



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

**EFEITOS DA AMAMENTAÇÃO EM CAMUNDOGOS
ESQUISTOSSOMÓTICOS NA IMUNIDADE ANTI-OVALBUMINA DE
DESCENDENTES ADULTOS DEFICIENTES NA PRODUÇÃO DAS
CITOCINAS IL-12/IL-23**

FABIANA LETICIA DA SILVA

**RECIFE - PE
2014**

FABIANA LETICIA DA SILVA



**EFEITOS DA AMAMENTAÇÃO EM CAMUNDOGOS
ESQUISTOSSOMÓTICOS NA IMUNIDADE ANTI-OVALBUMINA DE
DESCENDENTES ADULTOS DEFICIENTES NA PRODUÇÃO DAS
CITOCINAS IL-12/IL-23**

Tese apresentada à banca examinadora
do 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
Doutora em Medicina Tropical.
Área de concentração: Doenças
Infecciosas e Parasitárias

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. VALDÊNIA MARIA OLIVEIRA DE SOUZA

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. CLARICE NEUENSCHWANDER LINS DE MORAIS

**RECIFE - PE
2014**

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

S586e Silva, Fabiana Leticia da.

Efeitos da amamentação em camundongos esquistossomóticos na imunidade anti-ovalbumina de descendentes adultos deficientes na produção das citocinas IL-12/IL-23/ Fabiana Leticia da Silva. – Recife: O autor, 2014.

144 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Inclui Referências, apêndices e anexos.

1. Esquistossomose mansonii. 2. Aleitamento Materno. 3. Imunidade Celular. 4. Imunidade Humoral. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-001)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

FABIANA LETÍCIA DA SILVA

No dia 27 de agosto 2014, às 08h30, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa – Presidente da Banca (UFPE), a Pesquisadora Drª. Virgínia Maria Barros de Lorena (CPqAM/FIOCRUZ), a Pesquisadora Drª. Andréia Ferreira de Barros (CPqAM/FIOCRUZ), a Pesquisadora Dra. Patrícia d’Emery Alves Santos (UFPE) e o Prof. Dr. André de Lima Aires (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **FABIANA LETÍCIA DA SILVA** sobre a sua Tese intitulada “Efeito da amamentação em camundogos esquistossomóticos na imunidade anti-ovalbumina de descendentes adultos deficientes na produção das citocinas IL-12/IL-23”, 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

Pesquisadora Drª. Virgínia Maria Barros de Lorena

APROVADA

Pesquisadora Drª. Andréia Ferreira de Barros

APROVADA

Pesquisadora Drª. Patrícia d’Emery Alves Santos

APROVADA

Prof. Dr. André de Lima Aires

Aprovada

Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa

Pesquisadora Drª. Virgínia Maria Barros de Lorena

Pesquisadora Drª. Andréia Ferreira de Barros

Pesquisadora Drª. Patrícia d’Emery Alves Santos

Prof. Dr. André de Lima Aires



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 DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

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 Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vlăudia Maria Assis Costa

**Efeitos da amamentação em camundogos esquistossomóticos na
imunidade anti-ovalbumina de descendentes adultos deficientes na
produção das citocinas IL-12/IL-23**

Doutoranda: **Fabiana Leticia da Silva**

Data da defesa: 27 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA:

Membros Titulares

Profª Drª. Vláudia Maria Assis Costa

(Departamento de Medicina Tropical - UFPE)

Drª. Virginia Maria Barros de Lorena

(Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ)

Drª. Patrícia D`Emery Alves Santos

(Departamento de Medicina Tropical - UFPE)

Drª. Andréia Ferreira de Barros

(Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ)

Prof Dr. André de Lima Aires

(Departamento de Medicina Tropical - UFPE)

Membros Suplentes

Profª Drª. Maria Amélia Vieira Maciel

(Departamento de Medicina Tropical - UFPE)

Profª Drª. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

(Departamento de Medicina Tropical – UFPE)

Dedico este trabalho aos meus amados pais, por todo amor, incentivo, dedicação e, principalmente, pelo imenso esforço que fizeram durante toda vida, para que eu sempre tivesse as melhores oportunidades dentro daquilo que eles podiam me oferecer.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela saúde;

A Santa Rita de Cássia, pelo socorro nos momentos de aflição;

À minha família: pais, esposo e filho pelo amor, compreensão, incentivo e colaboração;

Às minhas orientadoras, Dr^a. Valdênia Souza e Dr^a. Clarice Moraes, pela confiança e oportunidade;

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UPFE);

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ);

Ao Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ;

Ao Biotério do CPqAM/FIOCRUZ;

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro.

E, a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

Tudo posso n' Aquele que me fortalece!

Filipenses, capítulo 4, versículo 13.

RESUMO

O contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas induziu, em camundongos adultos, potencialização da produção de anticorpos e aumento da capacidade de apresentação de antígeno pelos linfócitos B, em resposta ao antígeno heterólogo ovalbumina (OVA). Considerando a imunização com OVA um modelo vacinal, as reações inflamatórias e a produção de anticorpos em resposta a esse antígeno são importantes para o desenvolvimento de uma imunidade satisfatória do hospedeiro. Nesse sentido, as células Th1 e Th17 são importantes fatores para o desenvolvimento dessas respostas. Dessa forma, os camundongos deficientes na produção de IL-12/IL-23 (12p40 knockout-KO) são predispostos a desenvolverem uma resposta Th2 polarizada, tornando-se menos responsivos às vacinações. Diante disso, o presente trabalho investigou o efeito da amamentação em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* sobre as imunidades humoral e celular de camundongos adultos C57BL/6 12p40 KO, em resposta ao modelo vacinal acima citado. Foram avaliados: a cinética das reações de hipersensibilidade *in vivo*; os níveis plasmáticos das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a; a produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β pelas células esplênicas e a reação inflamatória provocada no coxim plantar. Para isso, camundongos machos, deficientes na produção de IL-12 e IL-23 (IL-12p40 KO) e camundongos selvagens (*wild-type*/WT) foram divididos nos seguintes grupos: camundongos IL-12p40 KO amamentados em mães infectadas (AI IL-12p40 KO); camundongos IL-12p40 KO amamentados em mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO); camundongos selvagens amamentados em mães infectadas (AI WT) e camundongos selvagens amamentados em mães sem infecção (NANI WT). Cinquenta por cento dos animais de cada grupo foram imunizados com OVA em adjuvante. Os outros 50% por cento restantes permaneceram sem imunização. No grupo AI WT houve aumento de produção de IgG2a, IL-5, TGF- β e IL-6, com baixos níveis de IL-17, em comparação ao NANI WT. Nos animais AI IL-12p40 KO, a produção de IgG2a, IL-5 e TGF- β foi mais alta do que o grupo NANI IL-12p40 KO e similar ao grupo AI WT, mas a produção de IL-6 foi mais baixa. O grupo AI WT mostrou intenso infiltrado inflamatório de eosinófilos na reação de hipersensibilidade tardia (RHT), com acentuado edema em comparação com o edema menos intenso e infiltrado inflamatório de neutrófilos do grupo NANI WT. Os animais NANI IL-12p40 KO e AI IL-12p40 KO não apresentam RHT, porém a reação inflamatória no AI IL-12p40 KO foi menos intensa que nos NANI IL-12p40 KO. Em conclusão, o contato com antígenos do parasito, através da amamentação, induziu, no descendente adulto, uma melhor resposta de anticorpo neutralizante, mesmo diante da deficiência na produção de IL-12 e IL-23. Nesta condição, embora tenha havido uma notável produção de IL-5, a lactação em mães infectadas atenuou a reação inflamatória, provavelmente através da regulação cruzada entre TGF- β e IL-6, modulando, desta forma, o *status* de hiperativação desses animais.

Palavras-chave: Esquistossomose mansônica. Amamentação. Imunidade celular. Imunidade humoral.

ABSTRACT

The previous contact with mothers milk schistosomiasis induced in adult mice enhancement of antibody production and increased antigen presentation capacity by B lymphocytes in response to the heterologous antigen ovalbumin (OA). Considering immunization with OA one vaccine model, inflammatory reactions and antibody production in response to antigen are important for the development of a suitable host immunity. In this sense, the Th1 and Th17 cells are important factors for the development of these responses. Thus, mice deficient in IL-12/IL-23 (12p40 knockout-KO) are likely to develop a polarized Th2 response, making it less responsive to vaccination. Therefore, the present study investigated the effect of breastfeeding in mothers infected with *Schistosoma mansoni* on the humoral and cellular adult C57BL/6 12p40 KO in response to vaccination model mentioned above. Were evaluated: the kinetics of *in vivo* hypersensitivity reactions; plasma levels of IgG1 and IgG2a immunoglobulins; the production of the cytokines IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 and TGF- β by spleen cells and the inflammatory reaction induced in the footpad. To this end, male mice deficient in IL-12 and IL-23 (IL-12p40 KO) and wild-type mice (Wild-type/WT) were divided into the following groups: IL-12p40 KO mice suckled by infected mothers (IL-12p40 KO- SIM); IL-12p40 KO mice suckled by uninfected mothers (IL-12p40 KO); Wild-type mice suckled by infected mothers (SIM) and wild-type mice suckled by uninfected mothers (CONTROL). Fifty percent of animals in each group were immunized with OA in adjuvant. The other 50% remaining percent remained without immunization. In the SIM group was increased production of IgG2a, IL-5, TGF- β and IL-6, IL-17 with low levels compared to CONTROL. In animals IL-12p40 KO-SIM the production of IgG2a, IL-5 and TGF- β was higher than the IL-12p40 KO similar to group SIM, but IL-6 production was lower. The SIM group showed intense inflammatory infiltrate of eosinophils in the delayed hypersensitivity reaction (DTH), with severe edema compared with the less intense edema and inflammatory infiltration of neutrophils CONTROL group. The animals IL-12p40 KO and IL-12p40KO-SIM not have DTH, but the inflammatory reaction in the IL-12p40KO-SIM was less intense than in IL-12p40 KO. In conclusion, contact with parasite antigens, through breastfeeding, induced in adult offspring, better neutralizing antibody response, despite the deficiency in the production of IL-12 and IL-23. In this condition, though there has been a remarkable IL-5 production in lactating mothers infected with attenuated inflammatory response, probably via cross regulation between TGF- β and IL-6 modulate thereby the status of hyperactivation of these animals.

