfócitos B (CD45R+) foram avaliados quanto a sua capacidade de produção da interleucina 10 (IL-10) (Figura 1B). Foi identificada uma aquisição de três vezes mais células CD3+IL-10+ quando cultivadas na presença do Mitógeno quando adicionado de Leite de Mães Infectadas e um aumento de 2x mais com o Leite de Mães Não Infectadas acrescido do SEA (BASAL (0,20%); MITÓGENO (0,20%); LMI (0,63%); LMNI+SEA (0,4%) e LMNI (0,20%). Com relação à frequência de células CD45R+/IL-10+, houve um aumento significativo sob o estímulo mitogênico que foi semelhante quando adicionados os diferentes leites maternos estudados (BASAL (1,50%); MITÓGENO (4,50%); LMI (5,0%); LMNI+SEA (3,0%) e LMNI (4,0%). A figura 1-C desenha a frequência de Células T regulatórias (CD4+FoxP3+), foi possível observar a drástica diminuição pela presença do leite materno em relação ao estímulo mitogênico, independente da infecção ou adição de antígeno parasitário (BASAL (1,17%); MITÓGENO (1,76%); LMI (0,67%); LMNI+SEA (0,42%) e LMNI (0,49%)).

5.2 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE CO-ESTIMULATÓRIAS EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS B JOVENS FRENTE AO CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.

A capacidade de apresentação antigênica dos Macrófagos e Linfócitos B imaturos foi avaliada através da expressão das moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD40) presentes em suas membranas. Na figura 1D, observamos que não houve diferença estatística frequência de células CD14+, independente da molécula co-estimulatória analisada, quando cultivadas com o Mitógeno ou com os diferentes perfis de leites maternos em comparação ao cultivo apenas com o meio de cultura. Diferentemente, para as células CD45R+/CD80+ (Figura 1E) foi observada maior frequência após cultivo com Leite de Mães Infectadas (14,0%) em comparação ao Mitógeno (7,0%). Além disso, foi identificado um aumento de 2,6 vezes na aquisição das células CD45R+CD40+ quando cultivadas na presença do Leite de Mães Não Infectadas (15,85%) em relação ao Mitógeno (6,04%).

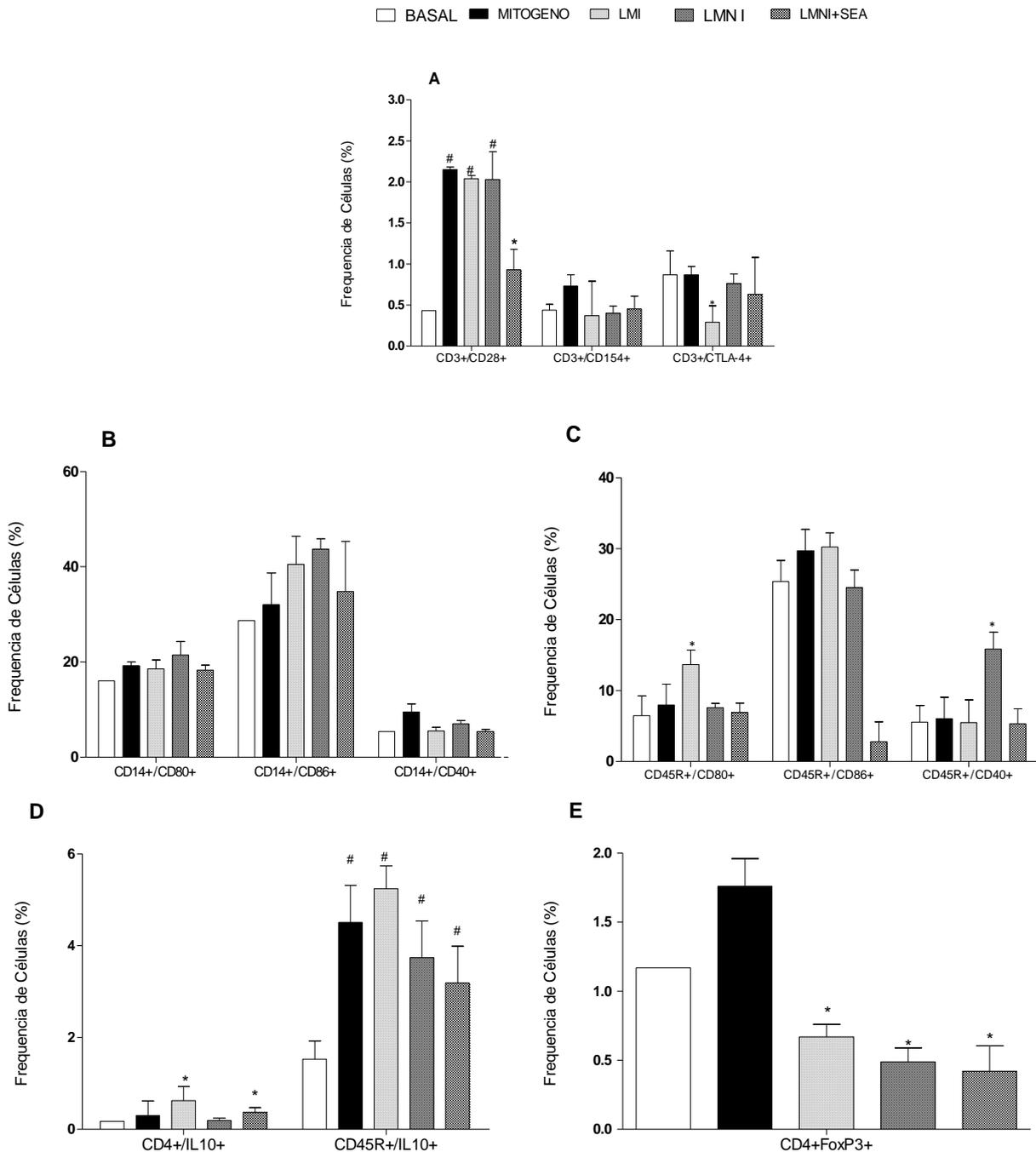


Figura 1: Caracterização fenotípica de esplenócitos jovens quanto cultivados com mitógeno e com leite materno de mães infectadas ou não. Camundongos *Swiss webster* com 15 dias de vida tiveram seus baços retirados e os esplenócitos cultivados por 24h em diferentes condições: Ausência (BASAL) ou presença de estimulador policlonal (MITÓGENO) acrescido aos diferentes perfis de leites materno: Leite de Mães Infectadas pelo *S.mansoni* (LMI), Leite de Mães Não Infectadas (LMNI) e LMNI acrescido do Antígeno Solúvel do Ovo (LMNI + SEA). As células foram marcadas com anticorpos conjugados a substâncias fluorescentes. O *status* de ativação dos linfócitos foi verificado através da dupla marcação de linfócitos T CD3+ (PECy5) com CD28 (PE), CD154 (PE) e CTLA4 (PE) (A), bem como, os Linfócitos T (CD3+ - PECy5) e Linfócitos B (CD45R+ - PECy5) (D) foram marcados para a citocina IL10 (PE) e os Linfócitos T regulatórios (CD4+FoxP3+) também foram avaliados (E). As células CD14+ (FITC) (D) e CD45R+ (PECy5) (E) foram marcadas para as moléculas co-estimulatórias CD80 (PE), CD86 (PE) e CD40 (PE). # p<0,05 em comparação com o BASAL. * p<0,05 em comparação com o MITÓGENO.

5.3 STATUS DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS MADUROS FRENTE AO CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.

Com relação ao *status* de ativação dos Linfócitos T CD3+ maduros, foi verificado que entre as células que expressavam as moléculas CD28, CD154 e CTLA-4, esta primeira esteve significativamente em maiores números, quando cultivadas com o mitógeno em comparação ao cultivo apenas com o meio de cultura (Figura 2A). A presença do Leite de mães Não Infectadas (LMNI) adicionados ou não de SEA (LMNI+SEA) induziu uma drástica redução no número de células CD3+CD28+, em relação ao cultivo com o Mitógeno ((Basal (1,28%); Mitógeno (2,35%); LMI (2,16); LMNI+SEA (0,73%); LMNI (0,53%)). Entretanto, a aquisição de células CD3+CD154+ foi muito maior sob cultivo com LMNI+SEA ((Basal (0,46%); Mitógeno (0,48%); LMI (0,54%); LMNI+SEA (2,14%); LMNI (0,45%)). Quanto à aquisição de células CD3+CTLA4+, foi observada maior frequência quando cultivadas na presença do LMI (2,30%), em comparação ao Mitógeno (1,04%).

Ao avaliarmos a cultura de Linfócitos T e B produtores de IL-10 (Figura 2 B), as frequências de células CD3+IL-10+ foram semelhantes entre o basal e os estímulo mitogênico com ou sem os diferentes perfis de leite materno (BASAL (0,53%), MITÓGENO (0,26%) LMI (0,5%); LMNI+SEA (0,3%); LMNI (0,43%)). A respeito das células CD45R+/IL-10+, houve ótima aquisição destas células sob estímulo do mitógeno (6,70%) em relação ao basal (2,70%), porém, a presença do leite de mães infectadas levou à forte redução da quantidade destas células (LMI 1,79%). O cultivo com LMNI +SEA (4,0%) e com LMNI (4.86%) não levou à diferenças significativas quando comparada ao mitógeno. Em relação às Células T regulatórias (Figura 2-C), não houve aumento da frequência das células CD4+FoxP3+ após o estímulo com mitógeno, porém, a adição dos leite de mães infectadas ou não infectadas, com ou sem SEA, levaram ao aumento da frequência destas células (MITÓGENO (0,265%); LMI (1,30%); LMNI+SEA (1,49%); LMNI (0,9%)).

5.4 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE CO-ESTIMULATÓRIAS EM MACROFAGOS E LINFÓCITOS B MADUROS FRENTE AO CULTIVO COM LEITE MATERNO DE MÃES INFECTADAS OU NÃO INFECTADAS.

Em relação às células CD14⁺ e CD45R⁺ marcados para as moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40, identificamos maior ou igual frequência desses esplenócitos quando cultivadas com o Mitógeno em comparação com o Basal (Figura 2D e E). Porém, não foram identificadas alterações estatisticamente significativas na aquisição dessas células após a adição do leite materno de mães infectadas ou não-infectadas com ou sem SEA

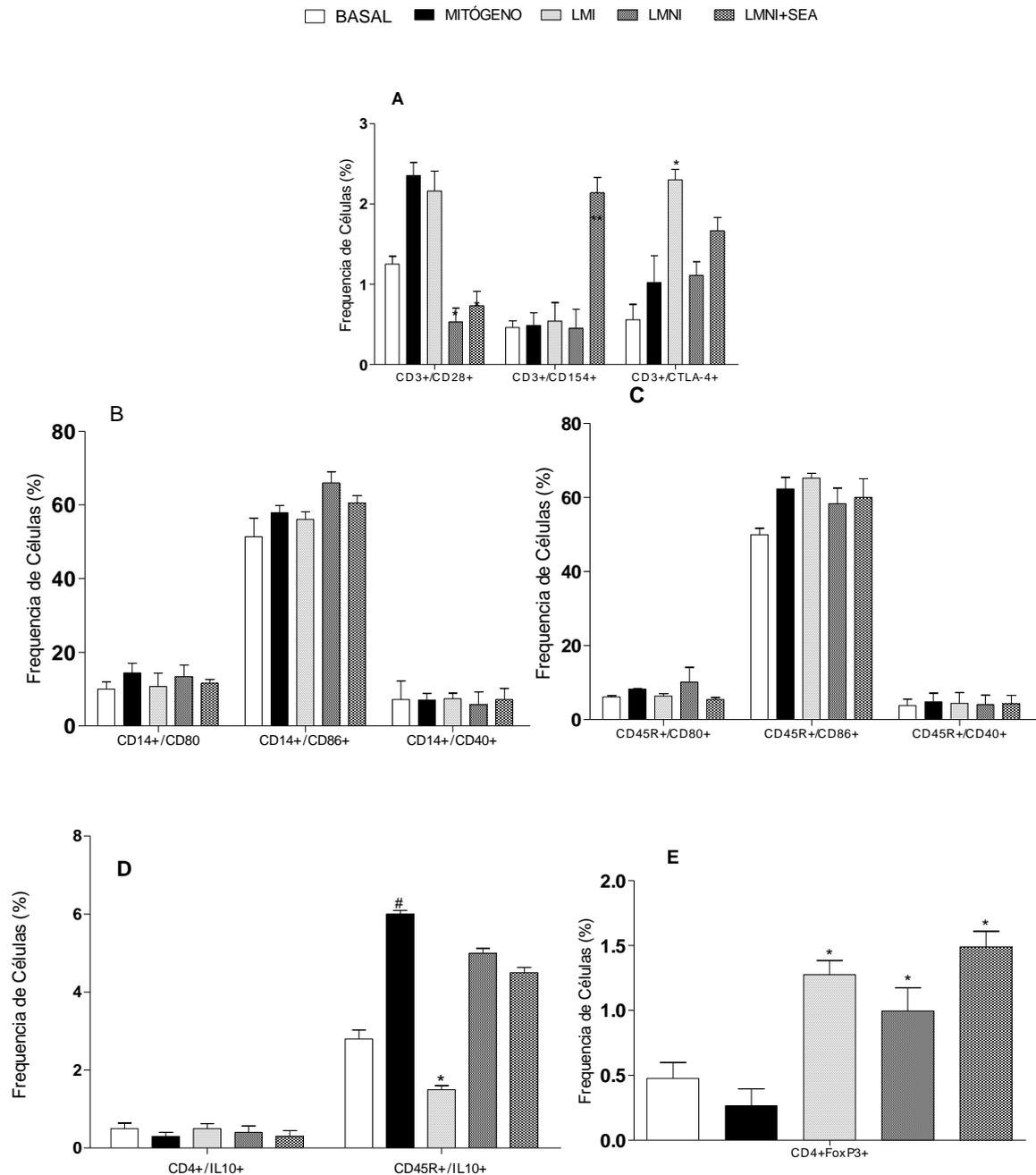


Figura 2: Caracterização fenotípica de esplenócitos maduros quando cultivados com mitógeno e com leite materno de mães infetadas ou não: Camundongos *Swiss webster* com 45 dias de vida tiveram seus baços retirados e os esplenócitos cultivados por 24h em diferentes condições: Ausência (BASAL) ou presença de estimulador policlonal (MITÓGENO) acrescido aos diferentes perfis do leite materno: Leite de Mães Infetadas pelo *S.mansoni* (LMI), Leite de Mães Não Infetadas (LMNI) e LMNI acrescido do Antígeno Solúvel do Ovo (LMNI + SEA). As células foram processadas para marcação com anticorpos conjugados a substâncias fluorescentes. O status de ativação das células (A) foi verificado através da dupla marcação de linfócitos T CD3+ (PECy5) com CD28 (PE), CD154 (PE) e CTLA4 (PE). As células Apresentadoras de Antígenos (APC's) CD14+ (FITC) (B) e CD45R+ (PECy5) (C) foram marcadas para as moléculas co-estimulatórias CD80 (PE), CD86 (PE) e CD40 (PE). Os Linfócitos T (CD3+ - PECy5) e Linfócitos B (CD45R+ - PECy5) (D) foram marcados para a citocina IL10 (PE) e os Linfócitos T regulatórios (CD4+FoxP3+) também foram avaliados (E). As células CD14+ (FITC) (D) e CD45R+ (PECy5) (E) foram marcadas para as moléculas co-estimulatórias CD80 (PE), CD86 (PE) e CD40 (PE). # p<0,05 em comparação com o BASAL. * p<0,05 em comparação com o MITÓGENO.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Fragmentos dos géis foram selecionados, excisados e analisados através da espectrometria de massa e identificados, presumidamente, para análise qualitativa das proteínas. Foram selecionadas 24 bandas (6,7,8,10,12,13,14,22,38,45,46, 50,53,57,67,68,71,74,77,79 e 80) obtidas do gel 1D baseados em análises diferenciais e com intuito de identificar peptídeos específicos em cada amostra de leite ou antígenos (Figura 3). Após o sequenciamento, foi encontrado um total de 118 peptídeos, os quais foram agrupados de acordo com sua presença nos diferentes estímulos. Observamos que 45 peptídeos ~~proteínas~~ foram detectadas no LMI, 09 no LMNI+SEA, 17 no LMNI, 31 provenientes do SEA e 16 do SWAP (dados não mostrados).

Após comparação no banco de dados Uniprot, as sequências dos aminoácidos foram identificadas e distribuídas em categorias de acordo com o seu processo biológico ou função, englobadas em: Transporte Celular, Processos Metabólicos, Estrutural, Modulação da resposta imune e Desenvolvimento/Sinalização. A tabela 1 demonstra todas as proteínas identificadas, bem como, *score*, *e-value*, peso molecular e porcentagem de identificação.

Como mostra a tabela 1, o LMNI, LMNI+SEA e o SEA apresentaram proteínas que estavam associadas a poucas características biológicas. No que se refere ao LMNI, observamos a presença de peptídeo comumente encontrado em processos estruturais (Alfa actina 3). Já para o LMNI+SEA foram identificadas proteínas relacionadas aos processos de desenvolvimento/sinalização (Alfa 1 Anti-tripsina 1-3 e Alfa 1 Anti-tripsina 1-1). No SEA, além de proteínas envolvidas com processos estruturais (Miosina 9), pôde ser encontradas proteínas envolvidas com processos metabólicos (Glutathione S-transferase).

Quanto aos antígenos parasitários, a Glutathione S transferase (GST) e o peptídeo Miosina 9 foi identificada no SEA, as quais estão relacionados com processos de desenvolvimento/sinalização. Com relação ao SWAP, a GST não foi encontrada (tabela 1). Contudo, pôde ser observado que apenas no SWAP identificamos proteínas que estavam associadas a mais de 01 característica biológica, entre elas, processos metabólicos, transporte celular e desenvolvimento/sinalização (Figura 2B).

Ao analisarmos as funções dos peptídeos presentes no LMI, verifica-se que as proteínas estão relacionadas, predominantemente, ao transporte celular, processos metabólicos, estruturais e modulação da resposta imune (Figura 2A). Destacamos a presença

das proteínas, Albumina, Serotranferrina, Alfafetoproteína, Alfa-Actina 3 e 4 e Interleucina 17F que se apresentaram exclusivamente nesse perfil de leite (Tabela 1).

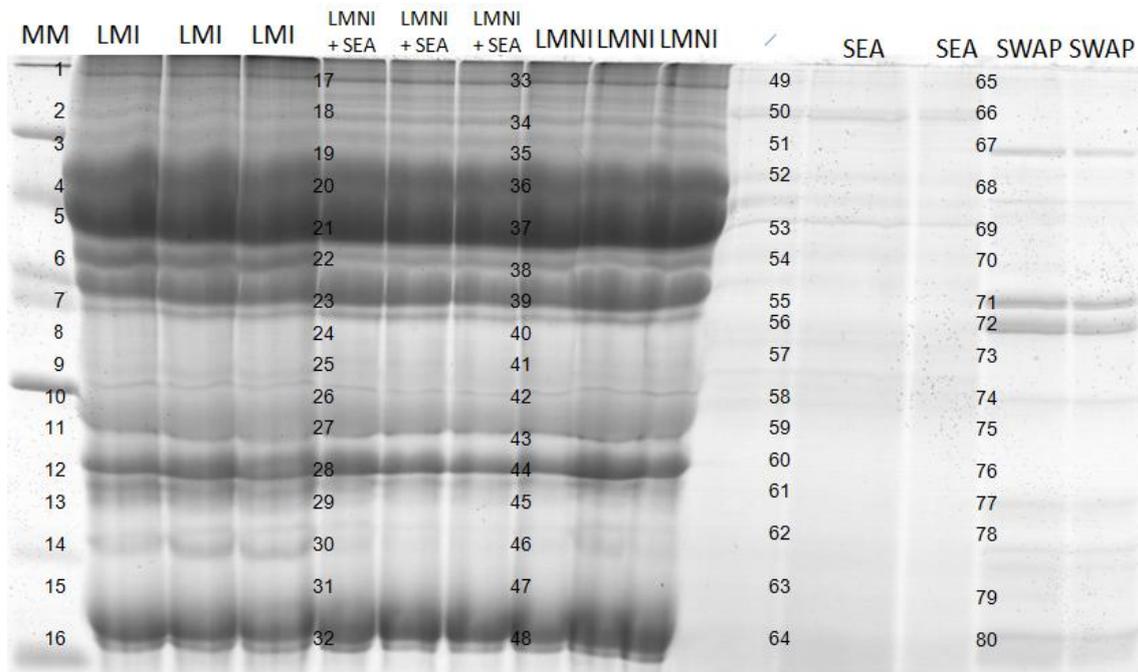


Figura 3: Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de Leite Materno de camundongos *Swiss Webster* e de antígenos parasitários do *S.mansoni*. (MM — Marcador Molecular; LMI: Leite de Mães Infectadas pelo *S.mansoni*; LMNI + SEA: Leite de Mães Não Infectadas acrescido de Antígeno Solúvel do Ovo do *S.mansoni* (SEA); LMNI; SEA; SWAP: Antígenos solúveis dos Vermes adultos; 1-80: Numeração das bandas do gel).