Keywords: Schistosomiasis mansoni. Breast feeding. Immunity cellular. Immunity humoral.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Grupos experimentais. **A.** Grupos com genótipo *knockout* para IL-12p40 (IL-12p40 KO). Grupo NANI IL-12p40 KO formado por camundongos nascidos da fêmea IL-12p40 KO não infectada pelo *Schistosoma mansoni*, que foram amamentados, de forma “adotiva”, pela fêmea com genótipo selvagem (*wild type*/WT), não infectada. Grupo AI IL-12p40 KO formado por camundongos nascidos da fêmea IL-12p40 KO não infectada pelo *S. mansoni*, que foram amamentados de forma “adotiva” pela fêmea com genótipo WT, não infectada. **B.** Grupos com genótipo selvagem (WT). Grupo NANI WT formado por camundongos nascidos da fêmea WT não infectada, que foram amamentados pela sua respectiva mãe. Grupo AI WT formado por camundongos nascidos da fêmea WT não infectada, que foram amamentados de forma “adotiva” pela fêmea WT infectada. 51
- Figura 1: Infiltrado celular na pele da pata de camundongo C57BL/6 amamentado por mãe não infectada (NANI) (**A**) ou por mãe infectada pelo *Schistosoma mansoni* (AI) (**B**). Derma profundo (círculo), focos de abcedação (quadrados), neutrófilos e piócitos (seta preta, quadrante superior direito). Edema da derme e infiltrado eosinofílico (setas pontilhadas). (Coloração de hematoxilina-eosina. **A.** 200x e 400x. **B.** 200x). 62
- Figura 2: IL-5 (**A**), IL-6 (**B**), TGF- β (**C**) e IL-17 (**D**) secretadas por células esplênicas de camundongos C57BL/6, amamentados por mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (AI) ou por mães não infectadas (NANI), os quais foram imunizados com OVA em adjuvante (CFA). Um total de 5×10^6 células/mL foi estimulado com OVA (500 μ g/mL). As citocinas foram quantificadas em sobrenadante, após 48 horas, por ELISA de captura. Os resultados representam a média da concentração (pg/mL) $\pm$ desvio padrão da média de 7 camundongos/grupo. As células não estimuladas produziram <15.6 pg/mL of IL-5 and TGF- β , <7.8 pg/mL of IL-6 and <10.9 pg/mL of IL-17. * $p < 0.05$ comparado com o grupo NANI. 63
- Figura 1: Reações de hipersensibilidade específicas para OVA em camundongos C57BL/6 com deficiência na produção das citocinas IL-12/IL-23 (IL-12p40 KO), amamentados por mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (AI IL-12p40 KO) ou por mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO), bem como em seus respectivos controles *wild type*, sem deficiência na produção de IL-12/IL-23 (AI WT) e (NANI WT). Todos os camundongos foram imunizados com OVA em CFA e desafiados com injeção de OVA agregada na pata, por via subcutânea, no 8º dia após a imunização. Os resultados representam a média do aumento da espessura das 80

patas $\pm$ desvio padrão. Cada grupo possui de 3 a 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com NANI WT; ** $p < 0,05$ comparado com AI WT.

Figura 2: Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA, por camundongos C57BL/6 com deficiência na produção das citocinas IL-12/IL-23 (IL-12p40 KO), amamentados por mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (AI IL-12p40 KO) ou por mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO), bem como em seus respectivos controles *wild type*, sem deficiência na produção de IL-12/IL-23 (AI WT) e (NANI WT). Todos os camundongos foram imunizados com OVA em CFA. Os anticorpos foram mensurados no plasma dos camundongos pelo método de ELISA indireto, nas diluições 1:512 (IgG1) e 1:32 (IgG2a) nove dias após a imunização. Os resultados são apresentados pela mediana da absorbância (D. O) $\pm$ desvio médio, para um total de 3 a 7 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com NANI WT; ** $p < 0,05$ comparado com NANI IL-12p40 KO. 81

Figura 3: Níveis das citocinas IFN- γ (a), IL-17 (b), IL-5 (c), IL-6 (d), IL-10 (e) e TGF- β (f) produzidas em resposta a OVA, por camundongos C57BL/6 com deficiência na produção das citocinas IL-12/IL-23 (IL-12p40 KO), amamentados por mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (AI IL-12p40 KO) ou por mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO), bem como dos seus respectivos controles *wild type*, sem deficiência na produção de IL-12/IL-23 (AI WT) e (NANI WT). Todos os camundongos foram imunizados com OVA em CFA. As células esplênicas foram cultivadas por 48 horas sob estímulo de OVA (2,5 $\mu\text{g/mL}$) ou ConA (5 $\mu\text{g/mL}$), ou apenas na presença de meio de cultura (produção basal), numa concentração de 5×10^6 células/mL. Os níveis das citocinas foram mensurados nos sobrenadantes através do ELISA de captura. Os resultados apresentados representam a média da concentração (pg/mL) $\pm$ desvio padrão, tendo sido previamente descontado, em cada grupo, o valor da produção basal. Cada grupo possui de 3 a 7 animais. * $p < 0.05$ comparado com NANI WT; ** $p < 0.05$ comparado com AI WT; # $p < 0.05$ comparado com NANI IL-12p40 KO. 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Amamentado em mãe infectada pelo <i>Schistosoma mansoni</i>
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de antígeno)
BH	Belo Horizonte
CD25	<i>Clusters of differentiation</i> 25 (Grupamento de diferenciação 25)
CD4	<i>Clusters of differentiation</i> 4 (Grupamento de diferenciação 4)
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	<i>Complete Freund Adjuvante</i> (Adjuvante completo de Freund)
CO ₂	Dióxido de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
ConA	Concanavalina A
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CXCL	Quimiocina para neutrófilos
Ec _g	Gonadotrofina coriônica equina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> (Tecido linfoide associado ao intestino)
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
ID	Via de administração intradérmica

IFN- γ	Interferom gama
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-10 ^{-/-}	Camundongo deficiente na produção de IL-10
IL-12	Interleucina 12
IL-12p35 KO	Camundongo deficiente para a subunidade p35 da IL-12
IL-12p40 KO	Camundongo deficiente para a subunidade p40 da IL-12
IL-12R β 1	Cadeia beta1 do receptor da interleucina 12
IL-12R β 2	Cadeia beta2 do receptor da interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-13 ^{-/-}	Camundongo deficiente para IL-13
IL-13R α 2	Cadeia alfa 2 do receptor da interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-23p19 KO	Camundongo deficiente para a subunidade p19 da IL-23
IL-23R	Receptor da interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
iT reg	Células T regulatórias induzíveis
NANI	Nascidos e amamentados em mães não infectadas
NK	Células <i>Natural Killer</i>
nT reg	Células T regulatórias naturais
OVA	Ovalbumina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Salina tamponada com fosfato)
PBST	<i>Phosphate buffered saline</i> + <i>Tween 20</i> (Salina tamponada com fosfato, acrescida de Tween 20)
pIgR	Receptor polimérico de imunoglobulinas
RH	Reações de hipersensibilidade
RORC2	<i>Related Orphan Receptor C2</i> (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	(<i>Soluble Egg Antigen</i>) Antígeno solúvel de ovo de <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
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
Th17	Linfócito T auxiliar 17

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade internacional
WT	<i>Wild type</i> (camundongo selvagem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	Aspectos epidemiológicos da esquistossomose	24
2.2	Imunomodulação na esquistossomose	26
2.3	Relação materno fetal na esquistossomose	33
2.4	Amamentação e transpote intestinal nos recém-nascidos	36
2.5	Imunidade da mucosa intestinal	38
2.6	Importância das interleucinas 12 e 23	43
3	OBJETIVOS	47
3.1	Geral	47
3.2	Específicos	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Animais e infecção pelo <i>S. mansoni</i>	49
4.2	Desenho experimental	50
4.3	Imunização	52
4.4	Reações de hipersensibilidade	52
4.5	Cultura de esplenócitos e determinação dos níveis de citocinas	52
4.6	Dosagem de anticorpos	53
4.7	Análise estatística	55
4.8	Considerações éticas e biossegurança	55

5	RESULTADOS	57
5.1	IL-5, IL-6, TGF-β e eosinófilos, mas não IL-17, são melhorados pela amamentação em camundongos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	57
5.2	Amamentação exercida por mães infectadas pelo <i>Schistosoma mansoni</i> melhora a produção de IL-5 e TGF-β em camundongos deficientes em IL-12p40, mas prejudica a produção de IL-6	67
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICES	
	APÊNDICE A - Versão em inglês do artigo 1	104
	APÊNDICE B - Versão do em inglês do artigo 2	115
	ANEXOS	
	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - CPqAM/FIOCRUZ).	141
	ANEXO B – Parecer da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio - CPqAM/FIOCRUZ).	142
	ANEXO C: Normas de publicação da revista Parasite Immunology	143
	ANEXO D: Comprovante eletrônico de submissão do artigo 1 à revista Parasite Immunology	154
	ANEXO E: Normas para publicação da revista Parasitology	155
	ANEXO F: Comprovante eletrônico de submissão do artigo 2 à revista Parasitology	161



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Infecções maternas podem modular a resposta imune do descendente para antígenos homólogos ou heterólogos (NACHER et al., 2000; RESENDE CO et al., 2006). A hiporresponsividade de indivíduos residentes em áreas endêmicas, frente à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, é resultado da exposição *in utero* aos antígenos do parasito (CRAMER; KUNZ; GILL, 1974). De fato, um estudo observou a presença de um antígeno comum entre os ovos, cercárias e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium* em amostras de soro do cordão umbilical, leite materno e urina de mulheres infectadas pelo *S. mansoni*. Da mesma forma, esse antígeno foi identificado na urina de recém-nascidos amamentados por mães esquistossomóticas. Esses resultados mostram a possibilidade de transferência do antígeno parasitário da mãe para o descendente através da placenta, colostro e leite (ATTALLAH et al., 2003).

Como consequência da amamentação em mães infectadas, crianças sem infecção apresentaram aumento da hipersensibilidade celular frente aos antígenos de *S. mansoni* (EISSA et al., 1989). Além disso, 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; SHALTOUT, 1998).

No âmbito experimental, diferentes estudos relacionaram a transferência de antígenos derivados do *S. mansoni* e/ou anticorpos anti-parasita, *in utero* ou através da amamentação, com alterações na resposta imune de descendentes adultos, frente a uma exposição pós-natal ao mesmo parasito. Nesses estudos, os animais apresentaram atenuação da patologia, como resultado da exposição aos componentes oriundos da infecção materna, nos estágios iniciais do desenvolvimento do sistema imune, resultando em tolerância imunológica (ATTALLAH et al., 2006; LENZI et al., 1987; OTHMAN et al., 2010).

Porém, ainda pouco se sabe a respeito da resposta imune do descendente amamentado em mãe esquistossomótica, frente aos antígenos heterólogos. Nesse sentido, estudos prévios observaram que os descendentes adultos, que tiveram contato com o leite mães esquistossomóticas, apresentaram potencialização da produção de anticorpos (SANTOS et al., 2010) e aumento da capacidade de apresentação de antígeno pelos linfócitos B (SANTOS et al., 2014), frente ao antígeno heterólogo ovalbumina (OVA).

Esses fenômenos podem ser decorrentes da menor capacidade digestiva do recém-nascido, o que permite que componentes imunomodulatórios intactos presentes no leite de mães infectadas ultrapassem a mucosa intestinal (RODEWALD, 1970; 1973) e possam atuar sistemicamente (BLEWEET et al., 2008) induzindo sensibilização. Dessa forma, a potencialização da resposta imune observada nos camundongos amamentados por mães esquistossomóticas pode ocorrer, inicialmente, ao nível de mucosa intestinal e/ou atuando de maneira sistêmica.

No contexto de imunidade de mucosa, a IL-23 apresenta importante atuação no sistema imune intestinal, uma vez que promove a manutenção das células Th17, as quais representam a população em maior proporção entre as células da lâmina própria (IVANOV et al., 2006; 2008), sendo responsáveis pelas respostas inflamatórias, como também pela proteção do hospedeiro contra bactérias e fungos patogênicos encontrados na superfície mucosa (BETELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007; KORN et al., 2007; NURIEVA et al., 2007; MCKENZIE; KASTELEIN; CUA, 2006).

Na imunidade sistêmica, por sua vez, a IL-12 atua na resistência às infecções, particularmente aquelas provocadas por bactérias e parasitos intracelulares (TRINCHIERI, 1998). Essa citocina pode afetar diretamente a diferenciação e proliferação dos linfócitos B, bem como, mediar indiretamente a ativação dessas células, por indução dos linfócitos Th1.

Esses últimos produzem IFN- γ e levam à troca de isótipo IgG2, regulam negativamente a resposta Th2 por suprimirem a produção de IL-4, IL-5 e diminuírem a produção de IgE e IgG1 (anticorpos anafiláticos) (TRINCHIERI et al., 1992).

Ambas citocinas, IL-23 e IL-12, são heterodímeros que compartilham a subunidade p40. Essa subunidade comum pode ligar-se a p35, dando origem a IL-12, ou pode ligar-se a subunidade p19, formando a IL-23 (PARHAM et al., 2002; TRINCHIERI; PFLANZ; KASTELEIN, 2003). Dessa forma, os camundongos deficientes para a subunidade p40 (IL-12p40 *knockout* ou KO) são simultaneamente prejudicados no desenvolvimento das respostas Th1/Th17. Por essa razão, esses animais são predispostos ao desenvolvimento de uma resposta Th2 polarizada (MAGRAM et al., 1996).

Considerando que os animais que desenvolvem uma resposta Th2 polarizada são menos responsivos às vacinações, o presente estudo se propôs a investigar o efeito do contato prévio com o leite de mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* sobre as imunidades humoral e celular de camundongos adultos C57BL/6 12p40 KO, em resposta à imunização com o antígeno heterólogo OVA, o qual representa o modelo vacinal utilizado por Santos et al. (2010; 2014).

Os resultados por nós obtidos mostraram que, mesmo diante de um quadro de imunodeficiência, representado, em nosso modelo, pelo prejuízo simultâneo no desenvolvimento das respostas Th1 e Th17, o contato com o leite de mães esquistossomóticas induziu uma maior proteção para os descendentes, caracterizada pelo aumento da produção de IgG2a, imunoglobulina que confere imunidade contra bactérias extracelulares e antígenos vacinais.



REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

Nos países em desenvolvimento, problemas de saúde pública decorrentes da carência de políticas voltadas para a promoção e educação em saúde e do baixo investimento em saneamento básico e ambiental, promovem espaços pouco saudáveis para populações menos privilegiadas. Neste contexto socioambiental, patologias infectoparasitárias ainda se encontram bastante disseminadas e com altas taxas de prevalência (CARMO; BARRETO, 1994; COSTA-CRUZ, 2008; LUDWING, 1999; MACHADO; SANTOS; MACHADO et al., 1996; PEDRAZA; QUEIROZ; SALES, 2014; TAVARES-DIAS; GRANDINI, 1999). Doenças endêmicas como a esquistossomose manifestam-se de forma crônica nos indivíduos parasitados, residentes em locais onde a situação de saúde reflete as condições insalubres do ambiente (SOUZA et al., 2008). A análise espaço-temporal mostra que esses lugares possuem heranças históricas, sociais e políticas que propiciam a manutenção das doenças endêmicas que estão relacionadas às práticas culturais associadas à ausência de assistência à saúde (BARCELLOS et al., 2002).

Nesse contexto, a esquistossomose encontra-se distribuída em várias regiões tropicais do mundo. O Brasil é considerado o país mais afetado das Américas, onde a prevalência pode ser superior a 8 milhões de infectados (KATZ; PEIXOTO, 2000) e aproximadamente 30 milhões de pessoas estão expostas ao risco de adquirir a infecção (LAMBERTUCCI, 2010).

No país, a esquistossomose é endêmica nos estados de Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (BRASIL, 2011a).

Precárias condições socioeconômicas, dificuldades de acesso aos serviços de saúde, a falta de educação em saúde e más condições de tratamento de água e esgoto são fatores associados à endemia (RIBEIRO et al., 2004).

Além da morbidade, o risco de óbito por esquistossomose é elevado. Mesmo tratando-se de uma doença prevenível e tratável, no período de 1990 a 2010 foi registrado um número expressivo de formas graves, com uma média de 1.567 internações e 527 óbitos (BRASIL, 2011b). Em 2012 foram confirmados no Sistema Nacional de Agravos de Notificação, 8.304 casos, em 23 estados da Federação (BRASIL, 2014).

No Estado de Pernambuco, dos 185 municípios, 93 são endêmicos (SILVA; DOMINGUES, 2011). A infecção está basicamente presente na Zona da Mata Sul e Norte (FRAVE et al., 2001). Porém, desde a última década, estão sendo observadas mudanças no perfil clínico e epidemiológico da doença (ARAÚJO, 2007). Foram registrados episódios de esquistossomose aguda e de focos de transmissão em localidades próximas às praias e na Região Metropolitana do Recife, apontando para uma expansão da endemia no Estado (FAVRE et al., 2001). Recentemente, estudo identificou focos de criação de *Biomphalaria straminea* com positividade para o DNA do *S. mansoni*, e casos autóctones da esquistossomose mansônica na cidade do Recife foram diagnosticados, evidenciando a urbanização da doença em Pernambuco (BARBOSA et al., 2013).

Um dos fatores que favorecem a transmissão da doença nas áreas costeiras do Estado é a ocorrência de inundações nos períodos chuvosos propiciando o contato de pessoas com águas contaminadas pelo molusco vetor. Em estudo recente, foi avaliado o risco de transmissão da doença em Porto de Galinhas (município de Ipojuca), uma importante área turística do Estado. Nesse trabalho foram identificados vários fatores de risco para a transmissão da doença como baixo nível de escolaridade, baixa renda familiar, ausência de infraestrutura sanitária e invasão de áreas de ambiente natural. No distrito mais afetado, foram

encontrados vários focos de criação do *Biomphalaria glabrata*, caramujo com potencial para infecção mais alto que o *Biomphalaria straminea*, ambas espécies encontradas no Estado (GOMES et al., 2014).

Um comparativo feito entre estudos realizados nos anos de 2006 (BARBOSA et al., 2006) e 2012 (BARBOSA et al., 2012), em municípios da Zona da Mata, observou que as taxas de prevalência da doença continuam elevadas, mostrando que ainda não foram realizadas medidas de prevenção efetivas para a redução da infecção nesses municípios.

Em relação às medidas de controle, em 1975 foi criado no Brasil o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), sendo realizados mais de 12 milhões de tratamentos em todo o país, principalmente na região Nordeste. Com esse programa foi possível reduzir o número de portadores, as formas graves da doença e a taxa de mortalidade. No entanto, mesmo com a continuidade do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE), em 1996, estimou-se em 7,1 milhões o número de portadores da doença no Brasil (KATZ; PEIXOTO, 2000), mostrando que a perspectiva de erradicação da doença é um desafio (AMARAL et al., 2006).

Diante do exposto, a esquistossomose mansônica deve ser observada de uma forma abrangente, considerando os contextos político, econômico e social envolvidos no processo de transmissão (BARBOSA et al., 2001; CARVALHO et al., 1998).

2.2 Imunomodulação na esquistossomose

No processo de resposta imune, a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens em células efectoras (Th1, Th2 ou Th17) é induzida por diferentes tipos de citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), principalmente células dendríticas e

macrófagos, células teciduais em resposta a infecções e tecidos danificados (AKKOC et al., 2008). Outras células da imunidade inata como os linfócitos *Natural Killer* (NK), mastócitos e basófilos também podem contribuir com a produção de citocinas, influenciando o desenvolvimento dos subtipos de células T auxiliares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Após a diferenciação, cada subtipo produz um padrão específico de citocinas que induz seu próprio desenvolvimento e inibe o desenvolvimento dos outros subtipos (COFFMAN, 2006; COFFMAN; CARTY, 1986; MOSMANN et al., 1986), amplificando, assim, a resposta.