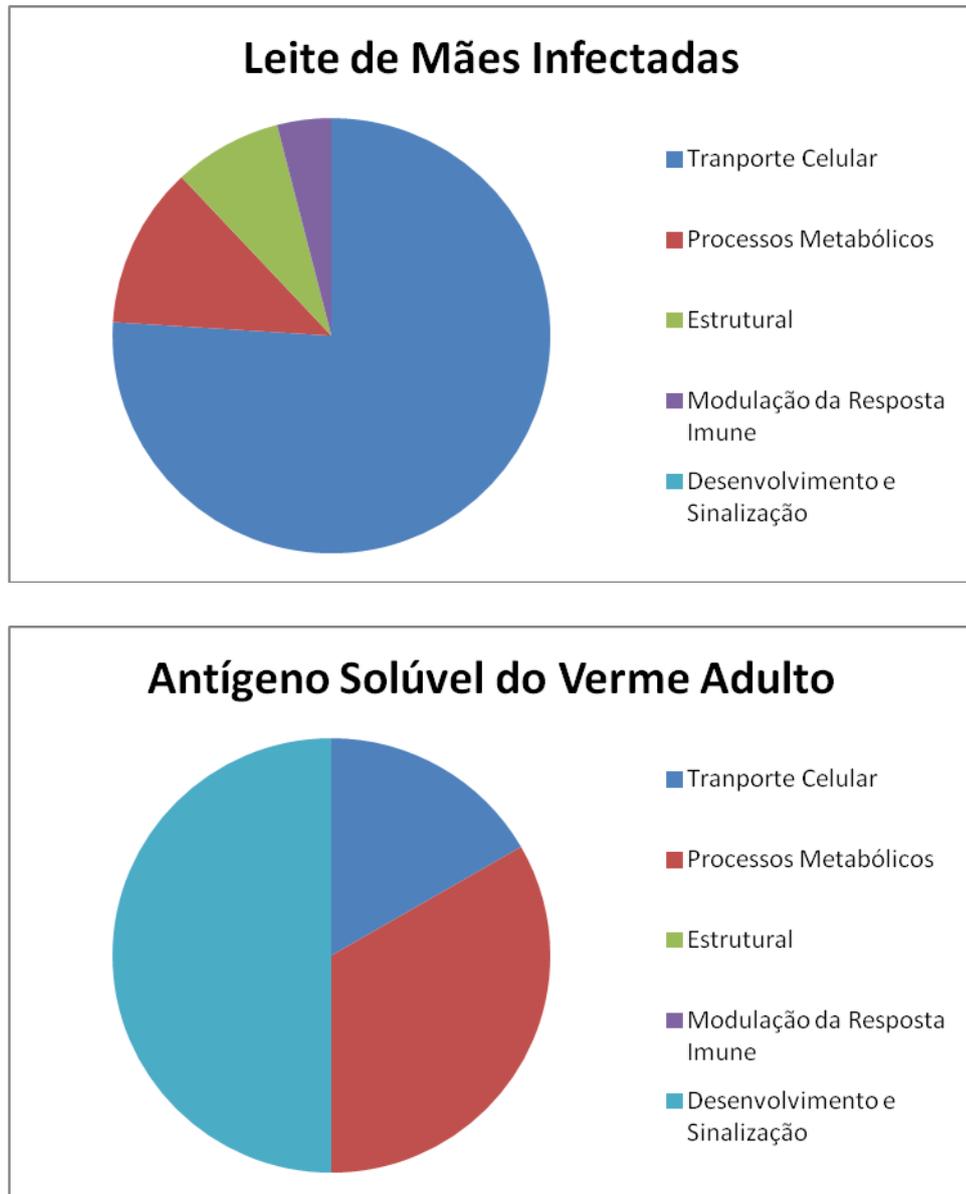


Figura 4: Anotação ontológica dos peptídeos identificados em Leite de Mães Infectadas pelo *S.mansoni* (LMI) e no Antígeno Solúvel do Verme adulto do *S.mansoni* (SWAP) utilizando a ferramenta Gene Ontology da base de dados UNIPROT

Tabela 1: Anotação presumível dos peptídios detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras de Leite Materno de camundongos *Swiss Webster* e de antígenos parasitários do *S.mansoni*. (LMI: Leite de Mães Infectadas pelo *S.mansoni*; LMNI + SEA: Leite de Mães Não Infectadas acrescido de Antígeno Solúvel do Ovo do *S.mansoni* (SEA); LMNI; SEA; SWAP: Antígenos solúveis dos Vermes adultos) contra bancos de dados (S: SwissProt; G: NCBI).

Fragmento do Gel	Peptídio	BANCO DE DADOS	Acesso	IDENTIFICAÇÃO	Anotação Presumível	Score	<i>e-value</i>	Peso Molecular	Id%
4 - LMI	AADKDTCFSTEGPNLVTR	S	ALBU_MOUSE	Albumina	Tranporte Celular	63	0.008	70700	24%
	KPVKDFASCHLAQAPNHVVVSR	S	TRFE_MOUSE	Serotransferrina	Processos Metabólicos	78	0.00027	78841	28%
	AVLTSQETLFGGSDCTGNFCLFK	G	gi 74178118	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	77	0.0034	78840	28%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	68	0.029	67013	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	S	ALBU_MOUSE	Albumina	Tranporte Celular	124	6.7e-09	70700	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26340966	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	124	7e-08	70730	26%
5 - LMI	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 163310765	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	124	7e-08	70700	26%
	MLLEYTDSSYDEK	S	GSTM1_MOUSE	Glutathiona S-transferase	Processos Metabólicos	55	0.05	26067	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 74137565	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	123	8.9e-08	70740	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	116	4.4e-07	67013	26%
	ENPTTFMGHYLHEVAR	G	gi 191765	Alfafetoproteína	Tranporte Celular	81	0.0015	48792	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	S	ALBU_MOUSE	Albumina	Tranporte Celular	63	0.008	70700	24%
6 - LMI	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	73	0.0083	67013	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26340966	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	70	0.017	70730	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 163310765	Albumina	Tranporte Celular	70	0.017	70700	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 74137565	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	70	0.017	70740	26%
7 - LMI	TVPWLENRVGEPMSAMQR	S	ACTN3_MOUSE	Alfa actina 3	Estrutural	69	0.0022	103605	18%
	TVPWLENRVGEPMSAMQR	G	gi 148701128	Alfa actina 4	Estrutural	70	0,019	100172	19%
	AGVPALQKAGNCPLEDNTVR	S	IL17F_MOUSE	Interleucina 17F	Modulação da Resposta Imune	55	0.05	18328	19%
8 - LMI	AQDKAAIQLSELEEEMDQR	S	RASEF_MOUSE	Domínio Homólogo da	Processos Metabólicos	56	0.04	71279	16%

proteína Has e EF									
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	S	ALBU_MOUSE	Albumina	Tranporte Celular	70	0.0016	70700	24%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	73	0.0083	67013	26%
14 - LMI	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26340966	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	70	0.017	70730	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 163310765	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	70	0.017	70700	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 74137565	Proteína Não Nomeada	Tranporte Celular	70	0.017	70740	26%
22 - LMNI+SEA	DQSPASHEIATNLGDFAIPLYR	S	A1AT3_MOUSE	Alfa 1 Anti-tripsina 1-3	Desenvolvimento e Sinalização	64	0,0073	45966	23%
	DQSPASHEIATNLGDFAIPLYR	S	A1AT1_MOUSE	Alfa 1 Anti-tripsina 1-1	Desenvolvimento e Sinalização	64	0,0075	46145	23%
38 - LMNI	TVPWLENRVGEPMSAMQR	S	ACTN3_MOUSE	Alfa actina 3	Estrutural	69	0,039	103605	18%
	HEMPPHIYAITDTAYRSMQDR	S	MYH9_MOUSE	Miosina 9	Desenvolvimento e Sinalização	72	0,0011	227429	10%
50 - SEA	MLLEYTDSSYDEK	S	GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase	Processos Metabólicos	55	0,05	26067	26%
	IAQLEEELEEEQGNTLIND	G	gi 28277050	Proteína Myh9	Desenvolvimento e Sinalização	73	0,0093	103452	16%
	TNFDAFPDKVAIQLNDTHPSLAIPE LMR	S	PYGM_MOUSE	Glicogenio fosforilase, Forma Muscular	Processos Metabólicos	136	4.2e-10	97681	35%
67 - SWAP	TNFDAFPDKVAIQLNDTHPSLAIPE LMR	G	gi 6755256	Glicogenio fosforilase, Forma Muscular	Processos Metabólicos	136	4.4e-09	97681	35%
74 - SWAP	FEQDTSQSMQVLVEIDQVKS	S	COG7_MOUSE	Subunidade 7 conservada do Complexo de Golgi	Tranporte Celular	63	0,008	86645	22%
	TAGEHLGVTFRVEGGELVIAR	S	MPP2_MOUSE	Membro 2 da subfamília MAGUK	Desenvolvimento e Sinalização	65	0,0058	61802	19%
77 - SWAP	TAGEHLGVTFRVEGGELVIAR	G	gi 568974714	Membro 2 da subfamília MAGUK isoforma X1	Desenvolvimento e Sinalização	66	0,045	63634	19%
79 -SWAP	LFGVSFEFCASPLNCYFR	S	PCIF1_MOUSE	fator 1 de interação CTD fosfolirado	Desenvolvimento e Sinalização	63	0.0084	81423	16%

6 DISCUSSÃO

O potencial imunomodulador do leite de mães esquistossomóticas já foi demonstrado experimentalmente (SANTOS et al., 2010; 2014; SALES et al., 2011), bem como a presença de antígenos do *S.mansoni* em crianças amamentadas em mães infectadas (ATTALLAH et al., 2003). Aqui, foi avaliado o efeito do leite materno de camundongos esquistossomóticos, *in vitro*, em células esplênicas sob ativação mitogênica, bem como a descrição da proteômica desse leite. Nestas condições, houve uma melhora da capacidade de ativação do linfócitos B e linfócitos T, principalmente em células jovens. Além disso, observamos a presença de proteínas com distintas funções biológicas que podem ser peptídios também presentes nos ovos e vermes adultos.

Embora tenhamos ciência da ausência das interações celulares e fatores solúveis que ocorre no sistema *in vivo* (JUNIOR et al., 2010), os nossos achados reiteram a importancia da amamentação e a presença de seus componetes hidrosolúveis, durante o período neonatal, que influenciam em uma resposta imune inflamatória e de produção de anticorpos que facilitam o desenvolvimento e maturação do sistema imune nos recém nascidos (FIELD., 2005; JAKAITIS;DENNING., 2014; KENT., 2007; LEVY., 2007). O número de proteínas aqui identificadas foi consideravelmente menor em comparação aos ensaios realizados com soro de indivíduos esquistossomóticos (RIBEIRO., 2012), extrato das diferentes formas evolutivas do *Schistosoma sp* (CHENG et al.,2005; CURWEN et al., 2004; LIU et al., 2006; MATHIESON;WILSON., 2011; YANG et al., 2009), leite materno humano (MANGE et al., 2008) e animal (RONCADA et al., 2012). Contudo, é comumente descrito na literatura (MURAKAMI et al., 1998; FORTUNATO et al., 2003; CAVALETTO et al., 2004) uma limitação na identificação de peptídios mesmo a partir da indentificação de elevado número de bandas, como observado em nosso estudo.

A proteômica do leite de camundongos, observado no presente estudo, nos revelou peptídeos que também já foram descritos no leite materno humano, com funções biológicas semelhantes às daqui econtradas (transporte e sinalização celular, processos metabólicos, síntese de proteínas e modulação da resposta imune) (PICARIELLO et al., 2012). A presença predominante de albumina nas bandas analisadas era esperada, visto que, esse peptídio é amplamente descrito na porção desnatada do leite materno (D'ALESSANDRO; SCALONI; ZOLLA., 2010; RONCADA et al., 2013). Além disso, dentre outras proteínas aqui encontradas, destacam-se a serotransferrina e alfa actina que também já foram descritas como

constituintes do leite materno humano (CASADO; AFFOLTER; KUSSMANN., 2009; GERMAN; DILLARD; WARD., 2002; RONCADA et al., 2013).

O cultivo de células jovens pulsadas apenas com mitógeno proporcionou o aumento de CD28+ em linfócitos T e indução da produção de IL-10 em linfócitos B, sem alterar a expressão de moléculas co-estimulatórias em APC's. A adição do leite de mães não infectadas manteve a ativação do linfócitos T, porém levou à diminuição de células Treg e aprimoramento da expressão de moléculas co-estimulatórias CD40 em linfócitos B. A ligação CD40-CD40ligante promove a manutenção da ativação das células T através da indução de maior expressão de MHCII e moléculas co-estimulatórias CD80, CD86, bem como CD40 (MA e CLARK., 2009; SUTTLES e STOUT.,2009). Desta forma, participa efetivamente da produção dos diferentes isótipos de imunoglobulinas corroborando o efeito do leite materno em melhorar a produção de anticorpos. Já o leite oriundo de mães esquistossomóticas parece melhorar ainda mais a ativação dos Linfócitos B por mecanismos/moléculas diferentes. De fato, a diminuição da frequência de Linfócitos T CD3+CTLA-4+ junto com aumento no número de Linfócitos B CD80+ pode favorecer a ligação CD28:CD80, que junto com CD28:CD86 leva a apropriada ativação e melhora a produção de anticorpos (BOUR-JORDAN., 2011; OLIVEIRA et al., 2009; RIHA E RUDD.,2010; SUTTLES e STOUT.,2009). Santos et al (2014), em um estudo *in vivo* demonstraram que a amamentação em mães infectadas pelo *S.mansoni* favorece aumento na frequência de CD40+/CD80+ em linfócitos B durante o desenvolvimento imune, corroborando nossos achados.

A proteômica do leite de camundongos infectados pelo *S.mansoni*, no presente estudo, revelou proteínas com funções distintas. A albumina foi identificada na maioria das bandas estudadas e sua presença parece ter influência não apenas da natureza do leite, mas também da infecção parasitária. Outros autores já evidenciaram a presença de um peptídeo, oriundo dos ovos desse helminto (Sm-p150/166) que continha homologia com a albumina e demonstraram, experimentalmente, uma forte resposta de células T CD4+ e citocinas do perfil Th1 e Th2 em resposta a esse peptídeo (D'ALESSANDRO; SCALONI; ZOLLA., 2010). Outro aspecto relevante foi a presença da Interleucina 17F a qual já foi associada com a produção de anticorpos (NAKAE et al., 2002; GHILARDI et al., 2004) e, portanto, pode estar relacionada à potencialização da resposta imune humoral anteriormente relatada em animais amamentados em camundongos esquistossomóticos (SANTOS et al., 2010; SALES., 2011).

Foi possível observar que parte dos componentes parasitários presentes no leite materno foi originada dos ovos e dos vermes adultos, uma vez que, identificamos a presença de proteínas no leite de mães infectadas que já foram anteriormente descritas em amostras do *S. mansoni*. Entre eles, a Glutathione S Transferase (GST), amplamente descrita na literatura como componente presente nos ovos e vermes do *S.mansoni* (MCNAIR et al., 1993; PIERCE et al., 1994; WRIGHT et al., 1991). Aqui foi identificada não apenas no leite de mães infectadas, mas também, ao analisarmos os antígenos solúveis dos ovos, onde identificamos um polipeptídeo de 26kDa, semelhantemente aos estudos de Tiu et al (1988). Mais recentemente, Curwen et al (2004) identificaram a GST (26kDa), entre as proteínas solúveis, oriundas de preparação das cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos. Diferentemente, o nosso estudo não observou esse peptídeo em extratos solúveis dos vermes adultos, o que pode ser associado às condições experimentais, entre elas o método para separação das proteínas.

Outras proteínas que merecem destaque são a Alfa actina 3 e 4 que foram identificados em amostras do leite de mães infectadas. Esses resultados sugerem a presença de constituintes parasitários no leite de mães esquistossomóticas, visto que, estudo anterior demonstrou a presença de actina em preparação das cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos (CURWEN et al., 2004). Reforçando nossos achados, Ribeiro et al (2012) em seu estudo para identificar proteínas do verme adulto que eram reconhecido nos soros de indivíduos infectados, identificou a presença de actina nessas amostras.

O SEA tem sua capacidade antigênica dependente das proteínas glicosiladas secretados ativamente pelos ovos e os produtos de sua desintegração (HORIUCHI et al., 2014; OKANO et al., 1999). Experimentos *in vitro* mostram que o SEA induz uma ativação de DC não convencional e com maturação prejudicada (PERONA-WRIGHT; JENKINS; MACDONALD., 2006; MACDONALD et al., 2001; ZACCONE et al., 2003). Realmente, ao adicionarmos o SEA junto ao cultivo de Leite de Mães Não Infectadas não houve alteração nas APC's, Linfócitos B ou Macrófagos jovens. Aqui, foi constatada uma menor capacidade de ativação dos Linfócitos T, visto que, afetou negativamente a frequência de células CD3+CD28+ (em relação ao cultivo apenas com mitogeno e outros estímulos) e aumentou em duas vezes a frequência de células CD3+IL-10+ (em relação ao cultivo com LMNI), sugerindo que embora em menor quantidade, os linfócitos T foram produtores de IL-10. De fato, os antígenos presentes nos ovos, bem como, dos vermes adultos (SWAP) tem sido demonstrados como estimuladores da produção de IL-10 e comprometidos com a redução no

número de células T CD28 (OLIVEIRA et al., 1999; ZOUAIN et al., 2004; ZOUAIN et al., 2002).

Vale à pena ressaltar que na presença do leite de mães infectadas, a inibição da proliferação de células CD3⁺/CD28⁺ pelo SEA foi restaurada e com incremento (três vezes) na produção de IL-10 por estas células (comparado ao LMNI). Estes resultados apontam que a característica de induzir IL-10 pelo leite materno de mães infectadas seja parcialmente SEA dependente. Embora o LMI apresente potencial em induzir IL-10 por linfócitos T, houve diminuição de Treg, bem como, melhor capacidade de ativação por Linfócitos B jovens podendo haver uma preservação da produção de anticorpos. Neste caso, independente do SEA.

Estudos de proteômica tem revelado que as proteínas do SEA apresentam uma ampla variedade de funções e com alvos localizados dentro e fora da célula (MATHIESON; WILSON., 2011; ASHTON et al., 2001). Semelhante a estudos anteriores, as proteínas aqui encontradas foram previamente descritas na literatura e até elencadas pela organização mundial de saúde como potentes candidatos à vacinação (CURWEN et al., 2004; RIBEIRO., 2012; CAPRON et al., 2002; CAPRON et al., 2005). No nosso estudo foi detectado a presença de 31 peptídeos em amostras de SEA submetidas à espectrometria, mas apenas 03 apresentaram significância estatística e, portanto, foram incluídas na análise. Observamos que esses peptídeos estão relacionados a processos de desenvolvimento/sinalização e com metabolismo. Entre eles, nós destacamos a presença da proteína miosina. Esse peptídeo já foi anteriormente descrito nas diferentes formas evolutivas do *Schistosoma mansoni* (CURWEN et al., 2004; MCNAIR et al., 1993; PIERCE et al., 1994; WRIGHT et al., 1991; TIU et al., 1988). Contudo, no presente estudo, não identificamos a miosina em amostras dos antígenos solúveis dos vermes adultos. Ao ser examinado a capacidade das frações SEA para estimular a proliferação de células T CD4⁺, isoladas de animais infectados pelo *S. mansoni*, não apenas a Sm-p40, mas, fosfoenolpiruvato-carboxicinase, peroxiredoxina 1, SmEP25, glutathione S - transferase e P150/166 proteínas (albumina) foram identificados. Sendo estas duas últimas aqui também observadas.

O sistema imune apresenta uma contínua maturação desde o nascimento até os primeiros anos de vida (LIAO et al., 2013; GOLDMAN; GOLDBLUM; GARZA., 1983), com aquisição de funcionalidade das células e completa capacidade de ativação após a primeira infância (BLEWETT et al., 2008; DOWLING; LEVY., 2014; JIANG et al., 2009;

WEINER., 2001). O leite materno apresenta concentração progressiva de seus componentes imunológicos à medida que a amamentação é prolongada após os seis primeiros meses (FIELD et al., 2005; GOLDMAN; GOLDBLUM; GARZA.,1983; KENT et al., 2007; WHO., 2001). Com base nestes dados, foi realizado ensaios em células maduras com intuito de verificar a influencia da idade das células sob o cultivo com Leite de Mães Infectadas.