Dessa forma, a IL-12 produzida pelas células da imunidade inata promove a diferenciação das células Th1 (AKKOC et al., 2008; MANETTI et al., 1993; SEDER et al., 1993). 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 (STEINMAN, 2007; YAMANE; PAUL, 2012). Uma vez diferenciadas, as células Th1 expressam altos níveis do receptor para IL-18, a qual é dependente da sinalização IL-12/STAT4 e da produção de IFN- γ . Juntas IL-12, IL-18 e IFN- γ produzidas pelas células Th1 amplificam a resposta (ANNUNZIATO; ROMAGNANI, 2009). Essas células desempenham função importante na defesa contra patógenos intracelulares (AKDIS et al., 2012) e reações inflamatórias mediadas por células (AKKOC et al., 2008).

Em processo semelhante, a secreção de IL-4 pelos mastócitos, basófilos e eosinófilos, ativa o fator de transcrição STAT6, o qual induz a expressão de GATA3 que, por sua vez, regula a diferenciação Th2 (STEINMAN, 2007). Essas células produzem, principalmente, IL-4, IL-5 e IL-13 (AKDIS; AKDIS, 2012), que atuam na indução da produção de IgE durante os processos alérgicos, eosinofilia e produção de muco (AKDIS et al., 2012; COSMI et al., 2011; 2014).

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.

Outro subtipo de célula T CD4⁺ efetora é o Th17. Essas células são geradas pela ação conjunta das citocinas TGF- β e IL-6. Essa última atua via STAT3, que induz o fator de transcrição ROR γ t em camundongos (IVANOV et al., 2006), ou RORC2 em humanos (PETERS; LEE; KUCHROO, 2011). Além de TGF- β e IL-6, outras citocinas envolvidas no desenvolvimento e expansão do perfil Th17 são IL-1 β , IL-21 e IL-23 (BURGLER et al., 2009; HARRINGTON et al., 2005). Porém, a população de células Th17 é heterogênea. A presença de TGF- β e IL-6 induz a diferenciação de células Th17 clássicas que produzem além de IL-17, as citocinas IL-21 e IL-10. Na ausência do TGF- β , mas na presença de IL-6, IL-1 β e IL-23 ocorre a geração de células Th17 com perfil patogênico, produtoras de IL-17, IL-22, IFN- γ e GM-CSF (GHORESCHI et al., 2010).

De acordo com Ghoreschi et al. (2010), as células Th17 geradas na ausência de TGF- β , porém na presença de IL-6, IL-1 β e IL-23, apresentam elevado potencial patogênico na indução da encefalomielite alérgica experimental em camundongos, o que não ocorre quando as células Th17 são diferenciadas na presença de TGF- β e IL-6, sugerindo que o TGF- β não é absolutamente necessário para a diferenciação Th17 e que essas células apresentam distintos perfis de produção de citocinas, além de diferenças na capacidade de indução de doenças autoimunes.

As funções efectoras das células Th1, Th2 e Th17 são reguladas por células T CD4⁺ CD25⁺, chamadas de células T regulatórias (T reg), cujo fator de transcrição é FoxP3 (*Forkhead box P3*). Essas células Foxp3⁺ possuem atividades supressoras que podem

controlar respostas inflamatórias excessivas, prevenindo danos teciduais (LIN et al., 2013), mantém a tolerância imunológica tanto a antígenos próprios (SAKAGUSHI, 2005), como a antígenos alimentares e flora comensal (LIN et al., 2013). Os linfócitos T reg podem ser divididos em dois subtipos: naturais (nT reg) e induzíveis (iT reg). O primeiro subtipo se desenvolve no timo e não são estáveis sob condições inflamatórias, podendo se diferenciar em Th17, na presença de IL-6 (KONG et al., 2012; LIN et al., 2013; ZHENG; WANG; HORWITZ, 2008). O segundo subtipo é gerado periféricamente sob estimulação antigênica induzida pela flora ou alimentos (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009). Os principais mecanismos de ação dessas células são: secreção de fatores solúveis com atividade imunossupressora como IL-10 e TGF- β ; contato célula-célula e competição por fatores de crescimento. Através desses mecanismos, as células T reg podem atuar sobre as células T efectoras e células dendríticas interrompendo o ciclo celular, induzindo apoptose, prevenindo a maturação ou reduzindo a apresentação de antígenos (PETERSON, 2012).

Todos esses subtipos de células T atuam no processo de imunomodulação observado na esquistossomose. Na doença aguda, a reação imunológica do hospedeiro envolve, predominantemente, a produção citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-6 (DE JESUS et al., 2002), induzidas pelos antígenos dos vermes, as quais podem ser mensuradas no plasma do hospedeiro (LAMBERTUCCI, 2010). A produção desse padrão de citocinas inicial caracteriza uma resposta do tipo Th1 (PEARCE; MCDONALD, 2002). Nessa fase, algumas manifestações clínicas podem ser provocadas pelos complexos imunes derivados células do sistema fagocítico mononuclear (LAMBERTUCCI, 2010). Com a progressão natural da doença, os antígenos dos ovos induzem uma resposta Th2 que modula a produção e as funções efectoras desses mediadores pró-inflamatórios (PEARCE; MCDONALD, 2002). 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). Esses e outros trabalhos (FALLON, 2000; HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; PATTON et al., 2001) mostram que uma resposta Th1 polarizada pela ausência da IL-4, provoca aumento na morbidade e mortalidade desses animais.

Embora a resposta Th2 seja crucial na modulação da doença durante a fase inicial, uma expressão prolongada desses mediadores contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática (CHEEVER; HOFFMAN; WYNN, 2000). A principal citocina que é responsável pela fibrogênese é a IL-13. Então, camundongos nos quais a IL-13 está ausente (IL-13^{-/-}) (FALLON et al., 2000), ineficiente (IL-4R α ^{-/-}) (JANKOVIC et al., 1999) ou neutralizada por tratamento com anticorpo anti-IL-13R α 2 (CHIARAMONTE et al., 1999) não desenvolvem fibrose hepática grave, apresentando, dessa forma, sobrevivência prolongada (FALLON et al., 2000).

Contudo, a ação da IL-10 controla a excessiva polarização Th1 e Th2 (ABATH et al., 2006; HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; WYNN et al., 1998). Estudos prévios mostraram que camundongos deficientes simultaneamente na produção de IL-10 e IL-12 desenvolveram resposta Th2 polarizada, com formação de granulomas maiores e fibrose hepática mais exacerbada do que os animais selvagens (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000). Além disso, animais geneticamente deficientes da produção de IL-10 (IL-10^{-/-}) desenvolveram perfil misto Th1/Th2, com aumento na produção de IFN- γ /IL-5 (ABATH et al., 2006; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000). 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).

Além disso, as células Th17 também possuem participação importante no processo de patogênese da esquistossomose. Em estudo prévio (RUTITZKY; HERNANDEZ; STADECKER, 2001) foi observado que a patologia grave que ocorre naturalmente em algumas cepas de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, como CBA e C3H (CHEEVER et al., 1987), também pode ser induzida nos camundongos C57BL/6 infectados, após imunização com antígeno solúvel de ovo (SEA) em adjuvante (RUTITZKY; HERNANDEZ; STADECKER, 2001). Tanto nas cepas de camundongos onde a patologia grave se desenvolve naturalmente, quanto naquela em que a exacerbação da patologia precisa ser induzida, ocorre uma persistente resposta proinflamatória e falha da resposta Th2 (RUTITZKY; STADECKER, 2011).

Em uma série de estudos realizados com camundongos C57BL/6 infectados e imunizados com SEA/adjuvante (RUTITZKY et al., 2008; RUTITZKY; LOPES DA ROSA; STADECKER, 2005; RUTITZKY; SMITH; STADECKER, 2009) foi observado que em animais IL-12p40 KO (os quais são deficientes na produção de IL-12 e IL-23 e não produzem níveis normais de IFN- γ e IL-17) existe uma completa falha no desenvolvimento da forma exacerbada da imunopatologia induzida pelos ovos do *S. mansoni*. Todavia, os camundongos IL-12p35 KO (que não produzem IL-12, mas produzem IL-23 e IL-17) o aumento da patologia é semelhante aos animais selvagens (RUTITZKY; LOPES DA ROSA; STADECKER, 2005). Notavelmente, os IL-23p19 KO (que podem produzir quantidades

reduzidas de IL-17, e que a produção de IFN- γ é regulada pela IL-10), a imunopatologia resultante é modesta e significativamente menor do que animais selvagens (RUTITZKY et al., 2008). Esses estudos implicaram a IL-17 como mediadora do desenvolvimento da patologia grave.

Em estudo posterior, todavia, foi avaliado o papel das citocinas IL-17 e IFN- γ no desenvolvimento da patologia grave. Foi observado que na ausência da IL-17 a imunopatologia reduzida foi associada com o aumento dos níveis de IFN- γ , enquanto na ausência dessa última, houve exacerbação, assim como nos níveis de IL-17, sugerindo que, nesse modelo, a IL-17 exerce uma função patogênica que é normalmente regulada pelo IFN- γ . Juntos, os resultados mostraram que a exacerbação da imunopatologia induzida pelos ovos foi mediada pela IL-17, e que o IFN- γ funcionou como elemento regulador, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos de camundongos na expressão do FoxP3.

Por fim, todos os trabalhos reforçam a hipótese de que a forma grave da imunopatologia na esquistossomose é primariamente mediada pela IL-17 a qual pode ser regulada pelo IFN- γ , com cada uma das citocinas produzidas por populações de células T CD4 distintas (RUTITZKY; STADECKER, 2011). Porém, o efeito regulatório da resposta Th1 demonstrado, não impede a patogenicidade desse subtipo celular, no contexto de outros modelos experimentais, sugerindo que, em circunstâncias onde dois subsistemas potencialmente patogênicos poderiam atuar sinergicamente, um deles pode adotar um papel regulatório (RUTITZKY; SMITH; STADECKER, 2009). Porém, o preciso mecanismo pelo qual o IFN- γ regula a produção de IL-17 não foi esclarecido (RUTITZKY; STADECKER, 2011).

O principal mecanismo pelo qual IL-17 induz a imunopatologia grave na esquistossomose murina é através do estímulo da produção de moléculas proinflamatórias e quimiotáticas pelas células linfóides locais, células vasculares e mesenquimais (FOSSIEZ et

al., 1998; KOLLS; LINDEN, 2004; YE et al., 2001), com aumento do recrutamento e da ativação de neutrófilos (LAAN et al., 1999; WITOWSKI et al., 2000; WU et al., 2007), os quais contribuem mais significativamente para a exacerbação da patologia em resposta à imunização com SEA. Nesse contexto, a IL-23 é um fator crítico, pois impulsiona o desenvolvimento de células Th17 nos granulomas, como também, restringe a rede regulatória dependente de IL-10, contribuindo para a liberação das citocinas inflamatórias e quimiocinas, bem como para o recrutamento e ativação de neutrófilos (RUTITZKY et al., 2008).

2.3 Relação materno fetal na esquistossomose

Na gestação, o conceito é considerado um haloenxerto, pois não possui bases genéticas idênticas à mãe. Sua aceitação pelo organismo materno depende da indução de uma tolerância específica aos antígenos paternos, processo que envolve uma intensa imunomodulação (SILVA et al., 2006). Para isto, o sistema imune da mãe desenvolve um ambiente potencialmente imunossupressor na interface útero-placenta. Nesse compartimento são encontrados macrófagos com potencial inibitório, células dendríticas imaturas e células T reg (BLOIS et al., 2004; HEIKKINEN et al., 2004; LAGADARI et al., 2004). Na decídua são encontradas células apresentadoras de antígeno produtoras de IL-10 como macrófagos (HEIKKINEN et al., 2003) e células dendríticas (BLOIS et al., 2004) e 14% das células T CD4⁺ são regulatórias (CD25⁺) que secretam fatores imunomodulatórios como IL-10 e TGF- β (HEIKKINEN et al., 2004). Este perfil imunossupressor é fundamental para que o processo gestacional prossiga a termo, porém, pode ser transferido e mantido pelo recém-nascido (TASKER; MARSHALL-CLARKE, 1997; TAYLOR; BRYSON, 1985).

Da mesma forma que o perfil imunossupressor observado na mãe pode ser transferido para o filho, em processos infecciosos que ocorrem durante a gravidez, também pode haver a transferência, para o feto, de anticorpos e antígenos oriundos da infecção materna. Esse mecanismo foi observado por vários trabalhos que estudaram a transferência transplacentária de antígenos de *S. mansoni* e/ou anticorpos específicos para o parasito em mulheres nas quais a infecção esquistossomótica ocorreu simultaneamente à gravidez (ATTALLAH et al., 2003; CARLIER et al., 1980; ROMIA et al., 1992). Dados de estudos realizados com linfócitos de cordão umbilical de filhos de mulheres infectadas, ou não, pelo *S. mansoni*, revelaram que os descendentes de mães esquistossomóticas foram sensibilizados *in utero*, e que a resposta imune da criança é fenotipicamente similar à resposta da mãe (MALHOTRA et al., 1997). Esses estudos podem explicar o fato de a esquistossomose aguda não ser comum entre indivíduos de áreas endêmicas, ocorrendo, principalmente, em pessoas que não têm história prévia de exposição, ou seja, não foram sensibilizados para o *S. mansoni in utero*, como resultado da infecção materna (PEARCE; MCDONALD, 2002).

Além da transferência pré-natal, também pode ocorrer a transferência desses componentes imunes da mãe para o recém-nascido através da amamentação. Foi constatado que manifestações alérgicas do trato gastrointestinal de crianças amamentadas por mães infectadas pelo *S. mansoni* eram devidas à presença de antígenos parasitários no leite materno (NOURELDIN; SHALTOUT, 1998). Estudo posterior identificou a presença de antígeno de *S. mansoni* em mães infectadas, bem como na urina das crianças amamentadas por essas mães, sugerindo a transferência do antígeno por via oral (ATTALLAH et al., 2003).

Essa exposição prévia aos antígenos e anticorpos derivados da infecção materna pode provocar alterações na resposta imune do recém-nascido, tanto para antígenos homólogos, como para antígenos heterólogos. Observações realizadas em áreas endêmicas para esquistossomose mostraram que a maioria das pessoas infectadas permanece assintomática ou

exibe sintomas inespecíficos (TACHON; BOROJEVIC, 1978), sugerindo que a exposição pré-natal à infecção materna pode modular a resposta imune (MALHOTRA et al., 1999) frente a exposições futuras ao mesmo parasito. Essas observações foram confirmadas por estudos experimentais os quais mostraram que camundongos nascidos e amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni*, quando infectados subsequentemente, apresentaram hiporresponsividade aos ovos do parasito, diminuição da reação granulomatosa hepática, menor carga parasitária e níveis mais baixos de IgG em comparação com animais nascidos e amamentados por mães sem infecção (ATTALLAH et al., 2003; LENZI et al., 1987; OTHMAN et al., 2010).

Porém ainda são escassos, na literatura, os estudos sobre a resposta imune do descendente nascido de mãe infectada pelo *S. mansoni* frente a antígenos não relacionados ao parasito (antígenos heterólogos). Nesse contexto, Santos et al. (2010) demonstraram que a resposta imune de camundongos nascidos e/ou amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni* pode sofrer alterações em resposta ao antígeno OVA, na vida adulta. Nesse estudo, descendentes adultos nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas, imunizados com OVA em adjuvante completo de Freund (CFA), apresentaram diferenças na resposta imune específica para OVA, quando comparados com camundongos nascidos e amamentados por mães sem infecção. Os camundongos nascidos de mães esquistossomóticas apresentaram um perfil imunossupressor adquirido durante gestação, representado por alta produção de IL-10 e redução da produção do isotipo IgG2a anti-OVA. No entanto, camundongos amamentados por mães infectadas apresentaram potencialização da imunidade anti-OVA, caracterizada pelo aumento na produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a, ausência de produção de IL-10 e altos níveis de IL-2 (SANTOS et al., 2010). Posteriormente, foi demonstrado que a gestação em mães infectadas pelo *S. mansoni* suprimiu a capacidade de apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígeno em camundongos imunizados com OVA

em CFA. Porém, nos animais que tiveram contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas, a capacidade de apresentação de antígeno pelos linfócitos B foi potencializada, após serem submetidos ao mesmo protocolo de imunização (SANTOS et al., 2014).

Nesses estudos foi possível observar que os animais que tiveram contato prévio com o leite de mães infectadas pelo *S. mansoni* apresentaram uma maior responsividade ao antígeno não relacionado, OVA, na vida adulta, do que os animais nascidos de mães infectadas (SANTOS et al., 2010; 2014). Provavelmente, a potencialização da resposta imune específica para OVA, exercida pelo leite de mães infectadas, ocorre inicialmente ao nível de sistema imune de mucosa intestinal, a qual pode induzir sensibilização sistêmica através da transferência de anticorpos maternos intactos e antígenos para a circulação sistêmica do descendente.

2.4 Amamentação e transpote intestinal nos recém-nascidos

Devido à imaturidade do sistema imune, os recém-nascidos são muito vulneráveis a infecções. Neles, são observados níveis séricos baixos de IgM e IgA, insuficiente produção de IgG e imaturidade funcional dos linfócitos T e fagócitos (XANTHOU, 1998). Sendo assim, a imunidade passiva transferida pela mãe, através da amamentação, confere proteção ao recém-nato, durante o desenvolvimento neonatal. Os principais componentes imunológicos presentes no leite humano compreendem imunoglobulinas, células e citocinas (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

Dentre os anticorpos, a IgA é o principal isotipo presente no leite, constituindo a maior parte do componente protéico (GAROFALO; GOLDMAN, 1999; XANTHOU, 1998; WOLD; ADLERBERTH, 2000). Sua principal função é a ligação a microorganismos e macromoléculas, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, além de neutralizar toxinas liberadas pelos patógenos (PICCIANO, 1998; XANTHOU, 1998). IgG e IgM, mesmo em pequena quantidade, são importantes na proteção inicial da criança contra vírus, bactérias e protozoários (HAMOSH, 2001; XANTHOU, 1998; WOLD; ADLERBERTH, 2000). IgE liga-se a antígenos luminais, induzindo a produção de mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular, facilitando a passagem de IgG do sangue para o intestino, inativando os antígenos presentes na mucosa (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

A maior população celular presente no leite humano corresponde aos macrófagos que são capazes de responder a estímulos quimiotáticos, fagocitando patógenos invasores do trato digestivo do recém-nascido (PICCIANO, 1998; XANTHOU, 1998). Além dos macrófagos, os neutrófilos e os linfócitos T e B também estão presentes no leite. Esses últimos são, em sua maioria, plasmócitos produtores de IgA (HAMOSH, 2001). Também são encontradas citocinas como IL-12, TNF- α , IL-10 e IFN- γ que exercem atividades moduladoras da imunidade do recém-nascido. Todos esses componentes são essenciais para a proteção contra infecções, especialmente para as superfícies mucosas, até que o sistema imune do recém-nascido esteja completamente formado (GRASSI; COSTA; VAZ, 2001).

De forma semelhante ao que é observado no leite humano, o leite materno de camundongos também possui diferentes isotipos de imunoglobulinas como IgA e IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 (CARLIER; TRUYENS, 1995). Esses anticorpos garantem a imunidade pós-natal do animal, uma vez que são absorvidos inalterados e biologicamente ativos pelo sistema digestivo (RODEWALD, 1973). Estudos prévios mostraram que, durante a amamentação, o intestino delgado dos roedores funciona como um órgão de dupla função. As

células do segmento proximal capturam imunoglobulinas do leite e as transportam em vesículas através do citoplasma, liberando-as na circulação sistêmica (RODEWALD 1970; 1973). Nos segmentos médio e distal, as células são ricas em lisossomos, onde as proteínas do leite são digeridas intracelularmente (CLARCK, 1959).

No intestino delgado de ratos, o transporte das imunoglobulinas presentes no colostro e no leite é mediado pela ligação com receptores presentes na membrana das células epiteliais. Após a ligação ao receptor, os anticorpos são absorvidos por pinocitose e ficam agregados dentro de vesículas citoplasmáticas limitadas por membranas, sendo transportados até a membrana lateral, onde são liberados por transcitose no espaço extracelular. Após a liberação, o anticorpo se difunde na lâmina própria. No entanto, à medida que a idade aumenta, ocorre uma redução significativa no número de vesículas transportadoras, diminuindo o mecanismo de transporte de anticorpos que cessa completamente ao desmame (RODEWALD, 1973).