O cultivo com mitógeno das células maduras não alterou o perfil já indentificado em células jovens (aumento de células CD3+CD28+, CD45R+/IL-10+, sem alterações nas moléculas co-estimulatórias). Diferentemente, o leite de mães não infectadas levou à menor capacidade estimulatória dos linfócitos T refletida pela menor expressão de CD28+ e maior presença de células Treg, sem alterações nas APCs. Esse fenômeno parece ser inerente ao leite materno e está de acordo com sua capacidade supressora e de tolerancia aos alimentos, ingerido na fase mais avançada pós-nascimento, e nas atopias (MELNIK; JOHN;SCHMITZ.,2014). A proteção imunológica via leite materno é atribuída ao caráter ambíguo: desenvolvimento do sistema imune e, posteriormente, indução da tolerância imunológica (LAWRENCE;PANE., 2007; ASPINALL;PRENTICE;NGOM., 2011). Por exemplo, pela ação conjunta das citocinas IL-6, IL-10 e TGF- β , envolvidas com funções imunossupressoras e tolerogênicas (BLEWETT et al., 2008; LEVY., 2007). De modo interessante, na presença do Leite de Mães Infectadas o caráter supressor parece ser mediado por linfócitos T via a molécula CTLA-4 e manutenção da elevada frequência de Treg.

A molécula CD28 proporciona os sinais essenciais para a ativação quando associados às moléculas CD80 ou CD86, entre eles, o aumento da sinalização do receptor da célula T (TCR), produção de IL-2 e sobrevivência dos linfócitos T (GREENWALD; LATCHMAN; SHARPE., 2002; CHIKUMA; BLUESTONE., 2003; ANDRES et al., 2004; MURPHY; TRAVERS; WALPORT., 2010). A menor frequência da molécula CD28, na presença do Leite de Mães Não Infectadas, poderia estar associada à menor capacidade de realizar o segundo sinal de ativação dos Linfócitos T. Em contrapartida, o leite de mães infectadas pode favorecer a ligação CTLA-4:CD80/CD86 que induz sinais intracelulares inibitórios. Esse efeito é evidenciado em fenótipo de camundongos deficientes de CTLA-4, o quais desenvolvem uma doença linfoproliferativa fatal (WATERHOUSE et al., 1995) e a presença e função de células Tregs são cruciais para prevenção de autoimunidades (SCHMIDT et al., 2009; GARDNER;JEFFERY; SANSOM., 2014). Além disso, já foi evidenciado que a expressão de CTLA-4 e repressão da expressão de IL-2 são dois componentes essenciais para conferir o fenótipo de Tregs (YAMAGUCHI et al., 2013). Em células maduras, o SEA, embora não leve

à melhora da expressão CD28, levou ao ótimo aumento na frequência de células CD3+CD154+. Neste cenário, estes achados nos levam a crer numa compensação da co-estimulação reduzida via CD28 pelo LMNI, caso seja acrescentado de SEA.

Com relação aos Linfócitos B, o Leite de Mães Infectadas levou a uma drástica diminuição destas células produtoras de IL-10. Esse achado reitera o carácter supressor do LMI apenas sob o Linfócito T, visto que há tendência à melhorar a resposta de células B. É possível que ocorra um inibição da geração de Linfócitos B regulatórios, conhecido pela produção de IL-10 (MIN YANG et al., 2013; YAN SHAO et al., 2014). Aqui, a adição do SEA ao leite de mães não infectadas, reestabelece a frequência de Linfócitos B maduros produtores de IL-10. Este resultado corrobora o fato de que antígenos do verme são indutores de IL-10-producing B cells (MANGAN et al., 2004; AMU et al., 2010).

Em conjunto, este estudo confirma o efeito dicotômico, estimulador e tolerogênico do Leite de Mães Não Infectadas. Esse fenômeno parece ser mediado pela maior ativação dos Linfócitos B no início da vida e indução de um perfil de linfócitos T controlador quando atinge a maturidade, caracterizando a importância da amamentação prolongada na homeostase e prevenção de doenças auto-imunes e alergias (VAN ODJIK et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2003). O Leite de Mães Infectadas parece apresentar este efeito dicotômico maturidade celular dependente, porém, por mecanismos moleculares diferentes, favorecendo e garantindo melhora da resposta imune humoral, através de uma modulação positiva no Linfócito B. Destacamos a natureza imunomodulatória dos peptídios aqui identificados, que podem atuar na imunidade, seja para antígenos do parasita ou heterólogos, no descendente previamente amamentado.

Embora, a extrapolação de dados obtidos em estudos com animais e *in vitro* para os seres humanos devam ser avaliados cuidadosamente, esses achados são relevantes em áreas endêmicas para esquistossomose e reiteram a importância da identificação e caracterização de antígenos parasitários, bem como uma avaliação do seu papel na interação parasito-hospedeiro para uma melhor compreensão dos eventos imunoreguladores.

CONCLUSÕES DA TESE

8 CONCLUSÕES DA TESE

Em células jovens:

- O leite materno propicia uma responsividade dos Linfócitos T através da maior expressão de CD28, menor frequência de Treg e maior expressão de CD40 em linfócitos B.
- A infecção materna favorece a ativação dos linfócitos B jovens em decorrência da maior frequência de CD80, menor número de células CD3+CTLA-4+ e CD4+IL10+.
- A adição de antígeno parasitário ao leite materno altera o *status* de ativação dos Linfócitos T e favorece menor número de células CD3+CD28+ e maior presença de CD4+IL10+.

Em células maduras:

- Observa-se um carácter controlador do leite materno através da diminuição de linfócitos CD3+CD28+ e aumento de Treg.
- A infecção materna parece intensificar esse carácter controlador, uma vez que, aumenta a presença de células CD3+CTLA-4+ induz aumento sustentado de Treg.
- A adição do SEA ao Leite de Mães Não Infecadas leva à uma redução importante das células CD3+CD28+, embora aumente consideravelmente a presença do CD40L e células Tregs.
- A análise dos peptídeos presentes no leite materno revela que a infecção parasitária é capaz de induzir a presença de peptídeos originados do *S.mansoni* com ampla função, entre elas, atuações em Transporte Celular, Processos Metabólicos, Estrutural, Modulação da resposta imune e Desenvolvimento/Sinalização.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATH, F.G.C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends parasitol.** v. 22, n. 2, p. 85–91. 2006.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade regional: respostas imunes especializadas em tecidos epiteliais e imunoprivilegiados. **Imunologia Celular e Molecular**, 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 13, p. 293- 317. 2012.
- ADKINS, B. Development of neonatal TH1/TH2 function. **Int. rev. immunol.** v. 19, n.2-3, p.157–171. 2000.
- ADKINS, B.; LECLERC, C.; MARSHALL-CLARKE, S. Neonatal adaptive immunity comes of age. **Nat. rev. immunol.** v. 4, p. 553–564. 2004.
- AKKOC, T. et al. Transfer of T cells from intranasal ovalbumin-immunized mice ameliorates allergic response in ova-sensitized recipient mice. **Allergy asthma proc.** v. 29, n. 4, p. 411–416, 2008.
- AMU S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **J. allegy. clin. immunol.** v.125. p.1114-1125. 2010.
- ANDRADE, Z.A. Schistosomal hepatopathy. **Men. inst. oswaldo cruz.** v. 99, n. 1, p. 51-57. 2004.
- ANDRES, P.G. et.al. Distinct regions in the CD28 cytoplasmic domain are required for T helper type 2 differentiation. **Nat. immunol.** v. 5.p.435-442. 2004.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. **Arthritis res. ther.** v. 11, n. 6, p.1-8. 2009.
- APPELMELK, B. 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.**, Baltimore, v. 70, n. 4, p. 1635-1639. 2003.
- ASPINALL, R; PRENTICE, A.M; NGOM, P.T. Interleukin 7 from Maternal Milk Crosses the Intestinal Barrier and Modulates T-Cell Development in Offspring. **PLoS ONE.** V.6.p. 1-7, 2011.
- ASAHI, H.; STADECKER, M.J. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. **Parasitol int.** v. 52, n. 4, p.361-367. 2003.
- ASHTON P. et al.. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology.** v.122, p.329–338. 2001.
- ATTALLAH, A.M. et al. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **J. trop. med. hyg.** 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. **J. parasitol. res.** v. 99, n. 2, p. 137–145, 2006.

- BARBOSA, C. S. et al.. Epidemiologia da esquistossomose no litoral de Pernambuco. **Rev Patol Trop.** v. 43,n. 4, p.436-445, 2014.
- BALLARD, O.; MORROW, A.L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. **Pediatr. clin. n. am.** v. 60, n.1, p. 49–74. 2013.
- BARSOUM, R.S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: Clinical perspective. **J. advanc. res.** v. 4, n.5, p.433-444. 2013.
- BATISTA, R.S.; SANTOS, S.S.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansoni. **Revista da Faculdade de Medicina de Teresópolis.** v. 3, n.2, p. 21-33. 2001.
- BAUMGART, M.et.al. Naturally occurring CD4 +Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. **J. immunol.** v. 176, n.9, p. 5374–5387. 2006.
- BENSCHOP, R.J. et.al. Unique signaling properties of B cell antigen receptor in mature and immature B cells: implications for tolerance and activation. **J. Immunol.**v. 167, n.8, p. 4172–4179. 2001.
- BHARGAVA, P. et.al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. **Nat. med.** v.18, n.11, p. 1665-1672.2012.
- BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Travel Med. Infect. Dis.** v. 2, n.1, p.05-11, 2004
- BLEWETT, H.J.H.; CICALO, M.C.; HOLLAND, C.D.; et al. In:_____The immunological components of human milk. **Adv. Food Nutr. Res.** v. 54, p. 45-80. 2008.
- BOISE, L.H. et. al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-x. **Immunity** . v.3, n. 1, p. 87-98. 1995.
- BOUR-JORDAN, H. et.al. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. **Immunol. rev.** v. 241, n. 1, p.180- 205. 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em doenças transmissíveis. Plano Integrado de ações estratégicas de eliminação de hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. 1ª Ed., 1. Reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BRASCHI, S.; WILSON, R.A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. **Mol. cell proteomics.** v. 5, p.347-356. 2006.
- BRUNET, L. R. et al. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **J. immunol.** v. 159, n. 2, p. 777–785. 1997.

- BURGLER, S. et al. Differentiation and functional analysis of human T (H) 17 cells. **J. allergy clin. immunol.** v. 123, n. 3, p. 588-595. 2009.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite immunol.** v. 31, n. 4, 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, n. 2-3, p. 109-117, 2008.
- CARRIER, Y. et al. Evaluation of circulating antigens by sandwich radioimmunoassay and of the antibodies and immune complexes in *Schistosoma mansoni* infected Africans parturants and their newborn children. **Am. j. trop. med. hyg.** v. 29, n. 1, p. 74-81. 1980.
- CARRENO, B.M.; COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses. **Annual Review of Immunology.** v. 20, p.29-53. 2002
- CASS, C.L. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* eggs secretion. **Mol. biochem. parasitol.** v.155, n. 2, p.84-93. 2007.
- CASADO, B; AFFOLTER, M; KUSSMANN, M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. **J. proteomics.** v.73. p. 196-208. 2009.
- CAPRON, A; CAPRON, M; RIVEAU, G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. **Br. mes. bull.** v. 62. p. 139-148. 2002.
- CAPRON, A; RIVEAU, G; CAPRON, M. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends parasitol.** v. 21. p.143-149. 2005.
- CASTRO-BORGES, W et.al. The 20S proteasome of *Schistosoma mansoni*: a proteomic analysis. **Proteomics.**v. 7, n.7, p.1065-75. 2006.
- CASTRO-BORGES, W. et.al. Enzymatic shaving of the tegument surface of live schistosomes for proteomic analysis: a rational approach to select vaccine candidates. **PLoS negl. trop. dis.** v.5, n.3, p. 1-11. 2011a.
- CASTRO-BORGES W.et.al. Abundance of tegument surface proteins in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* determined by QconCAT proteomics. **J. proteomics.** v. 74, n. 9, p. 1519-1533. 2011b.
- CHAMBERS, C.A.; SULLIVAN, T.J.; ALLISON, J.P. Lymphoproliferation in CTLA-4-Deficient Mice Is Mediated by Costimulation-Dependent Activation of CD4+ T Cells. **Immunity.** v7, n. 6, p. 885–895.1997
- CHENG, G.F. et.al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. **Proteomics.** v. 5, n.2, p. 511-521. 2005.
- CHIKUMA, S; BLUESTONE, J.A. CTLA-4 and tolerance: The biochemical point the view. **Immunol. res.** v. 28. p.241-253.2003.
- 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.

- COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. inst. Oswaldo cruz.** v. 99, n.1, p.13-19. 2004.
- CURWEN RS, ASHTON PD, JOHNSTON DA & WILSON RA. The Schistosoma mansoni soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. **Mol. biochem. parasitol.** v. 138, n.1, p. 57-66. 2004.
- CURWEN, RS. et.al. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Mol. cell proteomics.** v.5, p.835-844. 2006.
- DOWLING, D.J.; LEVY, O. Ontogeny of early life immunity. **Trends immunol.** v. 35, n.7, p.299-310. 2014.
- DAKIC, A. et al. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. **J. immunol.** v. 172, n. 2, p. 1018–1027. 2004.
- D'ALESSANDRO, A; SCALONI, A; ZOLLA, L. Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview. **J. proteome res.** v. 9. p. 3339–3373. 2010.
- EISSA, A.M. et al. Transmission of lymphocyte responsiveness to schistosomal antigens by breast feeding. **Trop. geogr. med.** v. 41, n. 3, p. 208-212. 1989.
- ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta trop.** v. 82, n.2, p. 139–146, 2002.
- FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunol. today.** v. 21, n. 1, p. 29–35, 2000.
- FINKELMAN, F.D. et al. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. **Immunol. today.** v. 12, n. 3, p. 62-66. 1991.
- FIELD, C.J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. **J. nutr.** v. 135. p. 1-4. 2005.
- FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. exp. med.** v. 170, n. 6, p. 2081–2095.1989.
- FONSECA, F. et.al. Spatial modeling of the schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. **Acta trop.** v.133, p. 56–63. 2014.
- FORSTHUBER, T.; YIP, H.C.; LEHMANN, P.V. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science.* v. 271, n.5256, p.1728-1730. 1996.
- FUSARO, A.E.; BRITO, C.A.; VICTOR, J.R.; et al. Maternal–fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. **Immunology.** v. 122, n. 1, p. 107-115. 2007
- FRIEDMAN, J.F. et al. Schistosomiasis and pregnancy. **Trends parasitol.** v. 23, n. 4, p. 159-164. 2007.

- GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J. immunol.** v. 140, n. 12, p. 4245–4252. 1988.
- GARCIA, A. M. et al. T cell immunity in neonates. **Immunol. Res.** v 22, p.177–190. 2000.
- GARDNER, D; JEFFERY, L.E; SANSOM, D.M. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) Pathway and Its Implications for Costimulatory Blockade. **American j. Transpl.** v.14. p. 1985- 1991. 2014.
- EGINAT, J. et al. The CD4-centered universe of human T cell subsets. **Semin Immunol.** v.25. n.4,p.:252-62. 2013. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.012
- GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. exp. med.** v. 197, n. 1, p. 7-17, 2003.
- GHILARDI, N. et.al. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23- deficient mice. **J. immunol.** v. 172, p.2827-2833. 2004.
- GAZZINELLI, G., KATZ, N., ROCHA, R.S., COLLEY, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. **J Immunol.**v.130.p 2891-2895. 1983.
- GERMAN, J.B; DILLARD, C.J; WARD, R.E. Bioactive components in milk. **Curr. opin. clin. nutr. metab. care.** v.5. p. 653-658.2002.
- GRYSEELS, B. et al. Human Schistosomiasis. **Lancet.** v. 368, n.9541, p.1106-1118, 2006.
- GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. dis. clin. north. am.**v. 26, p. 383–397.2012.
- GOLDMAN, A.S; GOLDBLUM, R.M; GARZA, C. Immunologic components in human milk during the second year of lactation. **Acta paediatr. scand.** v.72.p.461-462. 1983
- GUILLOU, F. et.al. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. **Mol. biochem. parasitol.** v.155, p. 45-56. 2007.
- HAGAN, P.; NDHLOVU, P.D.; DUNNE, D.W. Schistosome immunology: more questions than answers. **Parasitol. today.** v.14, n.10, p. 407-412, 1998.
- HANSELL, E. et.al.. Proteomic analysis of skin invasion by blood fluke larvae. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** v.2, e262.2008.
- HARRINGTON, L. E. et.al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat. immunol.** v.6, p. 1123-1132. 2005.
- HASSAN, M. et al. Transmission of circulating schistosomal antigens from infected mothers to their newborns. **J. egypt soc. parasitol.** v. 27, n. 3, p. 773-780. 1997.
- HECTOR, J. et al. In Infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T Helper Type 2 Cell responses but not for granuloma formation. *The Journal of Immunology.* V.158.p.4832-4837. 1997.

- HESSE, M. et.al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J. immunol.** v. 172, p. 3157-3166. 2004.
- HEWITSON, J.P.; GRAINGER, J.R.; MAIZELS, R.M. Helminth immunoregulation; The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Mol. biochem. parasitol.** v. 167, n.1, p1-11.2009.
- HILLIER, S.D. et.al. *Plasmodium falciparum* and Helminth Coinfection in a Semiurban Population of Pregnant Women in Uganda. **J. inf. dis.** v. 198, p. 920-927. 2008.
- 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.
- HORIUCHI, K. et. al. Analysis of somatic hypermutations in the IgM switch region in human B cells . **J. allergy. clin. immunol.** v.134.p.411-419. 2014.
- HOLT, P.G.; JONES. C.A. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy.* v.55, n.8, p.688-697. 2000.
- HUANG, H. et.al. Effect of interferon beta-1a on B7.1 and B7.2 B-cell expression and its impact on T-cell proliferation. **J. Neuroimmunol.** v. 258, p.27–31. 2013.
- JAKAITIS, B.M; DENNING, P.W. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. **Clin. perinatal.** V.41.p.423–435. 2014.
- JENKINS, S.J.; PERONA-WRIGHT, G.; MACDONALD, A.S. Full Development of Th2 Immunity Requires Both Innate and Adaptive Sources of CD154. **J. immunol.** v. 180, p. 8083-8092. 2008.
- JIANG, H. et.al. Differential gene expression signatures of adult peripheral blood vs cord blood monocyte-derived immature and mature dendritic cells. **Exp. Hematol.** v.37, p.1201–1215. 2009.
- JUNIOR, D.M. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol.** v. 50, n. 5, p. 552-580. 2010.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stoll thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo,* v. 14, p. 397-400, 1972.
- KENT, J. How Breastfeeding Works. **J. midwifery womens health.** v.52, n. 6. 2007.
- KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6 regulator of Treg/Th17 balance. **Eur. j. immunol.** v.40, n.7, p. 1830-1835. 2010.
- KING, C.L. Initiation and regulation of disease in schistosomiasis. In: MAHMOUD, A.A Schistosomiasis. **Imperial College Press.** p. 213–264. 2001.

- KING, L.B.; NORVELL, A.; MONROE, J.G. Antigen receptor induced signal transduction imbalances associated with the negative selection of immature B cells. **J. immunol.** v.162, p. 2655–2662. 1999.
- KNUDSEN, G.M. et.al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. **Mol. cell proteomics.** v.4, p.1862-1875.2005.
- LABEAUD, A. D. et.al. Do Antenatal Parasite Infections Devalue Childhood Vaccination? **PLoS neglec trop. dis.** v.3, p.1-6. 2009.
- LAWRENCE, R.M; PANE, C.A. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Pediatr. adolesc. health care.* v.37. p.1-36. 2007.
- LEES, R.EM.; JORDAN, P. Tranplacental transfer of antibodies to *Schistosoma mansoni* and their persistence in infants. **Trans. r. soc. top. med. hyg.** v. 62, n. 5, p. 630-631. 1968.
- LEVY, O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. **Nat. rev. immunol.** v.7.p. 379-390. 2007.
- LENZI, J.A. et al. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Mem. inst. oswaldo cruz,** v. 82, n. 4, p. 257-267. 1987.
- LEME, A.S. et al. Role of breast milk in a mouse model of maternal transmission of asthma susceptibility. **J Immunol.** v.176, n. 2, p. 762-769. 2006.
- 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.b
- LIU, F. et.al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. **PLoS. pathog.** v.2, n.4, p.0268-0281. 2006.
- LIU, K. et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. **Science.** v. 324, n.5925, p.392-397. 2009.
- LIAO, S et al. Maturation of Toll-like receptor 1–4 responsiveness during early life. *Early hum. develop.* V.89.p.473–478. 2013.
- GREENWALD, R.J; LATCHMAN, Y.E; SHARPE, A.H. Negative co-receptors on lymphocytes. **Curr. opin. immunol.** v.14.p.391-396. 2002.
- MA, D.Y.; CLARK, E.A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Semin. immunol.** v. 2, p.265-272.2009.
- MBOW, M. et.al. T-Helper 17 Cells Are Associated With Pathology in Human Schistosomiasis. **J. infect. Dis.** v. 207. p.186-195. 2013.doi: 10.1093/infdis/jis654.
- MACAGNO, A. et al. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. **Trends immunol.** v. 28, n.5, p. 227-233. 2007.
- MACDONALD, A.S et al. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **J. Immunol.** v.167. p.1982–1988.2001.

- MACDONALD, A.S. et al. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. **J. immunol.** v.168, p. 4643-4649. 2002.
- MALANCHÈRE, E.; HUETZ, F.; COUTINHO, A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. **Eur. j. immunol.** v.27, p.788-793.1997.
- MCNAIR, A.T. et al. Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. **Gene.** v.124.p.245-249. 1993.
- MALHOTRA, I. et al. In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. **J. clin. invest.** v. 99, n. 7, p.1759–1766. 1997.
- MARSHALL-CLARKE, S.ET.AL. Neonatal immunity: how well has it grown up? **Immunol. today.** v. 21, p.35–41.2000.
- MARSHALL-CLARKE, S.; TASKER, L.; PARKHOUSE, R. M. Immature B lymphocytes from adult bone marrow exhibit a selective defect in induced hyperexpression of major histocompatibility complex class II and fail to show B7.2 induction. **Immunology.** v.100, p. 141–151.2000.
- MATHIESON, W.; WILSON, R.A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **Int. j. parasitol.** v. 40, p. 617-628. 2011.
- 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. 1224-123. 2004.
- MANGE, A. et al. Comprehensive proteomic analysis of the human milk proteome: Contribution of protein fractionation. **J. chromatogr.;** v.876.p.252-25615. 2008
- MANGAN, N.E. et al. Helminth Infection Protects Mice from Anaphylaxis via IL-10-Producing B Cells. **J. immunol.** v.173,p .6346-6356. 2004.
- MELNIK, B.C.; JOHN, S.M.; SCHMITZ, G. Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy? **J. trans. med.** v.12, p. 1-11. 2014
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: nutrição infantil: aleitamento materno e alimentação complementar / Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: 2009, 833–843.
- MIN YANG. et al. Regulatory B cells in autoimmune diseases. **Cellular & Molecular Immunology.** v. 10, p. 122–132 .2013.
- 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.

- MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **An. rev. immunol.** v. 19, p. 683-765. 2001.
- MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine.** v. 28, n. 3, p. 2–13. 2010.
- MORIYA, H et al. Secretion of three enzymes for fatty acid synthesis into mouse milk in association with fat globules, and rapid decrease of the secreted enzymes by treatment with rapamycin. **Arch Biochem Biophys.** 2011; v.1, n.508(1), p. 87-92.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway.* 7ª edição. **Artmed.** 2010.
- MUTHUKKUMAR, S.; GOLDSTEIN, J.; STEIN, K. E. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. **J. immunol.** v.165, p.4803–4813. 2000.
- NAKAE, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. **Immunity.** v. 17, n. 3 , p. 375-387. 2002.
- NEVES, D. et al. Parasitologia Humana. In: MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni e a doença.* Atheneu, São Paulo: 13ª ed., p. 193-212. 2007
- NIZAR, S. et al. T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. **Biochim. biophys. acta.** v. 1806, n. 1, p. 7–17. 2010.
- 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, n. 2, p. 539-550. 1998.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. rev. immunol.** v. 2, n. 7, p. 499–511. 2002.
- O'DONNELL, R. Milk proteomics. **Int. dairy j.** v.14, p.1013–1023. 2004.
- OKANO, M. 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, p. 6712–6717. 1999.
- OLIVEIRA, D.M. Nitric Oxide and IL-10 Production Induced by PIII- A Fraction of *Schistosoma mansoni* Adult Worm Antigenic Preparation-Associated with Downregulation of in Vitro Granuloma Formation. **Hum. immunol.** v. 60, p. 305–311. 1999.
- OLIVEIRA, R.R. et.al. *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. **Microbes infect.** v.11, p.223-229. 2009.
- OTHMAN, A.A. et al.; Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiology.** v. 215, n. 2, p. 101-112, 2010.
- 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, n. 1, p. 159-166, 1991.
- PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nat. rev. immunol.** v. 2, n. 7, p. 499–511.2002.

- PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite. immunol.** v. 27, n. 7-8, p. 265–270. 2005.
- PEREIRA, A.P.B. et al. The prevalence of schistosomiasis in school-aged children as an appropriate indicator of its prevalence in the community. **Mem. inst. Oswaldo cruz.** v. 105, n. 4, p. 563-569. 2010.
- PEREZ-SANCHEZ, R. et.al. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. **Proteomics.** v.6, suppl 1, p. S226-S236. 2006.
- PETERS, A.; LEE, Y.; KUCHROO, V. K. The many faces of Th17 cells. **Curr. opin. allergy. clin. immunol.** v. 23, n. 6, p. 702–706, 2011.
- PERONA-WRIGHT, G.; JENKINS, S.J.; MACDONALD, A.S. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. **Int. j. parasitol.** v.36, p.711–721. 2006
- PICARIELLO, G. et al. Gel-free shotgun proteomic analysis of human milk. **J.Chromatogr.;** v.1227,p .219–233. 2012.
- PIERCE, R.J. et.al. *Schistosoma mansoni*: Characterization of Sequence Variants of the 28-kDa Glutathione S- Transferase. **Exp. parasitol.** v.79, p.81–84. 1994.
- GARVY, B. A.; QURESHI, M. H. Delayed inflammatory response to *Pneumocystis carinii* infection in neonatal mice is due to an inadequate lung environment. **J. immunol.** v.165, p.6480–6486.2000.
- REINER, S.L. Development in Motion: Helper T cells at Work. **Cell.** v. 129, n.1, p. 33-36. 2007.
- RIDGE, J. P.; FUCHS, E. J.; MATZINGER, P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. **Science.** v. 271, p. 1723–1726.1996.
- RIHA, P.; RUDD, C.E. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. **Self Nonself .** v. 1, p. 231–240. 2010.
- RIBEIRO, FERNANDA LUDOLF. **Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* através de análises do proteoma sorológico.** Belo Horizonte: 2012. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências concentração em Biologia Celular e Molecular)-Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2012
- RODRIGUES, M.N. et al. History of breastfeeding and *Helicobacter pylori* infection in children: results of a community-based study from northeastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 100, n. 5, p. 470-475. 2006.
- RONCAROLO, M.G.et al. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. rev.** v. 212, p. 28–50. 2006.
- RONCADA, P. et al. Farm animal milk proteomics. **J. proteome.** v.75, p.4259–427. 2012.
- ROSS, A.G. et al. Schistosomiasis. **N. engl. j. med.** v. 346, p. 1212–1220. 2002.

RUTITZKY, L.I.; LOPES DA ROSA, J.R.; STADECKER, M.J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **J. immunol.** v. 175, p. 3920-3926. 2005.

SALAWU, O.T.; ODAIBO, A.B. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. **Int. j. gynaecol. obstet.** v.122, p.1-4. 2013.

SALES, IANA RAFAELA FERNANDES. **Cinética de produção de anticorpos anti-ovalbumina em camundongos adultos sensibilizados com antígenos do *Schistosoma mansoni* na fase de amamentação.** Recife: 2011. 85 folhas. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco.

CHATENOUD, L.; SALOMON, B.; BLUESTONE, J.A. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity. **Immunol Rev.** v. 182, p.149-163. 2001.

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.

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.

SANTOS, P.D'EMERY A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **J. parasitol. res.** v. 107, n. 1, p. 95–102, 2010.

SANTOS, P. D'EMERY A. et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. **Exp. parasitol.** v. 141, p. 62–67, 2014.

SCHEER, S. et.al. A novel tool to identify the relative contribution of lymphoid cell types that contribute to IL-10 production during the infection with *Schistosoma mansoni*. **J. immune. methods.** v.406, p.66-73. 2014.

SCHRAMM, G.; HAAS, H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. **Microbes infec.** v. 12, n. 12-13, p. 881-888. 2010.

SCHMIDT, E.M. et.al. CTLA-4 Controls Regulatory T Cell Peripheral Homeostasis and Is Required for Suppression of Pancreatic Islet Autoimmunity. **J. immunol.** v.182,p.274-282. 2009.

SEDER, R. A. et al. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc. natl. acad. sci.** v. 90, n. 21, p. 10188–10192, 1993.

SHIPKOVA, M.; WIELAND, E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. **Clin. chim. acta.** v. 413, p.1338–1349. 2012.

SIEGRIST, C. A. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine.** v. 19, n. 25-26, p. 3331–3346, 2001.

- SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiol. serv. saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 327-336, 2011.
- 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. 571-4. 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.
- STEINMAN, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat. med.** v. 13, n. 2, p. 139–145, 2007.
- STEINMANN, P. et al. J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet. infect. dis.** v. 6, n.7, p. 411–425. 2006.
- SUTTLES, J.; STOUT, R.D. Macrophage CD40 signaling: A pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. **Semin. immunol.** v.21, p.257-264. 2009.
- SUI-LING, L. et.al. Maturation of Toll-like receptor 1–4 responsiveness during early life. **Early hum. dev.** v. 89, n.7, p. 473–478. 2013.
- SUN, C. M. et al. Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. **Blood.** v.102, p.585–591. 2003.
- TALLIMA, H. et al. Transforming growth factor- β and Th17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis mansoni. **Cytokine.** v. 48, n. 3, p. 239-245. 2009.
- TIU, W.U. et al. Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. **Parasite immunol.** v.10,p.693-706. 1988.
- THOMAS, P.G.; HARN, D.A. Jr. Immune biasing by helminth glycans. **Cell. microbiol.** v. 6, n. 1, p. 13-22. 2004.
- THOMAS, P.G.; HARN, D.A. Immune biasing by helminth glycans. **Cell. microbiol.** v. 6, p.13-22. 2005.
- UTZINGER, J.et al. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta trop.** v.120, suppl. 1, p, S121-S137. 2010.
- VAN BALKOM, B.W. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **J. Proteome. Res.** v. 4. p. 958-966. 2005.
- VAN HELLEMOND, J.J.; VAN BALKOM, B.W.M.; TIELENS, A. G.M. Schistosome biology and proteomics: Progress and challenges. **Exp. parasitol.** v.117, n.3, p,267-274. 2007.
- VAN LIEMPT, E. et al. *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.** v. 44, n. 10, p. 2605–2615. 2007.

- VAN ODJIK, J. et.al. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. **Allergy**. v.58, p.833-843. 2003.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; DEMARCO, R. Current developments on Schistosoma proteomics. **Acta trop.** v.108, p.183-185. 2008.
- VIEIRA, P.L. et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells1. **J. Immunol.** v. 172, n. 10. p. 5986-5993. 2004.
- WAKKACH, A. 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. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 809–816, 2001.
- WATERHOUSE, P. et al. Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in *CTLA-4*. **Science**. v. 270, p. 985-988. 1995.
- WEINER, H.L. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. **Nat. Immunol.** v. 2, n. 8, p. 671-672. 2001
- WILLEMS, F.; VOLLSTEDT, S.; SUTER, M. Phenotype and function of neonatal DC. **Eur. J. immunol.** v.39, p. 26–3. 2009.
- WILSON, M.S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell. Biol.** v. 85, n. 2, p. 148–154. 2007.
- WHO (World Health Organization) The optimal duration of exclusive breastfeeding. 2001
- WU, Q. et al. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Microbes Infect.** v. 9, n. 1, p. 78–86. 2007.
- WYNN, T. A. et al. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J. immunol.** v. 160, n. 9, p. 4473–4480.1998.
- YAMANE, H.; PAUL, W. E. Cytokines of the $\gamma(c)$ family control CD4+ T cell differentiation and function. **Nat. immunol.** v. 13, n. 11, p. 1037–1044, 2012.
- YANG, L.L. et.al. Schistosoma japonicum: proteomics analysis of differentially expressed proteins from ultraviolet-attenuated cercariae compared to normal cercariae. **Parasitol. res.** v.105, p. 237-248. 2009.
- YAMAGUCHI, T. et.al. Construction of selfrecognizing regulatory T cells from conventional T cells by controlling CTLA-4 and IL-2 expression. **Proc. natl. acad. sci.**; v.110,p.2116–2125. 2013
- YAN SHAO, et al. Regulatory B cells accelerate hepatocellular carcinoma progression via CD40/CD154 signaling pathway. **Cancer Letters**. v.355. n.2, p. 264–272.

ZACCONE, P. et al. Immune Modulation by *Schistosoma mansoni* Antigens in NOD Mice: Effects on Both Innate and Adaptive Immune Systems. **J. biomed. biotechnol.** v. , p.1-9. 2010.

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. n.5, p.1439-1449.2003.

ZOUAIN, C.S. et al. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans. **Immunol. lett.** v.91,p. 113–118. 2004.

ZOUAIN, C.S. et.al. Human Immune Response in Schistosomiasis: The Role of P24 in the Modulation of Cellular Reactivity to *Schistosoma mansoni* Antigens. **Hum. immunol.** v.63, p.647–656.2002.



APÊNDICES

IMMUNOMODULATION OF BREAST MILK FROM SCHISTOSOMOTIC MICE: AN
IMMUNITY IMPROVEMENT

Iana Rafaela Fernandes Sales¹

Erica Souza Fernandes¹

Maria da Conceição Silva¹

Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda¹

Patrícia d'Emery Alves Santos¹

Yara de Miranda Gomes²

Virginia Maria Barros de Lorena²

Vláudia Maria Assis Costa¹

Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque¹

Valdênia Maria Oliveira de Souza¹

1- Laboratory of Immunology, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

2- Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

*Corresponding author at: Laboratory of Immunology from LIKA/UFPE, Av. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil. Fax: +55 81 2126 8485.

E-mail address: valdenia.souza@ufpe.br (V.M.O. Souza).

ABSTRACT

Breastfeeding by schistosomiasis mothers alters the immune response of their offspring. Here, it was undertaken an in vitro analysis of the breast milk from *Schistosoma mansoni*-infected mothers. Young and mature splenocytes were cultivated with mitogen added to the Milk of Infected (MIM) or Non-Infected Mothers (MNIM) or this last plus egg antigen of parasites (MNIM+SEA). It was evaluated in T Lymphocytes (CD3+/CD4+) and CD28, CD154, CTLA4, IL10 or FoxP3; Macrophages (CD14), B Lymphocytes (CD45R) and CD80, CD86 or CD40 and IL10 by CD45R+ cells. In young splenocytes, mitogen induced great CD3+CD28+ and CD45R+IL10+ cells frequency. MNIM maintained this increase and improved CD45R+CD40+, but dropped FoxP3+ cells frequency. MNIM+SEA impaired the CD3+CD28+ cell frequency and increased IL10 in these cells. MIM diminished the CTLA4+/FoxP3+/CD4+, but improved the IL10+/CD3+ and CD45R+/CD80+ cells frequency. In comparison to mitogen, in the mature splenocytes, MNIM and MIM modify the CD3+/CD28+ and CD3+/CTLA4+ cells frequency, respectively, and both increased the Foxp3+ cells. MIM reduced the CD45R+/IL10+ cells frequency. MNIM+SEA increased CD3+/CD154+ cells frequency. These findings emphasized the dichotomous character of breast milk (stimulator in young cells and tolerogenic in mature cells) and highlighted the milk from infected-mothers as a stimulator of the B cells activation.

Key-Words: Schistosomiasis, Costimulatory Molecules, IL-10, regulatory T cells.

INTRODUCTION

The high prevalence of chronic schistosomiasis in pregnant women and women of childbearing age has been widely reported (1,2). In Brazil, the only etiologic agent is *Schistosoma mansoni* (3) which induces a chronic course of the disease, characterized by a granulomatous and fibrotic reaction surrounding the eggs of the parasite trapped in the liver and intestine, due to immunomodulation dependent on the Th2 lymphocyte (IL4, IL5, IL10, IL13) and regulatory T cells (Tregs) (IL10, TGF- β) (4,5,6).

This immunological status of a mother with schistosomiasis is capable of altering the long term immune response of her offspring (7-14). Among these studies, the effect of pregnancy was considered experimentally and separate from breastfeeding in mothers with schistosomiasis, in the immune response to the heterologous antigen, ovalbumin (OVA) (13,14). It was observed that schistosomotic pregnancy results in an immunosuppressive potential in offspring. In contrast, breastfeeding induced significant anti-OVA antibodies responsiveness and IL-2 production and repaired the inhibitory potential acquired during the prenatal stage. Additionally, breastfed offspring improved antigen presentation by B cells through an increase in the expression of the costimulatory molecules CD40 and CD80 (14).

The functionality of antigen-presenting cells (APC's) is acquired with age, and their maturation *status* directly influences their antigen-presenting capacity and stimulatory effects (15-18). Breast milk has soluble factors such as IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ and TGF- β which are important as precursors of the immunity of the newborn (19,20,21) aiding in the maturation of system cells. Furthermore, the presence of immunoglobulins, IgA and IgG are potent stimulators of the development of the B cell line (21,22). In this context, the breast milk of schistosomotic mothers can act as a potent immunomodulator due to the presence of parasitic antigens or anti-parasite antibodies (23,24). Indeed, Colley et al., 1999 showed that

the IgG anti-SEA can positively influence the production of antibodies in offspring and is involved with the negative modulation of granuloma. Studies demonstrate that the Lacto-N-Fucopentose III (LNFP-III) glycan present in the soluble egg antigen of *S. mansoni* (SEA), as well as, in human breast milk, encourages the proliferation of B cells and induces the production of immunomodulatory cytokines by these cells (23,24).

It is known that the expression of molecules on the membrane of the T lymphocytes and the intracellular signals configures different immune activation status. CD28 and CTLA-4 induce inhibitory and stimulatory signals, respectively, when bound to the molecules CD80 (B7.1) or CD86 (B7.2) in the APC's (B lymphocytes, macrophages and dendritic cells) (25,26,27). Meanwhile, the CD154 molecule interacts with the CD40, present on the surface of the APC's, in order to trigger the effector functions of cell-mediated immunity with improved antigen capture and presentation (28-32). In this way, the frequency of these markers on the surface of the T lymphocytes and APC's can influence the immune response development. Another important immunological profile is the production of IL-10 by the T and B lymphocytes, as well as, the clonal expansion of the regulatory T lymphocytes, where its importance in maintaining tolerance and its performance during infection by *S. mansoni* has already been established (33,34,35).

Based on the findings above, the effect of milk from infected mothers, compared to breast milk from non-infected mothers, on the expression of the activation molecules, on young and mature T lymphocytes or APC's on must be considered. For this, young and mature splenocytes were cultivated with mitogen added to the Milk of Infected Mothers (MIM), Milk of Non-Infected Mothers (MNIM) or Milk of Non-Infected Mothers plus soluble egg antigens of parasites (MNIM+SEA). Double labeling was performed for flow cytometry: T Lymphocytes (CD3+ or CD4+) and CD28, CD154, CTLA4, IL-10 or FoxP3; Macrophages (CD14) and B Lymphocytes (CD45R) and CD80, CD86 or CD40 and IL-10 by

CD45R+ cells. In this way, it could be confirmed that the breast milk has a dichotomous character, depending on the type of cell maturity: stimulating humoral immune response in young cells and functioning as a controller in mature T lymphocytes. Meanwhile, the milk of schistosomic mothers induced the same profile, but it improved the B cells activation ability. These findings support the importance of breastfeeding in endemic areas and of the manipulation of immune response, in early stage of life, by parasite antigen in order to improving the immunity outcome

MATERIALS AND METHODS

Animals and infection by *S. mansoni*

Four-week-old female *Swiss Webster* mice were infected percutaneously with 20 cercariae of the São Lourenço da Mata strain of *Schistosoma mansoni*. On the 45th day following infection, fecal parasitology was performed (36) and only females with low load of infection (~15 eggs; ~four worm couples) were selected. This protocol of infection mimics the parasitological aspects of the population in areas endemic for schistosomiasis. Later, the estrus of these mice were synchronized [37] and the animals mated in the oviposition period, on the 60th day following infection, where immunomodulation of schistosomiasis was observed (4,13).

The mice were housed in the animal care facility at the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil. The experimental procedures were approved by the Ethics Commission for Animal Experimentation (No 25/2011-CEUA/CPqAM).