2.5 Imunidade da mucosa intestinal

Nas superfícies mucosas, a troca de gases, de fluidos e nutrientes permite que uma grande quantidade de antígenos derivados de organismos comensais, patógenos e toxinas entrem em contato com o sistema imune. Esse contato é particularmente intenso no intestino, que é permanentemente exposto a antígenos alimentares e da microbiota normal. Dessa forma, o sistema imune intestinal precisa reagir apropriadamente a esses antígenos, promovendo o balanço entre as respostas protetora e tolerogênica (SCHULZ; PABST, 2013).

A organização anatômica do intestino compreende uma barreira epitelial, que é formada por uma camada simples de células; a lâmina própria, que corresponde ao tecido

conjuntivo subjacente ao epitélio; tecidos linfoides associados ao intestino (GALT) e linfonodos drenantes. Os quatro tipos principais de células que formam o epitélio intestinal são enterócitos, células caliciformes, células enteroendócrinas e células de Paneth. A lâmina própria consiste de numerosos linfócitos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos dispersos. As estruturas mais significativas do GALT são as placas de Peyer, que compreendem folículos linfoides ricos em células T e B, células dendríticas e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A resposta imune inata do trato gastrointestinal é mediada, basicamente, por barreiras físicas e químicas. A principal barreira física é formada pelas junções de oclusão que mantêm as células epiteliais unidas, bloqueando a movimentação de patógenos entre o lúmen e a lâmina própria. Como exemplos de barreiras químicas estão o muco produzido pelas células caliciformes, que forma uma barreira ao trânsito de bactérias (SCHULZ; PABST, 2013), e as defensinas produzidas pelas células epiteliais, que exercem efeitos tóxicos letais para microorganismos, uma vez que se inserem nas membranas externas, provocando perda da sua integridade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A resposta imune adaptativa é iniciada no GALT, onde os linfócitos T virgens entram em contato com antígenos apresentados pelas APCs e são diferenciados em células efectoras. Na fase inicial da resposta adaptativa, as células M, residentes no epitélio do intestino delgado e sobrepostas às placas de Peyer e outros folículos linfoides da lâmina própria, internalizam partículas do conteúdo luminal através de fagocitose ou macropinocitose e as transportam dentro de vesículas através do citosol, liberando-as, por exocitose, para que sejam capturadas pelas células dendríticas, macrófagos e células B do GALT (SCHULZ; PABST, 2013). As células dendríticas da lâmina própria, por sua vez, capturaram antígenos do lúmen através de processos citoplasmáticos estendidos entre as células epiteliais do intestino. Em seguida, migram para o GALT, onde apresentam os antígenos processados aos linfócitos T, induzindo

sua ativação e diferenciação em células efetoras. Uma vez diferenciadas, as células T efetoras deixam as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos ou outras estruturas do GALT onde foram geradas e migram para a lâmina própria, podendo responder aos patógenos invasores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Na resposta imune humoral, as imunoglobulinas IgA (em maior quantidade), IgM e IgG correspondem à primeira linha de defesa contra os microorganismos (ABRAHAMSON; POWERS; RODEWALD, 1979; ABRAHAMSON; RODEWALD, 1981; BENLOUNES et al., 1995). Após produção nos tecidos linfoides da mucosa, a IgA polimérica liga-se ao receptor polimérico de imunoglobulinas (pIgR), para ser transportada através das células epiteliais até o lúmen, onde é secretada (BRADTZAEG, 2009). No lúmen, a IgA, juntamente com IgG e IgM, neutraliza microorganismos e toxinas, impedindo sua ligação às células do hospedeiro.

Além da resposta humoral, o intestino dispõe de mecanismos imunes mediados por células, que são responsáveis tanto pela proteção contra patógenos como pela regulação das respostas a antígenos alimentares e da microbiota local (FORCHIELLI; WALKER, 2005).

As respostas efetoras são mediadas, principalmente, pelas células Th17 que estão em maior proporção entre as células da lâmina própria (IVANOV et al., 2006; 2008). Elas são responsáveis pelas respostas inflamatórias como também pela proteção do hospedeiro contra uma variedade de infecções provocadas por bactérias e fungos patogênicos encontrados na superfície mucosa (KORN et al., 2007; MANGAN et al., 2006; NURIEVA et al., 2007). Esse efeito protetor das células Th17 tem relação com sua capacidade de expandir a população de neutrófilos na medula óssea e no baço, e de aumentar a maturação dessas células no sangue periférico (SCHWARZENBERGER et al., 1998) através da produção de IL-17. Essa expansão neutrofílica é regulada pelo fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF)

(FORLOW et al., 2001), que é inicialmente induzido pela IL-23 derivada do intestino (STARK et al., 2005) e, posteriormente, pela IL-17 (FORLOW et al., 2001). Essa última também regula a expressão de quimiocinas atrativas para neutrófilos, como CXCL1 e CXCL2, produzidas pelas células epiteliais e fibroblastos, controlando, assim, o influxo de neutrófilos nas mucosas (KOLLS; LINDEN, 2004; MCALLISTER et al., 2005; WITOWSKI et al., 2000). Outro mecanismo de controle é exercido pela absorção normal de neutrófilos apoptóticos na lâmina própria do intestino. Esse mecanismo inibe a expressão de IL-23p19, regulando negativamente a produção de IL-17 pelas células T do intestino, controlando o número de neutrófilos circulantes (STARK et al., 2005).

Outra citocina envolvida com a proteção mucosa é a IL-22, que também pode ser produzida pelas células Th17. Ela induz a produção de peptídeos antimicrobianos e a proliferação das células epiteliais (AUJLA; KOLLS, 2009). Nas mucosas, a maior produção dessa citocina é evidenciada pelas células NK em resposta a IL-23, a qual também é necessária para mediar as respostas inflamatória e protetora das células Th17 *in vivo* (MCKENZIE; KASTELEIN; CUA, 2006; WEAVER et al., 2007). A importância da IL-23 nos mecanismos protetores é confirmada por estudos que mostraram que, na sua ausência, camundongos não resistem à infecção intestinal provocada pelo *Citrobacter rodentium* (MANGAN et al., 2006). Em outro estudo, foi observado que, na ausência da IL-22, citocina induzida pela IL-23, camundongos apresentaram susceptibilidade à infecção provocada por essa mesma bactéria, semelhante ao que foi visto no estudo acima citado (ZHENG; WANG; HORWITZ, 2008).

A importância da IL-23 no sistema imune da mucosa intestinal também se deve ao fato de que esta citocina também pode apresentar atividade na indução de doenças inflamatórias. Estudo prévio, que avaliou a função das citocinas IL-23 e IL-12 em modelo de doença inflamatória induzida em camundongos, mostrou que ambas apresentam diferenças funcionais em relação à imunopatologia inata sistêmica e de mucosa. Os autores observaram que a IL-23

foi essencial para a indução da inflamação inata no cólon, não apresentando qualquer atividade sistêmica demonstrada por perda de peso, esplenomegalia e aumento de citocinas no soro dos animais. Por outro lado, os animais com deficiência em IL-12 mostraram desenvolvimento de colite, porém, nesses camundongos, a inflamação sistêmica foi mais pronunciada, indicando que a IL-12 não é necessária para a patologia inata da mucosa, mas é essencial para a resposta sistêmica, cujos mecanismos envolvidos não foram investigados nesse trabalho (UHLIG et al., 2006).

Além dos mecanismos efetores envolvidos tanto na proteção quanto na indução de doenças, a mucosa intestinal possui mecanismos reguladores, onde as células T reg apresentam importância fundamental. Essas células são abundantes no GALT, e evitam reações inflamatórias contra proteínas provenientes dos alimentos que podem levar ao desenvolvimento de alergias. Previnem respostas direcionadas contra os antígenos próprios através da produção de TGF- β e IL-10 (SHEVACH, 2000), evitando o surgimento de doenças autoimunes (SURI-PAYER et al., 1998). Além disso, inibem reações contra os microorganismos comensais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

No contexto das respostas efetoras e reguladoras, o TGF- β atua como fator importante. A depender da sua concentração, bem como da presença de outras citocinas, o TGF- β controla o balanço entre as células Th17 e T reg *in vitro* (BETTELLI et al., 2006; ZHOU et al., 2008). Estudo prévio demonstrou que a inadequada ativação do TGF- β pelas células dendríticas ocasionou a perda das células T reg na lâmina própria (TRAVIS et al., 2007), confirmando a importância de um apropriado mecanismo de ativação do TGF- β para a diferenciação dessas células (IVANOV et al., 2008).

2.6 Importância das interleucinas 12 e 23

As interleucinas IL-12 e IL-23 apresentam diversas características em comum. Ambas são produzidas, predominantemente, por monócitos, macrófagos e células dendríticas ativadas (OPPMANN et al., 2000; PFLANZ et al., 2002) e seus receptores são expressos em macrófagos, células dendríticas, células NK e células T ativadas (TRINCHIERI, 2003; WATFORD et al., 2003). Além disso, apresentam semelhanças estruturais uma vez que são heterodímeros que compartilham a subunidade p40. Essa subunidade comum, quando ligada a p35, dá origem a IL-12; quando ligada a p19, forma a IL-23 (PARHAM et al., 2002; TRINCHIERI; PFLANZ; KASTELEIN, 2003). Os respectivos receptores celulares também apresentam a mesma subunidade, IL-12R β 1, diferindo apenas quanto à segunda, sendo a IL-12R β 2 para IL-12 e IL-23R para IL-23 (REINER, 2007). Apesar dessas semelhanças, ambas são distintas quanto às suas funções. A IL-12 induz, preferencialmente, a produção de IFN- γ pelos linfócitos Th1, importante na destruição de patógenos intracelulares, enquanto a IL-23, por sua vez, induz a produção de IL-17, citocina com atividade proinflamatória (AGGARWAL et al., 2003; KOLLS; LIDEN, 2004) pelas células Th17 (WEAVER et al., 2006).

A IL-12 produzida durante a resposta inflamatória induz a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e NK, o qual aumenta a expressão de genes que codificam as subunidades IL-12p40 e IL-12p35. Dessa forma, a produção de IL-12 é aumentada e a resposta amplificada, resultando na diferenciação de células Th1 (MA et al., 1996). Estas células promovem a imunidade mediada por células e estimulam a atividade bactericida dos fagócitos (WATFORD et al., 2003), além de atuarem na resistência sistêmica a infecções,

particularmente aquelas provocadas por bactérias e parasitos intracelulares (TRINCHIERI, 1998).

A IL-23 produzida pelas células da imunidade inata, como células dendríticas e macrófagos, em resposta a produtos microbianos (KRAJINA et al., 2003; OPPMAN et al., 2000; SMITS et al., 2004) induz uma rápida produção de IL-17 pelas células T residentes do tecido (HAPPEL et al., 2003; LANGRISH et al., 2005; STARK et al., 2005). A IL-17 promove a produção de citocinas proinflamatórias, as quais recrutam neutrófilos para o local da inflamação. Dessa forma, a IL-23 direciona a resposta imune inicial. Em seguida, as células Th17 invadem os tecidos e proporcionam o recrutamento contínuo de neutrófilos (AGGARWAL et al., 2003; LANGRISH et al., 2005). Assim, uma das principais funções da IL-23 é o rápido recrutamento de neutrófilos para o local da infecção aguda, garantindo a resposta inicial para o controle da infecção antes da completa formação da resposta Th1 antimicrobiana, a qual leva alguns dias para se desenvolver (MCKENZIE; KASTELEIN; CUA, 2006). Além de sua importância na resposta inflamatória, através da indução do influxo de neutrófilos, a IL-23 é importante para as respostas imunes dependentes de células T, como produção de anticorpos e reação de hipersensibilidade tardia (GHILARDI et al., 2004), através da indução e manutenção da resposta Th17 (NAKAE et al., 2002).

Dada a importância da IL-12 e da IL-23, os camundongos IL-12p40 KO, deficientes na produção de ambas as citocinas, apresentam prejudicadas respostas Th1 e Th17. Foi observado que células de linfonodos mesentéricos de camundongos IL-12p40 KO imunizados com antígeno protéico (T dependente) apresentaram um desvio para a polarização da resposta Th2, marcado por aumento na capacidade de produzir IL-4, bem como apresentaram reduzida capacidade de gerar reação de hipersensibilidade tardia (MAGRAM et al., 1996).

Considerando que os camundongos IL-12p40 KO apresentam deficiência nas respostas Th1/Th17, esses animais apresentam-se predispostos ao desenvolvimento de uma resposta Th2 polarizada e torná-los menos responsivos às vacinações. Nesse contexto, foi nosso interesse investigar se a amamentação prévia em mães infectadas pelo *S. mansoni* induz, na vida adulta, exacerbação desse fenótipo após a imunização com OVA.



OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a influência que o leite de mães infectadas pelo *S. mansoni* exerce sobre as imunidades humoral e celular, na ausência das citocinas IL-12/IL-23, em camundongos C57BL/6 adultos, em resposta ao antígeno heterólogo ovalbumina.

3.2 Específicos

Comparar, entre camundongos C57BL/6 adultos, com ou sem deficiência na produção de IL-12/IL-23, previamente amamentados em mães esquistossomóticas, os seguintes parâmetros:

- Cinética das reações de hipersensibilidade *in vivo* frente ao antígeno heterólogo ovalbumina;
- Níveis plasmáticos das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a específicos para ovalbumina;
- Produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β pelas células esplênicas, após estimulação *in vitro* com ovalbumina ou concanavalina A.



MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e infecção pelo *S. mansoni*

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 dos seguintes genótipos: selvagem (*wild-type*-WT) ou deficiente em IL-12p40 (IL-12p40 KO). Os genitores foram adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) com aproximadamente 4 semanas de idade. Sendo mantidos no Biotério Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ – Pernambuco, Brasil), sob condições padronizadas de temperatura (~23°C) e luminosidade (12 horas de claro/12 horas de escuro), recebendo água e alimentação *ad libitum*, com dieta padrão comercial (Nuvilab, Curitiba, PR). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqAM/FIOCRUZ (Pernambuco, Brasil). A infecção pelo *S. mansoni* foi realizada por via percutânea, com 30 cercárias obtidas de exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório e infectados por miracídios da cepa BH (Belo Horizonte- Minas Gerais, Brasil). Após 45 dias, a positividade da infecção foi confirmada pelo exame parasitológico das fezes através da técnica de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972), sendo examinadas 3 lâminas de cada animal.

4.2 Desenho experimental

Para formação dos grupos experimentais foram utilizadas 10 fêmeas WT infectadas pelo *S.mansoni*, 10 fêmeas WT e 30 fêmeas IL-12p40 KO não infectadas. No 60º dia após a infecção, todas as fêmeas (infectadas ou não) tiveram seus estros regulados (FOWLER; EDWARDS, 1957; WANG et al., 2001) pela administração de 5 UI (100 µL) de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e 5 UI (100 µL) de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), após 48 horas. As fêmeas foram acasaladas aos pares com um único macho do respectivo genótipo e a confirmação do acasalamento foi verificada através da presença do “plug” vaginal.

Após o nascimento, os descendentes machos, com genótipo IL-12p40 KO, foram divididos em dois grupos AI IL-12p40 KO, descendentes amamentados por fêmeas com genótipo WT, infectada pelo *S. mansoni*, e o grupo NANI IL-12p40 KO amamentados por fêmeas com genótipo WT, não infectada (Figura 1A). Como grupos controles foram utilizados filhotes nascidos de fêmeas com genótipo WT, não infectadas. Foram divididos em dois grupos: um grupo amamentado pela fêmea com genótipo WT, infectada, denominado de AI WT; outro amamentado pelas fêmeas com genótipo WT, não infectadas, denominado de NANI WT (Figura 1B).

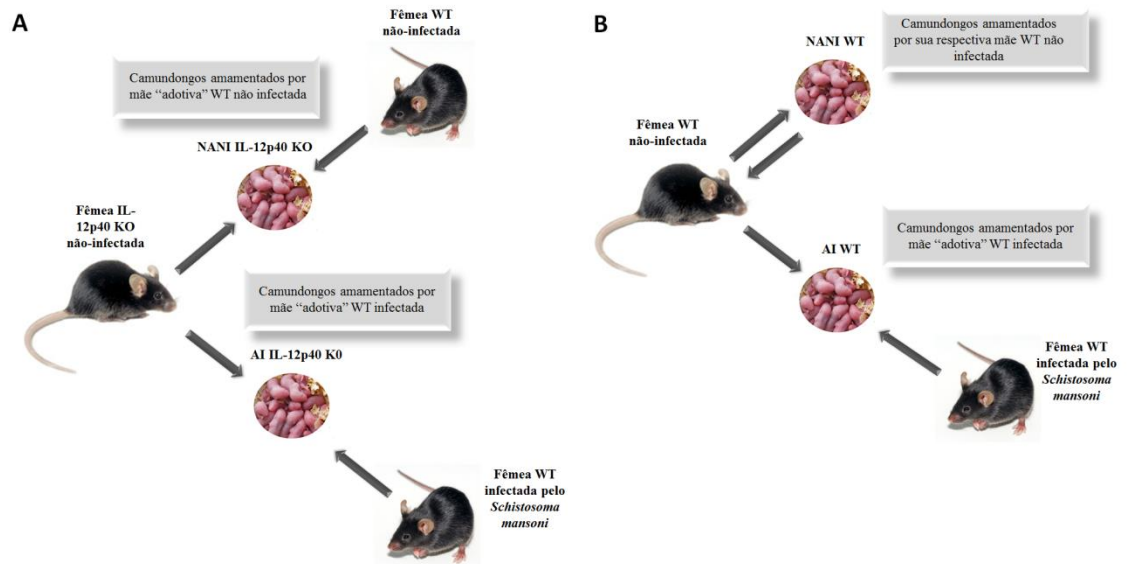


Figura 1: Grupos experimentais. **A.** Grupos com genótipo *knockout* para IL-12p40 (IL-12p40 KO). Grupo NANI IL-12p40 KO formado por camundongos nascidos da fêmea IL-12p40 KO não infectada pelo *Schistosoma mansoni*, que foram amamentados, de forma “adotiva”, pela fêmea com genótipo selvagem (*wild type*/WT), não infectada. Grupo AI IL-12p40 KO formado por camundongos nascidos da fêmea IL-12p40 KO não infectada pelo *S. mansoni*, que foram amamentados de forma “adotiva” pela fêmea com genótipo WT, não infectada. **B.** Grupos com genótipo selvagem (WT). Grupo NANI WT formado por camundongos nascidos da fêmea WT não infectada, que foram amamentados pela sua respectiva mãe. Grupo AI WT formado por camundongos nascidos da fêmea WT não infectada, que foram amamentados de forma “adotiva” pela fêmea WT infectada.

No 45º dia após o nascimento, os diferentes grupos foram submetidos ou não à imunização, gerando os seguintes subgrupos: (1) AI IL-12p40 KO imunizados; (2) AI IL-12p40 KO não imunizados; (3) NANI IL-12p40 KO imunizados; (4) NANI IL-12p40 KO não imunizados; (5) AI WT imunizados; (6) AI WT não imunizados; (7) NANI WT imunizados; (8) NANI WT não imunizados. Cada subgrupo foi composto por um número que variou entre 6 e 10 animais.

4.3 Imunização

A imunização foi realizada por injeção na base da cauda, via subcutânea, de 100 µg de OVA 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), emulsificada na proporção de 1:1 em Adjuvante Completo de Freund – CFA (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), com volume total de 0,1 mL por animal.

4.4 Reações de hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade (RH) foram avaliadas nos diferentes grupos no 8º dia após a imunização. Camundongos de todos os grupos (imunizados ou não com OVA) foram submetidos ao desafio antigênico por inoculação de 30 µL de OVA agregada (2%), por via intradérmica (ID), no coxim plantar. Na pata contralateral foram inoculados 30 µL de solução salina. A espessura da pata foi medida com o auxílio de um paquímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) 3, 6, 9 e 24 horas após o desafio, sendo os resultados expressos como média aritmética das diferenças obtidas entre a mensuração das duas patas $\pm$ desvio padrão da média.