Obtaining of breast milk

Breast milk was obtained between ten and 12 days following delivery, by manual milking. The females were anesthetized (Xylazine-0.1µl and Ketamine-0.2 µl) and were given oxytocin (100 µl -1 UI), minutes before milking. The milk was collected (~ 200µL/ animal) and placed in sterile glass tubes, then centrifuged (25°/4500 rpm - for 20 minutes). The upper fat layer was discarded and the soluble portion passed through sterilizing filtration and stored (-80°C). The total absence of cells was verified using a Neubauer camera and 10% Trypan Blue.

Cultivation of spleen cells in the presence of breast milk for flow cytometry.

Mice without contact with *S. mansoni* had their spleens removed after 15 days (young cells) and after six weeks (mature cells) of age and placed on glass plates for 1h at 37°C, in the presence of collagenase (1 mg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The suspensions of spleen cells were washed in RPMI 1640 supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich), 0.1 mM L-glutamine, 0.5 mM 2-mercaptoethanol and 1% penicillin and streptomycin. Subsequently, the cells (5×10^6 cells/well) were pulsed with polyclonal activators - Phorbol Myristate Acetate – PMA and Ionomycin (MITOGEN) with added: Breast Milk Infected with *S. mansoni* (MIM), Breast Milk from Non-infected Mice with added SEA (MNIM+SEA) and Milk from Non-infected Mice (MNIM). Cells were also cultivated with culture medium only (BASAL). The cells were incubated at 37°C in a humidified CO₂ greenhouse for 24hrs.

Immunophenotyping Assay

Suspensions of young and mature cells subjected to the different stimuli were collected 24 hours after cultivation, washed, and subjected to marking for identification and counting of Lymphocytes and Macrophages, with monoclonal antibodies conjugated with fluorescent substances specific for cell membrane molecules: T Lymphocytes (CD3-PECy5

and CD4-PECy5), Macrophages (CD14- FITC) and B Lymphocytes (CD45R- PECy5). The profile of the T lymphocytes was evaluated by marking of the anti-CD28 (PE), anti-CD154 (PE), anti-CTLA4 (PE), anti-IL10 (PE) and anti- FoxP3 (PE) antibodies. They were evaluated for expression of co-stimulatory molecules by double-staining with the anti-CD80 (PE), anti-CD86 (PE) or anti-CD40 (PE) antibodies in macrophages and B lymphocytes, the latter being also labeled as anti-IL-10 (PE).

The cells underwent flow cytometry (FACS Calibur (BD- Pharmingen, San Diego, CA, USA)) with the acquisition of 10,000 events per sample. The lymphocytes were analyzed (Cell Quest) both for Granularity (SSC) and size (FSC) and the APC's were evaluated based on their granularity and expression of CD14+ or CD45R. Descriptive analysis was made of the frequency of the double positive cells and statistical difference ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$), between stimuli, performed by analysis of variance for parametric data (ANOVA), followed by multiple comparison in accordance with the Mann–Whitney method. All the procedures were repeated three times to analyze reproducibility of results.

RESULTS

Status of activation of young lymphocytes when cultured with breast milk of infected and non-infected mothers.

The activation status of T Lymphocytes CD3+ could be analyzed by the frequency of cells expressing the CD28, CD154 and CTLA-4 molecules. For the young cells in Figure 1A, a greater frequency of CD3+ cells expressing the CD28 molecule was observed when cultivated with mitogen, in comparison with those cultivated only with the culture medium. There was no difference in the number of CD3+ cells expressing CD154 or CTLA-4. These frequencies did not change after the addition of breast milk from non-infected mothers. However, the frequency of CD3+/CD28+ cells was significantly lower in the presence of milk

from non-infected mothers with added SEA (Mitogen=2.15%; MNIM+SEA=0.93%). In contrast, the splenocytes cultivated in the presence of breast milk from infected mothers had a lower frequency of CD3+CTLA4+ cells than with Mitogen (Mitogen=0.87%; MNIM+SEA=0.29%). There was no statistical difference in the frequency of young T cells CD3+CD154+, irrespective of the stimulant used (BASAL=0.43%; MITOGEN=0.60%; MIM=0.37%; MNIM=0.40%; MNIM+SEA=0.45%).

The T Lymphocytes (CD3+) and the B Lymphocytes (CD45R+) were evaluated for their IL-10 production capacity (Figure 1B). A three-fold increase of CD3+IL-10+ cells was observed upon stimulus of breast milk from infected mothers, in comparison to mitogen only. There was a two-fold increase with MNIM+SEA stimulation in relation to BASAL (BASAL=0.20%; MITOGEN=0.30%; MIM=0.90%; MNIM=0.20%; MNIM+SEA=0.6%). For CD45R+/IL-10+ cells, there was a significant increase using the mitogenic stimulus. This increase was similar for the different types of breast milks (BASAL=1.50%; MITOGEN=4.50%; MIM=5.0%; MNIM=4.0%; MNIM+SEA=3.0%). Figure 1C shows that the frequency of CD4+FoxP3+ cells was drastically reduced in the presence of breast milk, when compared to the mitogen, irrespective of the infection or the addition of parasitic antigen (BASAL=1.17%; MITOGEN=1.76%; MIM=0.67%; MNIM=0.49% and MNIM+SEA=0.42%).

Expression of costimulatory molecules in young Macrophages and B Lymphocytes upon cultivation with breast milk of infected and non-infected mothers.

The antigen presentation capacity of immature Macrophages and B Lymphocytes was evaluated by the expression of costimulatory molecules (CD80, CD86 and CD40). Figure 1D shows that there was no statistical difference in the frequency of CD14+ cells for the costimulatory molecule analyzed, whether cultivated with Mitogen or with different types of

breast milk. In contrast, a greater frequency of CD45R+/CD80+ (Figure 1E) cells was observed in MIM cultivation (14.0%) than with Mitogen (7.0%). Additionally, acquisition of CD45R+CD40+ cells was 2.6 times greater when cultivated in the presence of MNIM (15.85%) compared to Mitogen (6.04%).

Status of activation of mature lymphocytes when cultured with breast milk of infected and non-infected mothers.

In terms of the activation of mature T CD3+ Lymphocytes, it was found that among the molecules CD28, CD154 and CTLA-4, the former was present in significantly greater numbers when cultivated with mitogen only (Figure 2A). Upon MNIM or MNIM+SEA stimulation there was a drastic reduction in the number of CD3+CD28+ cells, compared to cultivation with Mitogen (BASAL=1.28%; MITOGEN=2.35%; MIM=2.16%; MNIM=0.53%; MNIM+SEA=0.73%). However, the acquisition of CD3+CD154+ cells was much greater when cultivated with MNIM+SEA (BASAL=0.46%; MITOGEN=0.48%; MIM=0.54%; MNIM=0.45%; MNIM+SEA=2.14%). For CD3+CTLA4+ cells, there was a higher frequency when cultivated in the presence of MIM (2.30%) in relation to Mitogen (1.04%).

In regards to CD3+IL-10+ cells (Figure 2B), the frequency was similar among the basal and stimulus with Mitogen or with different types of breast milk (BASAL=0.47%; MITOGEN=0.26%; MIM=0.5%; MNIM=0.43%; MNIM+SEA=0.3%). For CD45R+/IL-10+ cells, there was a significant acquisition of these cells under the stimulus with mitogen (6.70%) in comparison to basal (2.70%), but the presence of milk from infected mothers produced a reduction of these cells (MIM 1.79%). Cultivation with MNIM or MNIM+SEA did not result in significant differences in comparison with mitogen. In relation to regulatory CD4+FoxP3+ cells (Figure 2C), there was increase in the frequency after the addition of

breast milk from infected or non-infected mothers, with or without SEA (BASAL=0,47; MITOGEN=0.26%; MIM=1.27%; MNIM=1.0%; MNIM+SEA=1.49%;).

Expression of costimulatory molecules in mature Macrophages and B Lymphocytes upon cultivation with breast milk of infected and non-infected mothers.

In relation to CD14⁺ and CD45R⁺ cells marked for costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40, there were statistical difference in the acquisition of these cells after the addition of the breast milk of infected or non-infected mothers, with or without SEA (Figure 2D and E).

DISCUSSION

The neonatal period is vital for the development of the immune system and exposure to antigens during this stage of life may result in changes to the immunity effect (15,38,18). Maternal schistosomotic infection during the breastfeeding period altered the long-term humoral and cell immune response of offspring (7,8,10,13,14). The present study evaluated, *in vitro*, the effect of breast milk of mothers infected with *S. mansoni*, in spleen cells undergoing mitogenic activation. In these conditions, there was an increase in the activation capacity of B and T lymphocytes, most notably in young cells.

Although in the absence of cellular interactions and soluble factors that occur in the *in vivo* system (38), the findings of the present study reiterate the importance of water-soluble components in the maternal milk for an appropriate inflammatory response and antibody production (39,40). The growth of young cells pulsed with mitogen resulted in an increase of CD28⁺ on T lymphocytes and induced the production of IL-10 in B lymphocytes, without affecting the expression of costimulatory molecules in APC's. The addition of milk from non-infected mothers maintained the activation of T lymphocytes, but led to a reduction of Treg cells and an increase in the expression of CD40 costimulatory molecules on B lymphocytes.

The CD40:CD40-ligand interaction promotes the maintenance of T cell activation, as it upregulates expression of MHC class II molecules and co-stimulatory molecules CD80 and CD86, as well as, CD40 itself (30,41). In this way, it participates effectively in the production of different isotypes, via switching, which corroborates the effect of breast milk in improving the production of antibodies. Interestingly, breast milk from schistosomotic mothers seems to improve much more the activation of B Lymphocytes, but by other molecules. Indeed, the reduction of the frequency of CTLA-4+ T lymphocytes together with an increase in the number of CD80+ B lymphocytes favors the CD28:CD80 interaction, which together with CD28:CD86 induces an appropriate activation and increases the production of antibodies (25,26,27,42). Santos et al (2014) (14), in an *in vivo* study, demonstrated that suckling by *S. mansoni*-infected mothers improved antigen presentation by B cells in adult offspring during the immune response to a non-related antigen. The authors observed that breastfeeding in infected mothers encouraged increased early frequency of CD40+/CD80+ B cells, during the development of immunity, corroborating our findings.

SEA has an antigenic capacity dependent on glycosylated proteins secreted actively by eggs and its disintegration products (43,44). *In vitro* experiments showed that SEA induced non-conventional activation of DC and impaired maturation, characterized by minor up-regulation of MHC Class II and no significant up-regulation of other hallmarks of maturation (CD80, CD86, CD40 or CD154 and pro-inflammatory cytokine (45,46,47). In truth, following the addition of SEA to the cultivation of Breast Milk from Non-infected Mothers there was no alteration in the APC's, young B Lymphocytes or Macrophages. In contrast, there was a reduced T Lymphocyte activation capacity due to negative effect on the frequency of CD3+CD28+ cells (in comparison to mitogen and others stimulus) and a two-fold increase in the frequency of CD3+IL-10+ cells (in comparison with MNIM stimulus). In agreement to these findings, the antigens present in the eggs or in soluble adult worm antigen have been

identified as stimulators of the production of IL-10 and involved in the reduction of the number of T CD28 cells (48,49).

It should be stated that in MIN culture there was a threefold increase in the production of IL-10 by T lymphocytes (when compared to MNIM). These results indicate that the ability of inducing IL-10 by MIN is partially SEA dependent. In spite of this the proliferation of CD3⁺/CD28⁺ cells by SEA was restored by MIM. In addition, the MIM induced a reduction in Treg and incremented young B lymphocyte activation capacity, suggesting a possible preservation of antibody production in a SEA independent manner. It is therefore important to analyze the parasitic components, as well as, the action of antibodies and cytokines of the MIM. Such analysis is currently being undertaken in our laboratory.

The immune system has a continuous maturation process from birth to the early years of life (50,51), with the full activation capacity after early childhood (17-20). Breast milk provides progressive concentration of the immune components depending on to what extent breastfeeding is prolonged after the first six months (52,53). Based on this data, mature cells were analyzed in order to verify the influence of the cell age upon Milk from Infected Mothers cultivation.

Cultivation of mature cells with mitogen did not alter the profile previously identified in young cells (increase in CD3⁺CD28⁺, CD45R⁺/IL-10⁺ cells, without alterations in costimulatory molecules). In contrast, the milk of non-infected mothers resulted in a reduced stimulatory capacity of T lymphocytes showed by decreasing CD28⁺ expression and greater presence of Treg cells. This phenomenon appears to be inherent to breast milk and corroborates its suppressive capacity and tolerance to foods ingested in the most advanced stage after birth, and to atopies (54). Immunological protection via breast milk has an ambiguous character: it is essential to the development of the immune system, and

subsequently induces of immune tolerance (39, 40, 55). Interestingly, in the presence of Breast Milk of Infected Mothers the suppressor characteristic seems to be mediated by T lymphocytes via the CTLA-4 molecule and maintenance of an elevated Treg frequency.

The CD28 molecule provides essential activation signals when associated with CD80 or CD86 molecules, including increased T cell receptor signaling (TCR), IL-2 production and survival of T lymphocytes (56, 57,58). The lowest frequency of the CD28 molecule, in the presence of MIM, could be associated with reduced ability to perform the second activation signal of T Lymphocytes. Alternatively, the MIM may favor CTLA-4:CD80/CD86 binding, which induces inhibitory intracellular signals for controlling of lymphoproliferation (59) and are critical for Treg function (60). The SEA did not improve CD28 expression, but it led to a significant increase in cell frequency CD3+CD154+. Such findings suggest that could there is a compensation of costimulation reduced via CD28 by MNIM, if added to SEA. With respect to B Lymphocytes, the addition of SEA to milk of non-infected mothers did not impair frequency of mature B Lymphocytes producers of IL-10. In contrast, the MIM favored to a remarkable reduction of IL-10-producing cells. This finding suggests a suppressive action of the MIM on T lymphocytes only, as there was a tendency to improve B cell response.

Overall, the present study corroborates the dichotomy in stimulating and the tolerogenic effects of maternal milk. This phenomenon appears to be mediated by improvement of the activation of B Lymphocytes early in life and the induction of suppressive ability in T lymphocyte when maturity is reached. This finding support the importance of prolonged breastfeeding for homeostasis and prevention of autoimmune diseases and allergies (54). Milk of infected mothers exhibited this cellular age-dependent dichotomous effect, however, by different molecular mechanisms. Besides of this, it encourages and ensures the humoral immune response by improving B lymphocytes activation. Although care should be taken with the extrapolation of data from *in vitro* and

animal studies, the results highlight the importance of contact with parasite antigens, in early life, in order to increase immunity to extracellular bacteria and vaccine antigens.

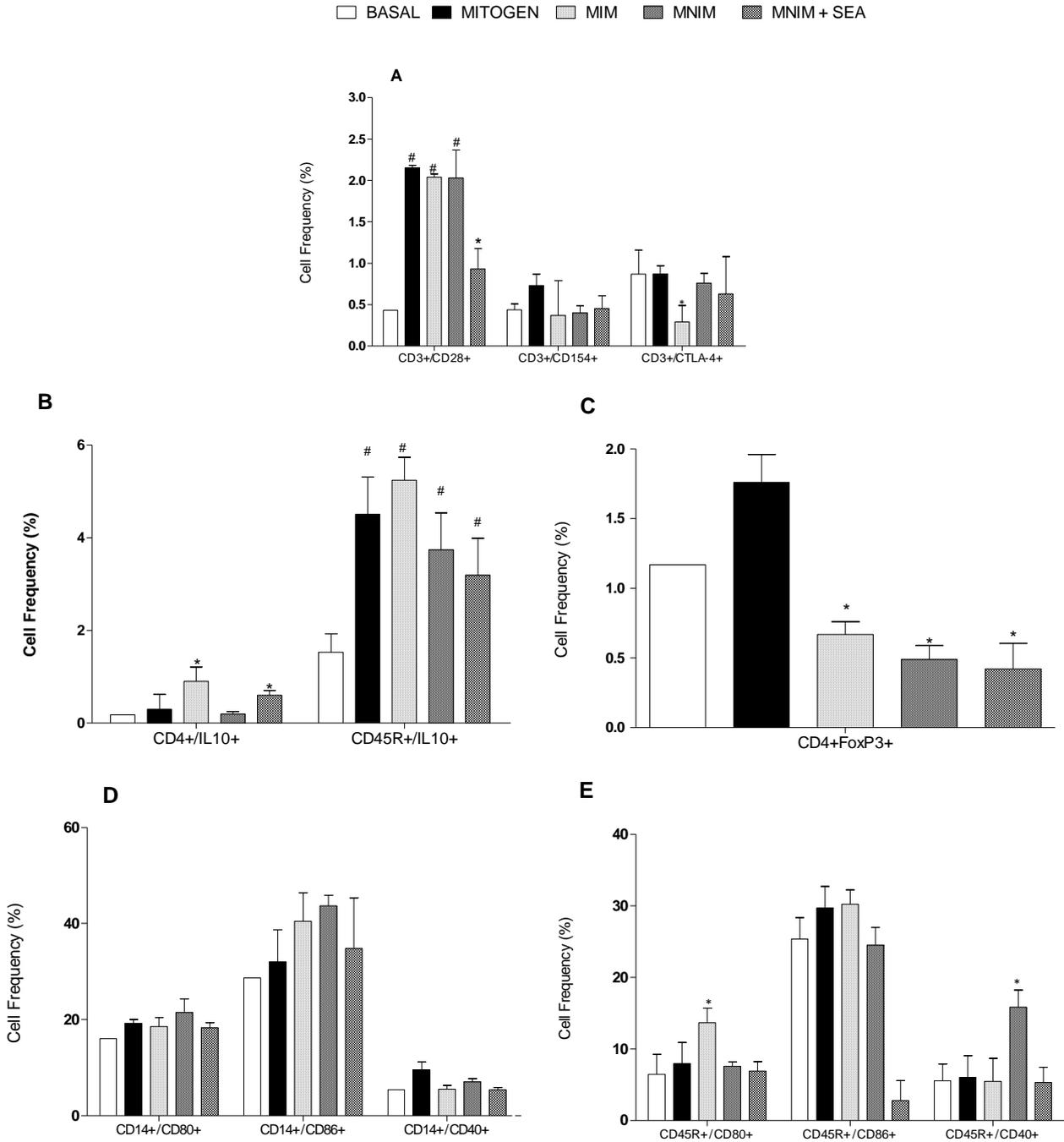


Fig 1: Phenotypic characterization of young splenocytes cultured with mitogen (MITOGEN) added to the Milk to Infected Mothers (MIM), Milk of Non-Infected Mothers (MNIM) or MNIM added of soluble egg antigens (MNIM+SEA), as well as those without in vitro stimulus (BASAL). Double cell labeling was performed for flow cytometry: T lymphocytes (CD3 or CD4) marked with CD28, CD154 and CTLA4 (A). T lymphocytes (CD3) and B lymphocytes (CD45R) (B) have been marked for cytokine IL10 and regulatory T lymphocytes (CD4/FoxP3) were also evaluated (C). Macrophages (CD14) (D) and B Lymphocytes (CD45R) (E) were labeling with costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40. #P <0.05 compared to basal. * P <0.05 compared with the mitogen.

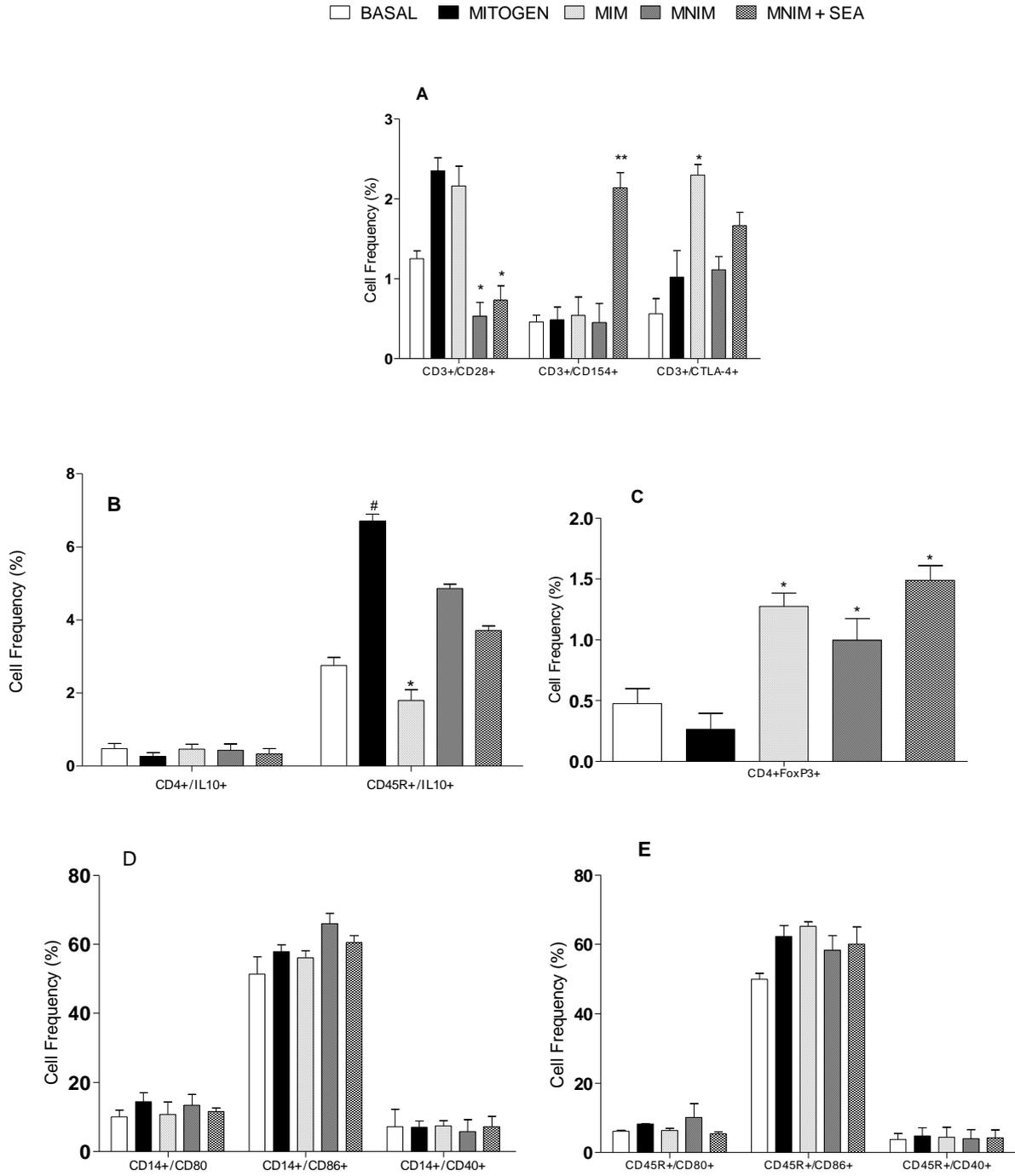


Fig 2: Phenotypic characterization of mature splenocytes cultured with mitogen (MITOGEN) added to the Milk to Infected Mothers (MIM), Milk of Non-Infected Mothers (MNIM) or MNIM added of soluble egg antigens (MNIM+SEA), as well as those without in vitro stimulus (BASAL). Double cell labeling was performed for flow cytometry: T lymphocytes (CD3 or CD4) marked with CD28, CD154 and CTLA4 (A). T lymphocytes (CD3) and B lymphocytes (CD45R) (B) have been marked for cytokine IL10 and regulatory T lymphocytes (CD4/FoxP3) were also evaluated (C). Macrophages (CD14) (D) and B Lymphocytes (CD45R) (E) were labeling with costimulatory molecules CD80, CD86 and CD40. #P <0.05 compared to basal. * P <0.05 compared with the mitogen.

REFERENCE

1. Friedman JF, Mital P, Kanzaria HK, Olds GR, Kurtis JD. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends parasitol.* 2007; 23: 159-164, doi:10.1016/j.pt.2007.02.006.
2. Salawu OT, Odaibo AB. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *Int. j. gynaecol. obstet.* 2013; 122: 1-4, doi:10.1016/j.ijgo.2013.01.024.
3. Fonseca F, Freitas C, Dutra L, Guimarães R, Carvalho A. Spatial modeling of the schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. *Acta trop* 2014; 133: 56–63, doi:10.1016/j.actatropica.2014.01.015.
4. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect. dis. clin. n. am.* 2012; 26: 383–397, doi: 10.1016/j.idc.2012.03.004.
5. Barsoum RS, Esmat G, El-Baz T. Human schistosomiasis: Clinical perspective. *J. adv. res.* 2013; 4: 433-444, doi:10.1016/j.jare.2013.01.005.
6. Scheer S, Gross S, Mouahid G, Moné H, Lamers M. A novel tool to identify the relative contribution of lymphoid cell types that contribute to IL-10 production during the infection with *Schistosoma mansoni*: The TIGER index. *J. immune. methods.* 2014; 406: 66-73, doi:10.1016/j.jim.2014.03.008.
7. Eissa AM, Saad MA, Abdel Ghaffar AK, el-Sharkaway IM, Kamal KA. Transmission of lymphocyte responsiveness to schistosomal antigens by breast feeding. *Trop. geogr. med.* 1989; 41: 208-212.
8. Noureldin MS, Shaltout AA. Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. *J. egypt. soc parasitol.* 1998; 28: 539-550.
9. Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW, et.al. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis. *J. immunol.* 1999; 162: 6843-6848.
10. Colley DG, Montesano MA, Freeman GL, Secor WE. [Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis.](#) *Microbes Infect.* 1999; 1: 517-524.
11. Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, [El-emshaty](#) HM, Elsheikha HM. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitol. res.* 2006; 99: 137–145, doi 10.1007/s00436-006-0127-x.
12. [Othman AA](#), [Shoheib ZS](#), [Saied EM](#), Soliman RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology.* 2010; 215: 101-112, doi 10.1016/j.imbio.2009.04.004.
13. [Santos PA](#), [Sales IR](#), [Schirato GV](#), [Costa VMA](#), [Albuquerque MCPA](#), [Souza, VMO](#), et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol. res.* 2010; 107: 95-102, doi 10.1007/s00436-010-1839-5.
14. Santos PA, Lorena VMB, Fernandes E, Sales IRF, Albuquerque MCPA, Gomes Y, et.al. Maternal schistosomiasis alter costimulatory molecules expression. in antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Exp. parasitol.* 2014; 141: 62-67, doi 10.1016/j.exppara.2014.03.017.
15. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat.rev.immunol.* 2004; 4: 553-564, doi:10.1038/nri1394.
16. Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur. J. immunol.* 2009; 39: 26–35, doi: 10.1002/eji.200838391.
17. Jiang H, van de Vena C, Baxib L, Satwania P, Cairoa MS. Differential gene expression signatures of adult peripheral blood vs cord blood monocyte-derived immature and mature dendritic cells. *Exp. Hematol.* 2009; 37:1201–1215, doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2009.07.010>.

18. Dowling DJ, Levy O. Ontogeny of early life immunity. *Trends Immunol.* 2014; 35: 299-310, doi:[10.1016/j.it.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.007).
19. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and Tr1 and Th3 regulatory cells. *Nat. Immunol.* 2001; 2: 671-672, doi:10.1038/90604.
20. Blewett HJH, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. *Adv. food nutr. res.* 2008; 54: 45-80, doi:[10.1016/S1043-4526\(07\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(07)00002-2).
21. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. clin. n. am.* 2013; 60: 49-74, doi:[10.1016/j.pcl.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002).
22. Malanchere E, Huetz F, Coutinho A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *Eur. j. immunol.* 1997; 27: 788-793, doi: 10.1002/eji.1830270330
23. Thomas PG, Harn DA. Immune biasing by helminth glycans. *Cell. microbiol.* 2005; 6:13-22, doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00337.x.
24. Bhargava P, Li C, Stanya KJ, Jacobi D, Dai L, Liu S, et.al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nat. med.* 2012; 18: 1665-1672, doi: 10.1038/nm.2962.
25. Oliveira RR, Gollob KJ, Figueiredo JP, Alcântara LM, Cardoso LS, Aquino CSB, et.al. *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. *Microbes infect.* 2009; 11: 223-229, doi: 10.1016/j.micinf.2008.11.017.
26. Riha P, Rudd CE. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self Nonself* 2010; 1: 231-240, doi: 10.4161/self.1.3.12968.
27. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. rev.* 2011; 241: 180- 205, doi 10.1111/j.1600-065X.2011.01011.x.
28. MacDonald AS, Patton EA, La Flamme AC, Araujo MI, Huxtable CR, Bauman B et.al. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. *J. immunol.* 2002; 168: 4643-4649, doi:10.4049/jimmunol.168.9.4643.
29. Jenkins SJ, Perona-Wright G, MacDonald AS. Full Development of Th2 Immunity Requires Both Innate and Adaptive Sources of CD154. *J. immunol.* 2008; 180:8083-8092, doi:10.4049/jimmunol.180.12.8083.
30. Ma DY, Clark EA. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. immunol.* 2009; 21:265-272, doi:[10.1016/j.smim.2009.05.010](https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.010).
31. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. chim. acta.* 2012; 413: 1338-1349, doi: 10.1016/lcca.2011.11.006.
32. Huang H, Ito K, Dangond F, Dhib-Jalbut S. Effect of interferon beta-1a on B7.1 and B7.2 B-cell expression and its impact on T-cell proliferation. *J. neuroimmunol.* 2013; 258: 27-31, doi:[10.1016/j.jneuroim.2013.02.010](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.02.010).
33. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J. immunol.* 2004; 172: 3157-3166, doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3157.
34. Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally occurring CD4 +Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J. immunol.* 2006; 176: 5374-87, doi: 10.4049/jimmunol.176.9.5374.
35. Mbow M, Larkin BM, Meurs L, Wammes LJ, E. de Jong S, Labuda LA, et.al. T-Helper 17 Cells Are Associated With Pathology in Human Schistosomiasis. *J. infect. dis.* 2013; 207: 186-195, doi: 10.1093/infdis/jis654.

36. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. inst. med. trop.* 1972; 14: 397-400.
37. Wang H, Herath CB, Xia G, Watanabe G, Taya K. Superovulation, fertilization and *in vitro* embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. *Reproduction.* 2001; 122: 809-816, doi:10.1530/rep.0.1220809.
38. Júnior DM, Araújo JAP, Catelan, TTT, Souza, AWS, Cruvinel WM, Andrade, LEC, et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50 (5) :552-80.
39. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. rev. immunol.* 2007; 7: 379-390, doi:10.1038/nri2075.
40. Jakaitis BM, Denning PW. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. *Clin. perinatal.* 2014; 41: 423–435, doi:10.1016/j.clp.2014.02.011.
41. Suttles J, Stout RD. Macrophage CD40 signaling: A pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin. immunol.* 2009; 21: 257-264, doi: 10.1016/j.smim.2009.05.011.
42. Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh, T, Ochs HD, Durandy A et. al. Analysis of somatic hypermutations in the IgM switch region in human B cells . *J. allergy. clin. immunol.* 2014; 134: 411-419, doi:10.1016/j.jaci.2014.02.043.
43. Steinfeder S, Andersen JF, Cannons JL, Feng CG, Joshi M, Dwyer D, 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.* 2009; 206: 1681-1690, doi: 10.1084/jem.20082462.
44. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn Jr. DA. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J. immunol.* 1999; 163: 6712–6717.
45. MacDonald, A.S., Straw, A.D., Bauman, B., Pearce, E.J., 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J. Immunol.* 167, 1982–1988
46. Perona-Wright G, Jenkins SJ, MacDonald AS. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. *Int. j. parasitol.* 2006; 36: 711–721, doi:10.1016/j.ijpara.2006.02.003
47. Zaccone, P., Fehervari, Z., Jones, F.M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Dunne, D.W., Cooke, A., 2003. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur. J. Immunol.* 33, 1439.
48. Zouain CS, Falcão PL, Goes TS, Leite MF, Goes AM. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans. *Immunol. lett.* 2004; 91: 113–118, doi:10.1016/j.imlet.2003.10.007.
49. Oliveira DM, Gustavson S, Silva-Teixeira DN, Goes AM. Nitric Oxide and IL-10 Production Induced by PIII-A Fraction of *Schistosoma mansoni* Adult Worm Antigenic Preparation-Associated with Downregulation of In Vitro Granuloma Formation. *Hum. immunol.* 1999; 60: 305–311, doi 10.1016/S0198-8859(98)00120-7.
50. Holt PG, Jones CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. *Allergy* 2000; 55: 688–97, DOI: 10.1034/j.1398-9995.2000.00118.x
51. Liao S, Yeh K, Lai S, Lee W, Huang J. Maturation of Toll-like receptor 1–4 responsiveness during early life. *Early hum. develop.* 2013; 89: 473–478, doi:10.1016/j.earlhumdev.2013.03.013.
52. Goldman AS, Goldblum RM, Garza C. Immunologic components in human milk during the second year of lactation. *Acta paediatr. scand.* 1983; 72:461-2.
53. WHO (World Health Organization) The optimal duration of exclusive breastfeeding. 2001

54. Melnik BC, John SM, Schmitz G. Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy? *J. trans. med.* 2014; 12:1-11.
55. Aspinall R, Prentice AM, Ngom PT. Interleukin 7 from Maternal Milk Crosses the Intestinal Barrier and Modulates T-Cell Development in Offspring. *PLoS ONE*. 2011; 6: 1-7, doi:10.1371/journal.pone.0020812.
56. Greenwald RJ, Latchman YE, Sharpe AH. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr. opin. immunol.* 2002; 14: 391-396, doi:10.1016/S0952-7915(02)00341-2.
57. Chikuma S, Bluestone JA. CTLA-4 and tolerance: The biochemical point the view. *Immunol. res.* 2003; 28: 241-253, doi: 10.1385/IR:28:3:241
58. Andres PG, Howland KC, Nirula A, Kane LP, Barron L, Dresnek D et.al. Distinct regions in the CD28 cytoplasmic domain are required for T helper type 2 differentiation. *Nat. immunol.* 2004; 5:435-42, doi:10.1038/ni1044.
59. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in *CTLA-4*. *Science* 1995, 270; 985-988, doi:10.1126/science.270.5238.985.
60. Schmidt EM, Wang CJ, Ryan GA, Clough LE, Qureshi OS, Goodall M et.al. CTLA-4 Controls Regulatory T Cell Peripheral Homeostasis and Is Required for Suppression of Pancreatic Islet Autoimmunity. *J. immunol.* 2009; 182:274-282.

PROTEOMICS OF MILK FROM MICE INFECTED WITH *Schistosoma mansoni*Iana Rafaela Fernandes Sales¹Patricia Evelyn Evangelista¹Erica Souza Fernandes¹Patrícia d'Emery Alves Santos¹André Aires¹Yara de Miranda Gomes²Virginia Maria Barros de Lorena²Vláudia Maria Assis Costa¹Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque¹Fabiana A C Silva³Tercilio Calsa Junior³Valdênia Maria Oliveira de Souza¹

1- Laboratory of Immunology, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

2- Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

3- Laboratory of Genomics and Proteomics of Plants (LGPP). Department of Genetics - Federal University of Pernambuco Recife, PE, Brazil

*Corresponding author at: Laboratory of Immunology from LIKA/UFPE, Av. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil. Fax: +55 81 2126 8485. E-mail address: valdenia.souza@ufpe.br (V.M.O. Souza).

ABSTRACT

The high prevalence of chronic schistosomiasis in pregnant women and women of childbearing age has been widely reported. Breastfeeding by mothers with schistosomiasis is capable of altering the long term immune response of offspring. The aim of this study was to describe the proteomics of milk from mice infected with *Schistosoma mansoni* and to compare this milk with the profile of milk of uninfected mothers, with or without the addition of parasite antigens. Female mice were infected (or remained uninfected) with *S. mansoni* (20 cercariae) and on the 12th day after delivery, the milk was collected, processed and stored for analysis. Additionally, soluble egg antigens (SEA) and soluble adult worm antigen preparation (SWAP) were obtained for analysis. A one-dimensional gel was made and the bands obtained from infected breast milk and non-infected breast milk, with or without the addition of SEA, were processed for analysis by mass spectrometry. Additionally, the parasite antigens SEA and SWAP were included in the analysis. The breast milk of mothers with schistosomiasis presented peptides related to the presence of *S. mansoni* and variability of function. The immunomodulatory nature of the peptides identified in the present study (Interleukin 17F, Glutathione-S-Transferase) should be noted, as these can act in the immune process of breastfed offspring, whether for parasite antigens or heterologous antigens. These findings are relevant for areas in which schistosomiasis is endemic and emphasize the importance of the identification and characterization of parasite antigens and the evaluation of their role in parasite-host interaction in the early stages of life, in order to obtain a better understanding of immunoregulatory events.

Key-Words: Proteomics, *Schistosoma mansoni*, Milk Proteins, Antigens.

INTRODUCTION

There are approximately 10 million pregnant women and 40 million women of childbearing age chronically infected with schistosomiasis in areas where the disease is endemic [1,2]. In Brazil, the only etiologic agent of schistosomiasis is *Schistosoma mansoni* [3] which induces a chronic course of the disease, characterized by intense immunomodulation [4,5,6]. Maternal schistosomotic infection during the breastfeeding period alters the long-term humoral and cell immune response of offspring [7,8,9,10]. With respect to breastfeeding among the offspring of schistosomotic mice, there was significant responsiveness to anti-OVA antibodies and IL-2 production, and repair of the inhibitory potential acquired during the prenatal stage [11]. Additionally, breastfed offspring had improved antigen presentation ability by B cells [12].

It is known that human breast milk is made up of proteins, fats, carbohydrates, minerals, electrolytes, trace elements, vitamins and water [13]. It also has bioactive compounds that are important as precursors of immunity of newborns [14,15,16,17]. With regard to the proteomics of murine milk proteomics, the presence of peptides such as casein (α fractions, β and γ), albumin and lactoferrin has been suggested [18]. However, these findings have not been fully or reliably described, with little data available and results varying according to methodology.

It is known that the milk of mothers with schistosomiasis has the potential to alter the degree of immune competence of offspring, due to the presence of parasite antigens or anti-parasite antibodies [19,20]. Colley et al., 1999 [9] found that lactating mice given a specific antibody for the soluble egg antigens of *Schistosoma* (SEA) and infected in adult life, had increased anti-SEA antibody production. Other authors have highlighted the presence of carbohydrates on the surface of *Schistosoma* eggs, particularly the pentasaccharide Lacto-N-Fucopentaose III (LNFPIII) which is also present in human breast milk and has immunomodulatory capacity [20]. Other authors also observed improved antigen presentation of B lymphocytes in animals breast-fed by mothers with schistosomiasis [12]. Although this stimulatory ability has been previously described, the protein constituents present in the milk of schistosomiasis mice remain unclear.

Over the last two decades, proteomics has become a fundamental research tool for scientists because of their use in protein characterization and biomarker discovery [21]. The technique had been used to identify schistosome proteins from complex samples such as

tegument secretion [22,23,24,25] and gender [28]. In a study aiming to identify proteins in different life stages of *Schistosoma mansoni*, Curwen et al (2004) [27] analyzed soluble peptides derived from the preparation of cercariae, schistosomula, adult worms and eggs by 2D gel electrophoresis. The 40 most abundant spots in each gel were selected for detailed investigation and a notable similarity between the different life cycles was observed.

Because of the role of egg antigens in regulating the cytokine environment and the subsequent immunopathology of schistosomiasis [28], identifying the components is of considerable importance. These antigens are comprised of hundreds of proteins and glycoconjugates, with about 30 elements, which vary in their molecular weight (10 to 200 kDa) and include those that are actively secreted by the eggs or by their disintegration products [28]. One of the most abundant proteins of SEA is the 40kDa polypeptide (Sm-p40), which represents approximately 10% of the constitution of this antigen [29]. By examining the ability of SEA fractions to stimulate proliferation of CD4⁺ Th cells isolated from *S. mansoni* infected mice, not just Sm-p40, but also p150/166 (albumin), phosphoenolpyruvate carboxykinase, glutathione S-transferase (GST)-(28 K), peroxiredoxin 1, and SmEP25 proteins have been identified [30]. A more recent study reported the presence of secretory glycoproteins identified as (IPSE) / alpha-1 and omega-1 [31].

Therefore, the milk of mothers with schistosomiasis has the potential to modulate the immune response of their offspring. At the same time, many questions concerning murine milk protein expression, structure and modifications remain unanswered. The present study described the proteomics of milk from mice infected with *Schistosoma mansoni* and compared this milk to the profile of milk from mothers without schistosomiasis, with and without the addition of parasite antigens. The results demonstrate that milk from mothers with schistosomiasis includes peptides with various functions. These are related to the presence of proteins originating from *S. mansoni* and are associated with immune processes, including the modulation of homologous antigens and the enhancement of the humoral immune response.

MATERIALS AND METHODS

Animals and infection with *S. mansoni*

In order to mimic the parasitological aspects of this population in areas of northeastern Brazil where schistosomiasis is endemic, four-week-old female *Swiss Webster* mice were

infected percutaneously with 20 cercariae of the São Lourenço da Mata (SLM) strain of *Schistosoma mansoni*. On the 45th day following infection, fecal parasitology was performed [32] and only females with low confirmed levels of infection (~15 eggs; four worm couples) were selected. Later, the estrus of these mice were synchronized [33] and the animals mated in the oviposition period on the 60th day following infection, where immunomodulation of schistosomiasis was observed, according to procedures widely used by the authors of the present study [11].

The animals were supplied by the vivarium of the Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) and the laboratory procedures were performed in the Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (Departamento de Genética – UFPE) and the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). The experimental protocols were approved by the Ethics Commission for Animal Experimentation (CEEA/UFPE: 25 /2011).

Collection and preparation of maternal milk

Maternal milk was obtained between ten and 12 days following delivery by manual milking. The females were anesthetized (Xylazine-0.1µl and Ketamine-0.2 µl) and were given oxytocin (100 µl -1 UI) a few minutes before milking. The milk was collected (~200µL/animal) and placed in sterile glass tubes, then centrifuged (25°/2500 rpm - for 20 minutes). The upper fat layer was discarded and the soluble portion passed through sterilizing filtration and stored (-80°C). The total absence of cells was verified using a Neubauer camera and 10% Trypan Blue.

Preparation of Soluble Antigens

Soluble antigens of *S. mansoni* were prepared according to the method described by Gazzinelli et al. (1983) [35]. *Swiss Webster* mice were infected with 100 cercariae of the SLM strain and after 60 days of infection, perfusion was performed for removal of the adult worms present in the portal vein and inferior mesenteric arteries, and the livers to recover eggs. The adult worms and eggs were resuspended separately in 1.7% saline, crushed and homogenized with a Teflon piston (WIRTS, DTL). The resulting homogenate was centrifuged (50,000 g /1 hour at 4°C) and the supernatant collected and dialyzed against PBS 0.05M, pH 7.4 (SIGMA. USA), for 48 hours at 4°C and filtered with 0.45µm filter (Filter Millex -HA- Millipore Products Division, Bedford, MA). After the doses of the soluble adult worm antigen

preparation (SWAP) and the soluble egg antigen (SEA) were applied, the antigenic solutions were fractionated and stored at -20°C, for later use.

Separation of proteins by electrophoresis (SDS-PAGE) and band selection

A one-dimensional gel was created to verify the integrity and identification of peptides via mass spectrometry of the milk of infected mice. As experimental controls, a one-dimensional gel was also created in the Milk of Uninfected Mothers, with or without the soluble egg antigen of *S.mansoni*. Additionally, soluble egg antigen (SEA) and soluble adult worm antigen preparation (SWAP) were added (Figure 1).

The SDS-PAGE gel (12.5% of polyacrylamide) was subjected to electrophoresis in a 20cm x 20cm OmniPhor vertical tank. A quantity of 40 µg of total protein together with 5 uL of low molecular weight marker (GE Healthcare) was applied to the gel. After electrophoresis, the gels were stained with *Coomassie Brilliant Blue R* in accordance with Candiano *et al.* (2004) [36].

Digestion with trypsin and analysis with MS

The bands of SDS-PAGE gels were excised, eluted, digested with trypsin and analyzed by mass spectrometry analyzer via MALDI-ToF/ToF (Brüker Daltonics). The mass spectra of the peptides underwent presumptive identification using the online program MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>), with parameters of: search with trypsin digestion to an unknown cleavage site; *Mus* organism and post-translational modifications: oxidation in methionine residue as a variable modification, and carboxymethylation. The SWISSPROT and NCBIInr databases were consulted for analysis of the following variables: Peptide, Access, Identification, Score, *e-value*, Molecular weight and percentage of identification.

RESULTS

Identification of proteins by mass spectrometry

Fragments of gels were selected, excised and analyzed by mass spectrometry and presumptively identified for qualitative analysis of proteins. A total of 24 bands were selected (6,7,8,10,12,13,14,22,38,45,46, 50,53,57,67,68,71,74,77,79 and 80) from the 1D gel based on differential analysis, with the aim of identifying specific peptides in each sample of milk or antigen (Figure 1). After sequencing, a total of 118 peptides were found, which were grouped

according to their presence in different stimuli. A total of 45 proteins were detected in MIM, 09 peptides in MNIM + SEA, 17 from MNIM, 31 from SEA and 16 from SWAP (data not shown).

Following statistical analysis, the presence of 37 peptides was considered significant. However, observing the sequence of amino acids, repetition of these proteins was identified in the databases studied. The non-redundant presence of 15 peptides was subsequently identified. After comparison with the UniProt database, the sequences of amino acids were identified and divided into categories according to their biological process or function, using the following categories: Cellular Transport, Metabolic Processes, Structural Processes, Modulation of Immune Response and Development/Signaling. Table 1 shows all the proteins identified, such as score, e-value, molecular weight and percentage of identification.

As Table 1 shows, MNIM+SEA and SEA presented proteins that were associated with a limited number of biological characteristics. In terms of MNIM, the presence of peptide commonly found in structural processes (Alpha actin 3) was observed. As for MNIM+SEA, proteins were identified related to development/signaling processes (Alpha 1 Anti-trypsin 1-3 and Alpha 1 Anti-trypsin 1-1). For SEA, as well as proteins involved in structural processes (Myosin 9), proteins involved in metabolic processes (Glutathione S-transferase) were found.

With respect to parasite antigens, Glutathione S-transferase (GST) and Myosin 9 were identified in SEA, which are related to development/signaling processes. GST was not found in SWAP (Table 1). However, proteins associated with more than one biological characteristic were identified only in SWAP, among them metabolic processes, cellular transport and development/signaling (Figure 2B).

When analyzing the functions of the peptides present in MIM, it was found that the proteins were predominantly related to cellular transport, metabolic and structural processes, and modulation of immune response (Figure 2A). Albumin, Serotransferrin, Alpha-fetoprotein, Alpha actin 3 and 4 and Interleukin-17F were found in this milk profile only (Table 1).

DISCUSSÃO

The immunomodulatory potential of the milk of mothers with schistosomiasis has already been demonstrated experimentally [11,12,37], together with the presence of antigens of *S. mansoni* in offspring breastfed by infected mothers [38]. The present study, for the first

time, characterized the proteins and biomarkers of the milk of mice infected with *S. mansoni* using proteomics in order to describe their immunomodulatory components. It was observed that the Milk of Infected Mothers had dynamic properties, due to the presence of proteins with distinct biological functions. Among these, immunomodulatory potential, metabolic processes and cellular transport proteins may be found in eggs and adult worms.

The number of proteins identified in the present study was considerably lower than in trials based on the serum of individuals with schistosomiasis [39], the extraction of different evolutionary forms of *Schistosoma sp* [26,27,40,41,42], and human [43] and animal [44] breast milk. However, a limitation in the identification of peptides is commonly described in literature [46,47,48] even with the identification of large numbers of bands, as observed in the present study.

Peptides present in murine milk have also been described in human breast milk, with biological functions similar to those found in the present study (cellular transport and signaling, metabolic pathways, protein synthesis and modulation of immune response) [49]. The predominant presence of albumin in the analyzed bands was expected, as this peptide is widely described in the skimmed portion of breast milk [45,50]. Additionally, among the other proteins found in the present study, it should be noted that serotransferrin and alpha actin have also already been described as constituents of human milk [45,51,52].

Albumin was identified in most of the bands studied from the milk of mice infected by *S. mansoni*. Its presence seems to influence not only the nature of milk but also of parasitic infection. Nogueira et al (2010) [53], in a study of human serum, identified the presence of albumin in individuals with schistosomiasis. Other authors have reported the presence of a peptide, originating from the helminth eggs (Sm-p150/166) which is homologous with the albumin of various species. When studying its immunomodulatory capacity experimentally, a strong T CD4⁺ cell response and Th1 and Th2 profile cytokines [54] were demonstrated. A search of the *S. mansoni* database (EST database) revealed several clones that were demonstrated to be encoders of proteins homologous with albumin. However, the recombinant of this peptide did not present significant lymphoproliferative activity or induce cytokine production, which could be associated with the dependence of the complete protein to induce the stimulatory effect previously described [30].

It was observed that some of the parasitic components present in breast milk originated from adult eggs or worms, as the presence of proteins that have been previously

described in samples of *S. mansoni* samples in the milk of infected mothers was identified. Among them was Glutathione S Transferase (GST), widely described in literature as a component of eggs and worms of *S.mansoni* [55,56,57]. In the present study this was identified not only in the milk of infected mothers, but also in analysis of the soluble egg antigens, which identified a polypeptide of 26kDa, similar to the findings of the studies of Tiu et al (1988) [58]. Other authors have shown that this protein can be presented in two isoforms (Sm26 and Sm28), with variations of their molecular weights as well as in their immunomodulatory capabilities as homologous antigens [59,60]. Based on homology with the Sm26 isoform, a polypeptide of 29kDa fractions derived from fractions of *Schistosoma* has been recognized by hybridomas of T cells, and has been studied for its immunogenicity [30,57]. More recently, Curwen et al (2004) [27] identified GST (26kDa) among the soluble proteins derived from the preparation of cercariae, schistosomules, adult worms and eggs. In contrast, the present study did not observe this peptide in soluble extracts of adult worms, which may be a result of the experimental conditions, including the method used to separate proteins.

Other proteins that are worth highlighting are Alpha actin 3 and 4, which have been identified in milk samples from infected mothers. These results suggest the presence of parasitic components in the milk of mothers with schistosomiasis, as a previous study demonstrated the presence of actin in the preparation of cercariae, schistosomules, adult worms and eggs [27]. Reinforcing the findings of the present study, Ribeiro et al (2012) [39], in a study to identify adult worm proteins recognized in serum from infected individuals, identified the presence of actin in these samples.

The profile of proinflammatory Th17 immune response is related to the production of IL-17 and IL-23 [61], and its participation during schistosomiasis has been associated with serious disease in animals with a polarized Th1 profile [62]. In addition, its participation in the humoral immune response has been demonstrated, where the production of antibodies of mice genetically deficient mice in the production of IL-17 or IL-23 was drastically impaired [63,64]. In the present study, interleukin 17F was detected in the milk of mothers with schistosomiasis, which may be related to the increased strength of the previously reported humoral immune response [11,37].

Proteomic studies have revealed that SEA proteins present a wide variety of functions and targets both inside and outside the cell [42,66]. In keeping with previous studies, the

proteins found here have been previously described in literature and listed by the World Health Organization as strong candidates for vaccination [27,39,71,72]. In the present study the presence of 31 proteins was detected in SEA samples that underwent spectrometry, but only three of these were statistically significant and included in the analysis. It was observed that these peptides are related to development/signaling processes and metabolism. Among them, the presence of the protein myosin is worthy of note. This peptide has been previously described in the different evolutionary forms of *Schistosoma mansoni* [27,55,56,57,58]. However, the present study did not identify myosin in samples of soluble antigens of adult worms. By examining the ability of SEA fractions to stimulate proliferation of CD4 + Th cells isolated from *S. mansoni* infected mice, not only Sm-p40, but, phosphoenolpyruvate carboxykinase, peroxiredoxin 1, SmEP25, glutathione S-transferase and p150 / 166 (albumin) proteins have been identified [30], with the latter two proteins also observed in the present study.

In terms of the association between milk of non-infected mothers (MNIM) and soluble egg antigen of *S.mansoni* (SEA), a different pattern to that obtained using SEA only was observed. In the case of the latter procedure, the presence of the previously described peptide Myosin 9 [29,55,56,57,58] was observed, while this was not detected when SEA was combined with milk. The peptides described in this scenario (MNIM + SEA) are related to development / signaling processes. Another aspect related to the limited presence of peptides is the presence of bands that are strongly immunogenic, but weakly visible or not visible at all [39], and therefore not selected for mass spectrometry.

Soluble adult worm preparation (SWAP) was used with the aim of describing the possible proteins originating from parasites exposed to the immune system of breastfeeding offspring. Although 16 peptides were identified in SWAP, only five were significantly present, in contrast to previous studies which identified a higher number of proteins specifically in the integument of the worm [25,39,73]. This discrepancy can be explained by methodological differences. Presumptive identification of the peptides in SWAP showed that these were involved in metabolic processes, cellular transport and development/signaling, as reported in previous studies [73].

In conclusion, the results of the present study demonstrate that the milk of mothers with schistosomiasis features peptides related to the presence of *S.mansoni*, and that have a variety of functions. The immunomodulatory nature of the peptides identified in the present

study, which can act in immune processes, either as parasite or heterologous antigens, in previously breastfed offspring, is significant. While care should be taken with the extrapolation of data from studies with experimental animals to humans, these findings reiterate the importance of identifying and characterizing parasite antigens, and their role in parasite-host interaction at the beginning of life, which can be reflected in immunoregulatory events observed in patients in areas where schistosomiasis is endemic.

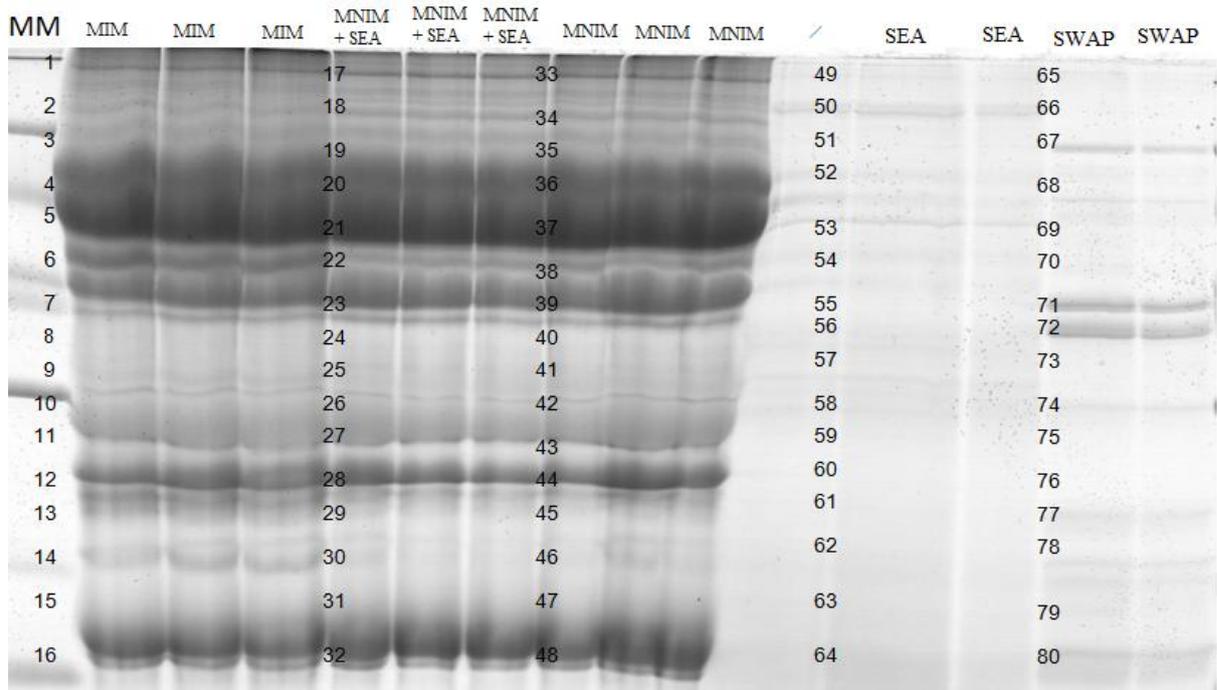


Fig 1: Location of fragments excised from SDS-PAGE (1D) gel of Breast Milk of *Swiss Webster* Mice and parasite antigens of *S.mansoni*. (MM — Molecular Marker; MIM: Milk of Mothers Infected with *S.mansoni*; MNIM + SEA: Milk of Non-Infected Mothers with added Soluble Egg Antigen of *S.mansoni* (SEA); MNIM: Milk of Non-Infected Mothers; SEA: Soluble Egg Antigen of *S.mansoni*; SWAP: Soluble Adult Worm Antigen Preparation; 1-80: Numbering of gel bands).

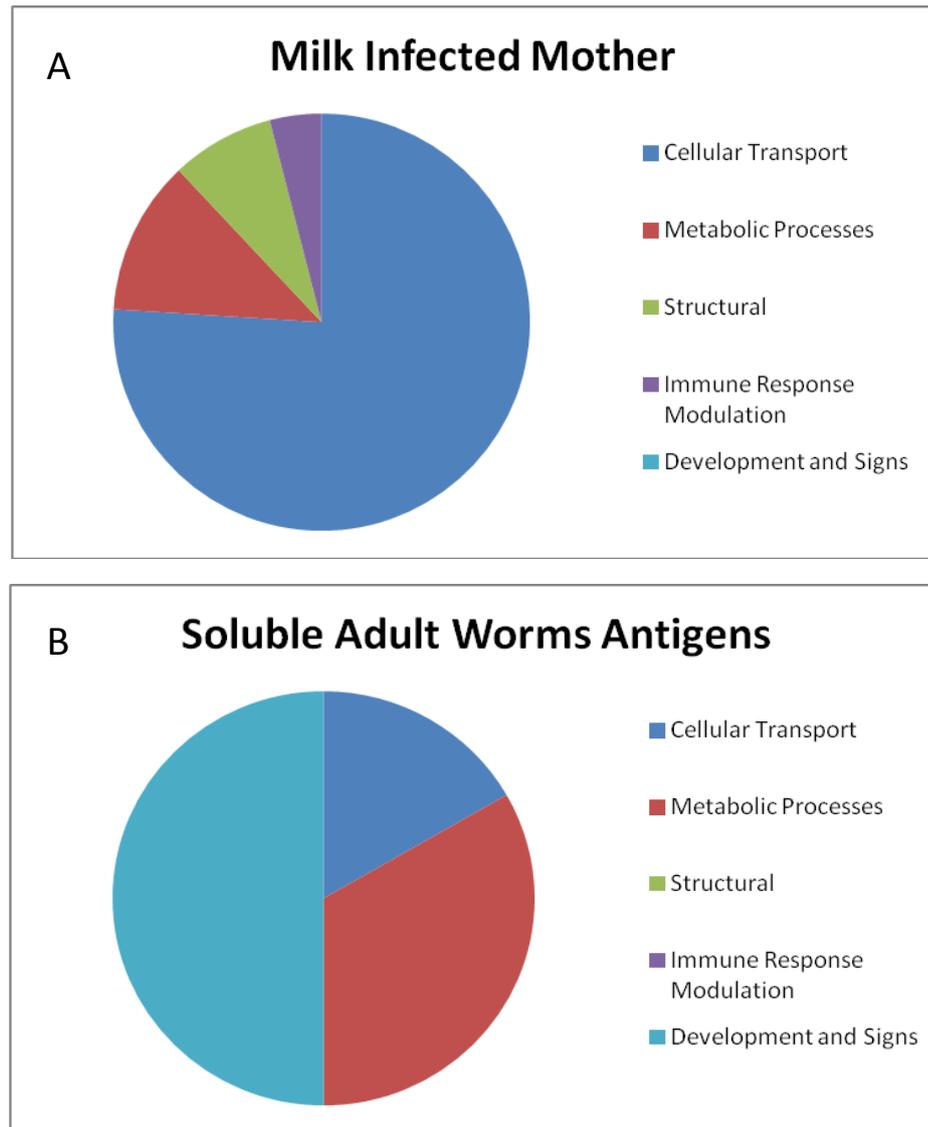


Fig 2: Ontological annotation of peptides identified in Milk of Mothers Infected with *S.mansoni* (MIM) (A) and in Soluble Adult Worm Antigen Preparation of *S.mansoni* (SWAP) (B) using the Gene Ontology tool of the UNIPROT database

Table 1: Presumptive identification of peptides detected in sections of SDS-PAGE (1D) of samples of Breast Milk of *Swiss Webster* mice and parasite antigens of *S.mansoni*. (MIM: Milk of Mothers Infected with *S.mansoni*; MNIM + SEA: Milk of Non-Infected Mothers with added Soluble Egg Antigen of *S.mansoni* (SEA); MNIM: Milk of Non-Infected Mothers; SEA: Soluble Egg Antigen of *S.mansoni*; SWAP: Soluble Adult Worm Antigen Preparation against database (M: Mascot; G: NCBI).

Gel fragment	Peptide	Databases	Access	Identification	Peptides Presumed	Score	<i>e</i> -value	Molecular weight	Id%
4 -MIM	AADKDTCFSTEGPNLVTR	M	ALBU_MOUSE	Albumin	Cellular Transport	63	0.008	70700	24%
	KPVKDFASCHLAQAPNHVVVSR	M	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	Metabolic Processes	78	0.00027	78841	28%
	AVLTSQETLFGGSDCTGNFCLFK	G	gi 74178118	unnamed protein product	Cellular Transport	77	0.0034	78840	28%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	unnamed protein product	Cellular Transport	68	0.029	67013	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	M	ALBU_MOUSE	Albumin	Cellular Transport	124	6.7e-09	70700	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26340966	unnamed protein product	Cellular Transport	124	7e-08	70730	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 163310765	unnamed protein product	Cellular Transport	124	7e-08	70700	26%
5 - MIM	MLLEYTDSSYDEK	M	GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase	Metabolic Processes	55	0,05	26067	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 74137565	unnamed protein product	Cellular Transport	123	8.9e-08	70740	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	unnamed protein product	Cellular Transport	116	4.4e-07	67013	26%
	ENPTTFMGHYLHEVAR	G	gi 191765	alpha-fetoprotein, partial	Cellular Transport	81	0.0015	48792	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	M	ALBU_MOUSE	Albumin	Cellular Transport	63	0.008	70700	24%
6 - MIM	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	unnamed protein product	Cellular Transport	73	0.0083	67013	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26340966	unnamed protein product	Cellular Transport	70	0.017	70730	26%

	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 163310765	Albumin	Cellular Transport	70	0.017	70700	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 74137565	unnamed protein product	Cellular Transport	70	0.017	70740	26%
	TVPWLENRVGEPMSAMQR	M	ACTN3_MOUSE	Alpha-actinin-3	Structural	69	0.0022	103605	18%
7 - MIM	TVPWLENRVGEPMSAMQR	G	gi 148701128	Alpha-actinin 4	Structural	70	0,019	100172	19%
	AGVPALQKAGNCPLEDNTVR	M	IL17F_MOUSE	Interleukin-17F	Immune Response Modulation	55	0,05	18328	19%
8 - MIM	AQDKAAIQLSELEEEMDQR	M	RASEF_MOUSE	Ras and EF-hand domain-containing protein homolog	Metabolic Processes	56	0,04	71279	16%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	M	ALBU_MOUSE	Albumin	Cellular Transport	70	0.0016	70700	24%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26341396	unnamed protein product	Cellular Transport	73	0.0083	67013	26%
14 - MIM	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 26340966	unnamed protein product	Cellular Transport	70	0.017	70730	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 163310765	unnamed protein product	Cellular Transport	70	0.017	70700	26%
	AADKDTCFSTEGPNLVTR	G	gi 74137565	unnamed protein product	Cellular Transport	70	0.017	70740	26%
22 - MNIM+SEA	DQSPASHEIATNLGDFAIPLYR	M	A1AT3_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-3	Development and Signs	64	0,0073	45966	23%
	DQSPASHEIATNLGDFAIPLYR	M	A1AT1_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-1	Development and Signs	64	0,0075	46145	23%
38 - MNIM	TVPWLENRVGEPMSAMQR	M	ACTN3_MOUSE	Alpha-actinin-3	Structural	69	0,039	103605	18%
	HEMPPHIYAITDTAYRSMQDR	M	MYH9_MOUSE	Miosin 9	Development and Signs	72	0,0011	227429	10%
50 - SEA	MLLEYTDSSYDEK	M	GSTM1_MOUSE	Glutathione S-transferase	Metabolic Processes	55	0,05	26067	26%
	IAQLEEELEEEQGNTELIND	G	gi 28277050	Myh9 protein, partial	Development and Signs	73	0,0093	103452	16%
	TNFDAFPDKVAIQLNDTHPSLA�PE LMR	M	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	Metabolic Processes	136	4.2e-10	97681	35%
67 - SWAP	TNFDAFPDKVAIQLNDTHPSLA�PE LMR	G	gi 6755256	Glycogen phosphorylase, muscle form	Metabolic Processes	136	4.4e-09	97681	35%
74 - SWAP	FEQDTSQSMQVLVEIDQVKSR	M	COG7_MOUSE	Conserved oligomeric	Cellular Transport	63	0,008	86645	22%

Golgi complex subunit 7										
77 - SWAP	TAGEHLGVTFRVEGGELVIAR	M	MPP2_MOUSE	MAGUK p55 subfamily member 2	Development and Signs	65	0,0058	61802	19%	
	TAGEHLGVTFRVEGGELVIAR	G	gi 568974714	MAGUK p55 subfamily member 2 isoform X1	Development and Signs	66	0,045	63634	19%	
79 -SWAP	LFGVSFEFCFASPLNCYFR	M	PCIF1_MOUSE	phosphorylated CTD-interacting factor 1	Development and Signs	63	0.0084	81423	16%	

REFERENCIAS

1. Friedman JF, Mital P, Kanzaria HK, Olds GR, Kurtis JD. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends parasitol.* 2007; 23:159-64.
2. Salawu OT, Odaibo AB. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *Int. j. gynaecol. obstet.* 2013; 122: 1-4.
3. Fonseca, F. et.al. Spatial modeling of the schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. *Acta trop.* 2014; 133:56–63.
4. Gryseels B. Schistosomiasis. *Infect. dis. clin. north. am.* 2012; 26: 383–397.
5. Barsoum RS, Esmat G, El-bazb T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *J. adv. res.* 2013; 4: 433–444.
6. Scheer, S. et.al. A novel tool to identify the relative contribution of lymphoid cell types that contribute to IL-10 production during the infection with *Schistosoma mansoni*. *J. immune. Methods.* 2014; 406: 66-73.
7. Eissa AM, Saad MA, Abdel Ghaffar AK, el-Sharkaway IM, Kamal KA. Transmission of lymphocyte responsiveness to schistosomal antigens by breast feeding. *Trop. geogr. med.* 1989; 41: 208-212.
8. Noureldin MS, Shaltout AA. Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. *J. egypt. soc parasitol.* 1998; 28: 539-550.
9. Colley DG, Montesano MA, Freeman GL, Secor WE. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes Infect.* 1999; 1: 517-524.
10. Othman AA, Shoheib ZS, Saied EM, Soliman RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology.* 2010; 215: 101-112, doi 10.1016/j.imbio.2009.04.004.
11. Santos PA, Sales IR, Schirato GV, Costa VMA, Albuquerque MCPA, Souza, VMO₂ et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *J. parasitol. res.* 2010;107: 95–102.
12. Santos PA, Lorena VMB, Fernandes E, Sales IRF, Albuquerque MCPA, Gomes Y, et.al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Exp. parasitol.* 2014;141:62–67.
13. Kent JC. How Breastfeeding Works. *J. midwifery womens health.* 2007; 52: 564-572.
14. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nat. immunol.* 2001; 2: 671-672.
15. Blewett HJH, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. *Adv. food. nutr. res.* 2008;54:45-80.

16. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. clin. north. am.* 2013; 60: 49-74.
17. Malanchère E, Huetz F, Coutinho A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *Eur. j. immunol.* 1997;27: 788-793.
18. Boumahrou N, Andrei S, Miranda G, Henry C, Panthier J.J, Martin P, S. Bellier. The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60 (3):113-8.
19. Thomas P G, Harn Jr D A. Immune biasing by helminth glycans. *Cell. microb.* 2004; 6:13–22.
20. Bhargava P, Li C, Stanya KJ, Jacobi D, Dai L, Liu S. et.al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. *Nat. med.* 2012; 18:1665-1672.
21. K. J. van Wijk. Challenges and Prospects of Plant Proteomics. *Plant Physiol.* 200; 126(2): 501–508. Curwen RS, Ashton PD, Sundaralingam S, Wilson RA Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Mol. cell proteomics.* 2006; 5: 835-844.
22. Curwen RS, Ashton PD, Sundaralingam S & Wilson RA. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. *Mol. Cell Proteomics.* 2006; 5, 835-844.
23. Knudsen GM, Medzihradzky K, Lim KC, Hansell E, Mckerrow JH. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions. *Mol. cell proteomics.* 2005; 4:1862-1875.
24. Perez-sanchez R, Ramajo-Hernandez A, Ramajo-Martin V, Oleaga Dr A Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics.* 2006; 6 Suppl 1, S226-S236
25. van Balkom BW, van Gestel RA, Brouwers JF, Krijgsveld J, Tielens AG, Heck AJ & van Hellemond JJ. Mass spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. *J. Proteome. Res.* 2005; 4, 958-966.
26. Cheng GF, Lin JJ, Feng XG, Fu ZQ, Jin YM, Yuan CX et.al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between the male and female worm of *Schistosoma japonicum* after pairing. *Proteomics.* 2005; 5: 511-521.
27. Curwen RS, Ashton PD, Johnston DA, Wilson RA. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Mol. biochem. parasitol.* 2004; 138:57–66. L
28. Steinfelder S, Andersen JF, Cannons JL, Feng CF, Joshi M, Dwyer D, 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.* 2009; 206:1681-1690.
29. Van liempt E, Van Vliet SJ, Engering A, Vallejo JGG, Bank CMC, Sanchez-Hernandez M, et al. *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.* 2007; 44: 2605–2615.
30. Asahi H, Stadecker MJ. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. *Parasitol int.* 2003; 52: 361-367.
 31. Hewitson JP, Grainger J R, Maizels RM. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. biochem. parasitol.* 2009; 167:1–11.
 32. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. inst. med. trop.* 1972; 14: 397-400.
 33. Wang H, Herath CB, Xia G, Watanabe G, Taya K. Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. *Reproduction.* 2001; 122: 809–816.
 34. Moriya H, Uchida K, Okajima T, Matsuda T, Nadano D. Secretion of three enzymes for fatty acid synthesis into mouse milk in association with fat globules, and rapid decrease of the secreted enzymes by treatment with rapamycin. *Arch Biochem Biophys.* 2011; 1;508(1):87-92. doi: 10.1016/j.abb.2011.01.015
 35. Gazzinelli, G., Katz, N., Rocha, R.S., Colley, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol.* 1983; 130: 2891-5.
 36. Candiano, G; Bruschi, M; Musante, L; Santicci, L; Ghiggeri, G.M; Carnemolla, B; Orecchia, P; Zardi, L; Righetti, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoreses.* 2004; 25 (9): 1327-1333.
 37. Sales, Iana Rafaela Fernandes. Cinética de produção de anticorpos anti-ovalbumina em camundongos adultos sensibilizados com antígenos do *Schistosoma mansoni* na fase de amamentação. 85 folhas: Il., fig., 30cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.
 38. Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-emshaty HM, Elsheikha HM. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *Am. j. trop. med. hyg.* 2003; 68: 647-651.
 39. Ribeiro, Fernanda Ludolf. Seleção de um painel de antígenos biomarcadores de *Schistosoma mansoni* através de análises do proteoma sorológico. Belo Horizonte; s.n; 2012. 133 p. ilus.
 40. Liu F, Lu J, Hu W, Wang SY, Cui SJ, Chi M et.al. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. *PLoS. pathog.* 2006; 2:0268-0281.
 41. Yang LL, Lv ZY, Hu SM, He SJ, Li Zy Zhang SM, et.al. *Schistosoma japonicum*: proteomics analysis of differentially expressed proteins from ultraviolet-attenuated cercariae compared to normal cercariae. *Parasitol. res.* 2009; 105:237-248.

42. Mathieson W, Wilson R A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. *Int. j. parasitol.* 2011; 40: 617–628.
43. Mange A, Bellet V, Tuailon E, Van de Perre P, Solassol J. Comprehensive proteomic analysis of the human milk proteome: Contribution of protein fractionation. *J. chromatogr. b.* 2008; 876: 252-25615.
44. Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A Bonizzi L. Farm animal milk proteomics. *J. proteome.* 2012 ;75:4259–427.
45. Roncada P, Stipetic LH, Bonizzi L, Burchmore RJS, Kennedy MW et.al. Proteomics as a tool to explore human milk in health and disease. *J. proteom.* 2013; 88: 47–57.
46. Murakami K, Lagarde M, Yuki Y. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998;19: 2521-2527.
47. Fortunato D, Giuffrida MG, Cavalletto M, Garoffo LP, Delavalle G, Napolitano L et.al. Structural proteome of human colostrum fat globule membrane proteins. *Proteomics.* 2003;3: 897–905.
48. Cavalletto M, Giuffrida MG, Conti A. The proteomic approach to analysis of human milk fat globule membrane. *Clin. chim. acta.* 2004; 347:41-48.
49. Picariello G, Ferranti P, Mamone G, Klouckova I, Mechref Y, Novotny MV, Addeo F. Gel-free shotgun proteomic analysis of human milk. *J. Chromatogr A.* 2012; 1227: 219–233.
50. D'alessandro A, Scaloni A, Zolla L. Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview. *J. proteome res.* 2010;9: 3339–3373.
51. Casado B, Affolter M, Kussmann M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. *J. proteomics.* 2009; 73: 196-208.
52. German JB, Dillard CJ, Ward RE. Bioactive components in milk. *Curr. opin. clin. nutr. metab. care.* 2002; 5: 653-8.
53. Nogueira, A.C.F. Identificação de glicoproteínas em indivíduos saudáveis e portadores de esquistossomose mansônica hepatoesplênica. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2010.
54. Asahi H, Hernandez HJ, Stadecker MJ. A novel 62-kilodalton egg antigen from *Schistosoma mansoni* induces a potent CD4⁺T helper cell response in the C57BL/6 mouse. *Infect. immun.* 1999; 67: 1729 –1735.
55. McNair AT, Dissous C, Duvaux-Miret O, Capron A. Cloning and characterisation of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene.* 1993;124:245-249.

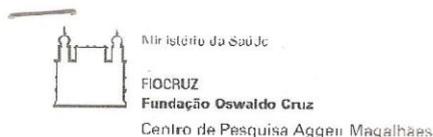
56. Pierce RJ, Khalife J, Williams DL, Kanno R, Trottein F, Lepresle T et.al. *Schistosoma mansoni*: Characterization of Sequence Variants of the 28-kDa Glutathione S- Transferase. *Exp. parasitol.* 1994; 79: 81–84.
57. Wright MD, Harrison RA, Melder AM, Newport GR, Mitchell GF. Another 26-kilodalton glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 49:177–180.
58. Tiu WU, Davern KM, Wright MD, Board PG, Mitchell GF. Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite immunol.* 1988; 10: 693–706.
59. Balloul JM, Sondermeyer P, Dreyer D, Capron M, Grzych JM, Pierce RJ. et.al. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* 1987;326:149–153.
60. Mitchell GF, Garcia EG, Davern KM, Tiu WU, Smit DB. Sensitization against the parasite antigen Sj26 is not sufficient for consistent expression of resistance to *Schistosoma japonicum* in mice. *Trans. r. soc. trop. med. hyg.* 1988;82:885–889.
61. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et. al. A distinct lineage of CD4T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. immunol.* 2005; 6:1133–1141.
62. Rutitzky, L.I.; Stadecker, M.J. CD4 T cells producing proinflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. *Mem. inst. oswaldo cruz.* 2006;101:327–330.
63. Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 2002; 17: 375–387.
64. Ghilardi N, Kljavin N, Chen Q, Lucas S, Gurney AL, Sauvage FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23- deficient mice. *J. immunol.* 2004;172:2827–2833.
65. Stadecker, M.J.; Hernandez, H.J.; Asahi, H. The identification and characterization of new immunogenic egg components: implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Mem. inst. oswaldo cruz* 2001;96: 29–33.
66. Ashton P, Harrop R, Shah B, Wilson RA. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology.* 2001; 122: 329–338.
67. Guo Y., Feinberg H., Conroy E., Mitchell D. A., Alvarez R., Blixt O., et al. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11: 591–598.
68. Saunders S. P., Walsh C. M., Barlow J. L., Mangan N. E., Taylor P. R., McKenzie A. N., et al. The C-type lectin SIGNR1 binds *Schistosoma mansoni* antigens in vitro, but SIGNR1-deficient mice have normal responses during schistosome infection. *Infect. Immun.* 2009; 77: 399–404.

69. Ritter M., Gross O., Kays S., Ruland J., Nimmerjahn F., Saijo S., et al. *Schistosoma mansoni* triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107: 20459–20464.
70. Tundup S., Srivastava L., Harn D. A., Jr. Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012; 1253: 1–13.
71. Capron A, Capron M, Riveau G. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. *Br. med. bull.* 2002; 62: 139-148.
72. Capron A, Riveau G, Capron M. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends parasitol.* 2005; 21:143-149.
73. Braschi S, Borges WC, Wilson RA. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Mem. inst. Oswaldo. Cruz,* 2006; 101:205-212.



ANEXOS

ANEXO A: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - CPqAM/FIOCRUZ).



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 CEJAVCPqAM
Recife - Brasil

Dra Eridan de Medeiros Coutinho

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA/CPqAM)

Recife, 13 de Fevereiro de 2012

Carta - Resposta

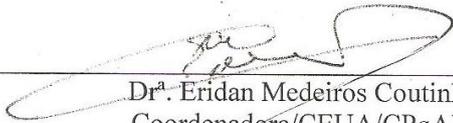
Projeto nº 25/2011

Ao pesquisador: **YARA DE MIRANDA GOMES**

Informo que o projeto "**PERFIL DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS E CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS DE CAMUNDONGOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS EM RESPOSTA AO LEITE MATERNO E OVALBUMINA**" proposto por V.S. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em reunião dia 24/11/2011, seguindo, anexo o respectivo Certificado de Aprovação pela Secretaria da CEUA/CPqAM.

Cordialmente,

Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D
Pesquisadora Emérita da FIOCRUZ
Coordenadora da CEUA/CPqAM
Recife - Brasil



Dr^a. Eridan Medeiros Coutinho
Coordenadora/CEUA/CPqAM.

Aprovado (X)

Comprovante eletrônico de submissão do Artigo 1 e Normas para publicação da revista:
Parasite Immunology

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-3024/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-3024/homepage/ForAuthors.html)

Get Sample Copy
Recommend to Your Librarian

JOURNAL MENU
Journal Home

FIND ISSUES
Current Issue
All Issues

FIND ARTICLES
Accepted Articles

GET ACCESS
Subscribe / Renew

FOR CONTRIBUTORS
OnlineOpen
Author Guidelines
Submit an Article

ABOUT THIS JOURNAL
News
Overview
Editorial Board
Permissions
Advertise
Contact

SPECIAL FEATURES
Author Resources
Top 10 Reviews
Top 10 Research Articles
Wiley Job Network
Ectoparasites Virtual Issue
Helminth Virtual Issue
Call for papers
Online Only from 2014
How to register for table of contents alerts

Parasite Immunology

© John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Eleanor M. Riley and Richard K. Grencis
Impact Factor: 1.849
ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 18/37 (Parasitology); 118/144 (Immunology)
Online ISSN: 1365-3024

Author Guidelines

If you have a query please contact the Managing Editor at PIMEdOffice@wiley.com.

Quick Links

- Click [here](#) to see why you should submit to *Parasite Immunology*
- Click [here](#) to submit your paper today
- Journal [overview](#)

Manuscript Submission

All papers must be submitted via [ScholarOne Manuscripts](#).

Authors may wish to consult an appropriate member of the [Editorial Board](#) prior to submission of material.

On submission you will need: (1) the type of your paper (original paper, brief definitive report, Review) (2) the full title of your paper (limited to 120 characters), (3) the abstract (limited to 200 words), (4) up to six keywords, (5) the full names and affiliations of all authors, (6) details of preferred and/or non-preferred reviewers (optional), (7) a cover letter, (8) a manuscript keyword, (9) to answer questions regarding the Woods Hole Immuno-Parasitology Prize, human tissues and animal experimentation, (10) to complete and upload a Conflict of Interest form for each author, (11) to adhere to the ARRIVE guidelines, and (12) to upload the appropriate files and forms.

Submissions should be prepared using double-line spacing, a minimum of 1 inch margins, and 12

SEARCH

In this journal

Advanced > Saved Searches >

You're busy.

Take out the effort by creating tailored job alerts on Wiley's global job board.

GO



Wiley

ANEXO C: Comprovante eletrônico de submissão do Artigo 2 e Normas para publicação da revista: *Molecular and Biochemical Parasitology (Print)- 1872-9428*

<http://www.elsevier.com/journals/molecular-and-biochemical-parasitology/0166-6851/guide-for-authors>



MBP
MOLECULAR AND
BIOCHEMICAL
PARASITOLOGY

Browse journals > Molecular and Biochemical Parasitology > Guide for authors

Guide for Authors

 [Author information pack](#)

- Your Paper Your Way

INTRODUCTION

BEFORE YOU BEGIN

- Ethics in publishing
- Conflict of interest
- Submission declaration and verification
- Changes to authorship
- Copyright
- Role of the funding source
- Funding body agreements and policies
- Open access
- Language (usage and editing services)
- Referees

PREPARATION

- NEW SUBMISSIONS
- References
- Formatting requirements
- REVISED SUBMISSIONS
- Article structure
- Essential title page information
- Abstract
- Graphical abstract
- Highlights
- Keywords
- Abbreviations
- Acknowledgements
- Database linking
- Footnotes

- Artwork
- Illustration services
- Tables
- References
- Video data
- AudioSlides
- Supplementary data
- Submission checklist

AFTER ACCEPTANCE

- Use of the Digital Object Identifier
- Online proof correction
- Offprints

AUTHOR INQUIRIES

[Guide for authors](#)

[Submit your paper](#)

[Track your paper](#)

[Order journal](#)

[View articles](#)

[Abstracting and indexing](#)

[Editorial board](#)