4.5 Cultura de esplenócitos e determinação dos níveis de citocinas

Os baços dos camundongos descendentes, dos diferentes grupos, foram removidos no 9º dia pós-imunização. As suspensões de células esplênicas de cada animal foram obtidas

aspticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo – Brasil), complementado com HEPES (10 mM), 2-mercaptoetanol (0,05 mM), 1% de L-glutamina e antibiótico gentamicina (50 mg/L), centrifugadas a 402 x g por 10 min. As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, durante 18 segundos. As células foram ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 5% de soro bovino fetal (Imunoquímica, Rio de Janeiro - Brasil) e a viabilidade observada após coloração pelo azul de Trypan a 10%. As células ressuspendidas foram cultivadas em placas de 48 poços (Costar Cambridge, MA, USA) numa concentração de 5×10^6 células viáveis/poço, durante 48 horas e submetidas a diferentes estímulos (OVA – 500 µg/mL, ConA - 5µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, e após o período de cultivo os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas produzidas.

Os níveis das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β foram mensurados através de ELISA de captura (R&D Systems MIF00, M1700, M5000, M6000B, M1000 e MB100B, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550). As concentrações das citocinas nas amostras foram calculadas pelo programa Microplate Manager, versão 4.0, a partir de curvas-padrão obtidas com seus respectivos recombinantes. Os resultados são apresentados como média aritmética $\pm$ desvio padrão da média.

4.6 Dosagem de anticorpos

O sangue dos animais dos diferentes grupos foi obtido no 9º dia pós-imunização, através do plexo axilar, após anestesia (20 µL de Xilasina e 40 µL de Ketamina). Utilizou-se

anticoagulante (ácido cítrico a 0,25 M) diluído em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) numa proporção de 1:3 e centrifugado a 402 x g por 3 min. Os plasmas coletados foram submetidos a diluições seriadas e, em seguida, utilizados para dosagem dos isotipos IgG1 e IgG2a através de ELISA indireto. Placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de OVA (20 µg/mL diluída em PBS a 0,01 M, com pH de 7,2) e incubadas à temperatura de 4°C por 18 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 (PBST) e os poços bloqueados com 200 µL/poço de PBST contendo 3% de leite desnatado, por 3h a 37°C. As placas foram, então, lavadas com PBST e, em seguida, adicionados os plasmas (200 µL/poço) diluídos em PBST com 1,5% de leite desnatado, nas proporções indicadas pelos fabricantes dos respectivos anticorpos. As placas foram novamente incubadas, e após esse período, três novas lavagens foram realizadas para posterior adição de anticorpos biotinilados (100 µL/poço) específicos para IgG1 ou IgG2a (Southern Biotechnolgy Associates, Inc, AL, USA) nas diluições indicadas pelos fabricantes e incubados. Finalizado o período de incubação, as placas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens com PBST, para posterior adição (100 µL/poço) do conjugado enzimático (estreptoavidina-peroxidase a 1:6000 - Sigma Chemical, St. Louis, Mo. USA), seguida da incubação a 37°C por 1 hora. Após uma nova série de lavagens, foi adicionado (100 µL/poço) do substrato contendo 10 mg de cromógeno [OPD (Ortho-phenyldiamine-Chemical, St. Louis, Mo. USA)], 10 mL de tampão citrato (0,1 M, com pH de 5,5) e 10 µL de peróxido de hidrogênio (30%). Após 10 min, a reação foi bloqueada pela adição de ácido cítrico a 0,2 M (100 µL/poço) e a leitura realizada a 450 nm em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550). Os resultados são apresentados como mediana $\pm$ desvio médio.

4.7 Análise estatística

Para realização da análise dos resultados obtidos foi utilizado o programa BioEstat versão 5.0. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de gráficos, incluindo o uso de medidas descritivas como média aritmética, mediana, desvio padrão e desvio médio. Para a análise comparativa das variáveis quantitativas foram aplicados os testes “t” de *Student*, *Mann Whitney* ou Análise de variância (ANOVA). Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

4.8 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), bem como pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do CPqAM/FIOCRUZ (ANEXO B).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1

IL-5, IL-6, TGF- β e eosinófilos, mas não IL-17, são melhorados pela amamentação em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*

INTRODUÇÃO

Cerca de 40 milhões de mulheres em idade fértil e 10 milhões de mulheres grávidas infectadas cronicamente pelo *Schistosoma* vivem em áreas endêmicas para a doença⁽¹⁾. A associação entre esquistossomose e gravidez pode influenciar a resposta imune do descendente, a longo prazo⁽²⁻⁴⁾. Estudos prévios avaliaram o efeito da amamentação (separado da gestação) exercida por mães experimentalmente infectadas pelo *Schistosoma mansoni*, sobre a resposta imune de camundongos adultos, imunizados com o antígeno ovalbumina (OVA)^(5, 6). Os resultados revelaram níveis elevados de anticorpos anti-OVA e IL-2⁽⁵⁾, além de aumento da capacidade de apresentação de antígeno pelos linfócitos B⁽⁶⁾. Todavia, a produção de IL-10 e IFN- γ não foi alterada⁽⁵⁾. No entanto, as citocinas envolvidas na manutenção e amplificação da resposta imune humoral não foram avaliadas.

Quando a reação de hipersensibilidade do tipo tardio *in vivo* (RHT) é precedida por reação de hipersensibilidade imediata, a qual se desenvolve em minutos ou poucas horas após o desafio com o antígeno, sua celularidade se altera em decorrência da ação de anticorpos anafiláticos ou complexos imunes⁽⁷⁾. Nesse sentido, foi verificado que descendentes adultos amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni*, não apresentaram alteração na intensidade da RHT anti-OVA *in vivo*, apesar do aumento observado na imunidade humoral⁽⁵⁾. Entretanto, a análise do influxo celular desses camundongos não foi realizada.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção das citocinas IL-5, IL-6, TGF- β e IL-17, bem como a histopatologia da RHT *in vivo*, no descendente adulto amamentado por mãe infectada pelo *S. mansoni*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos C57BL/6, com 4 semanas de idade, adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). Para obter leite de mães infectadas, fêmeas foram infectadas com 30 cercárias de *S. mansoni*, cepa BH (Belo Horizonte- Minas Gerais, Brasil). Sessenta dias após a infecção, os estros foram regulados⁽⁵⁾. Em seguida, as fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para cada fêmea. O mesmo procedimento foi realizado para as fêmeas não infectadas. Imediatamente após o nascimento, os camundongos recém-nascidos foram submetidos ao protocolo de amamentação “adotiva”. Para isto, 50% dos descendentes machos, nascidos de mães não infectadas, foram amamentados por mães infectadas (grupo AI); os 50% restantes foram amamentados pelas suas respectivas mães não infectadas (grupo NANI).

Seis semanas após o nascimento, os descendentes machos foram imunizados, por via subcutânea na base da cauda, com 100 μ g de OVA 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), emulsificada na proporção de 1:1 em Adjuvante Completo de Freund – CFA (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), com volume total de 0,1 mL por animal. Os camundongos foram divididos em 4 subgrupos (n = 6): (1) AI + OVA; (2) AI não imunizado; (3) NANI + OVA; (4) NANI não imunizado. Após 8 dias, os camundongos foram desafiados com 2% de OVA agregada injetada na pata, e a RHT foi mensurada após 24 horas. A análise histopatológica da pata de cada camundongo foi realizada após coloração com hematoxilina-

eosina (HE). Para isto, foram avaliados os tipos celulares que compunham o infiltrado inflamatório, como também foi calculada a média de eosinófilos obtida através análise de três lâminas por grupo, considerando: 0 – infiltrado eosinofílico ausente; < 9 – leve; 10 a 15 moderado; > 20 intenso. Após a sangria total dos camundongos, os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA foram mensurados no plasma por ELISA indireto. Células esplênicas (5×10^6 células/mL) foram cultivadas com OVA (500 µg/mL) e os sobrenadantes foram coletados, após 48 horas, para análise da produção de citocinas (R&D system M5000, M6000B, MB100B e M1700 para IL-5, IL-6 TGF-β e IL-17, respectivamente). As amostras foram quantificadas pela comparação com as curvas-padrão obtidas a partir das citocinas recombinantes purificadas, cujos limites de detecção foram de 15,6 pg/mL para IL-5 e TGF-β; 7,8 pg/mL para IL-6 e 10,9 pg/mL para IL-17. Para a análise comparativa das variáveis foi aplicada a análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida por múltiplas comparações utilizando o teste de *Tukey*. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos. O protocolo desse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil (Protocolo nº 01/2010).

RESULTADOS

A RHT dos camundongos imunizados com OVA foi similar entre os camundongos que tiveram contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas (AI) e aqueles que foram amamentados por mães sem infecção (NANI) (dados não mostrados). A análise histopatológica das patas do grupo NANI (Figura 1A) mostrou intenso processo inflamatório,

contendo neutrófilos e piócitos (seta preta, quadrante superior direito), o qual ocupava o derma profundo (círculo) e o hipoderma, invadindo a musculatura subjacente, com focos de abcedação (quadrados). Diferentemente, no grupo AI (Figura 1B) houve intenso e extenso infiltrado de células inflamatórias, com forte edema da derme (setas pretas pontilhadas) e hipoderma ocupado por moderada infiltração eosinofílica que se estende ao longo da musculatura subjacente. Foram observados macrófagos e plasmócitos em ambos os grupos.

Como esperado, foram observados altos níveis de anticorpos anti-OVA no grupo AI, em comparação com o grupo NANI (dados não mostrados). No que se refere à produção de citocinas, os níveis de IL-5, IL-6 e TGF- β foram significativamente mais altos no grupo AI, quando comparados com os níveis produzidos pelo grupo NANI (Figura 2A, B, C). Todavia, a produção de IL-17 foi mais baixa nos camundongos amamentados por mãe infectada (Figura 2D).

DISCUSSÃO

A capacidade que o leite materno possui de facilitar a formação das células B no sistema imune imaturo e aumentar a produção de diferentes tipos de anticorpos⁽⁸⁾ parecem ser aumentadas pela infecção materna provocada pelo *S. mansoni*⁽²⁻⁶⁾. No presente estudo, camundongos C57BL/6 selvagens, que tiveram contato prévio com o leite de mães infectadas, apresentaram um significativo aumento na síntese de IL-5, IL-6 e TGF- β , bem como maior influxo celular, mediado pelo perfil Th2, nos tecidos da pele.

O controle exercido pelas respostas Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4) clássicas, sobre a secreção de anticorpos opsonizantes/ativadores do complemento (IgG) e anafiláticos

(IgE/IgG1), respectivamente, já é bem descrito na literatura⁽⁹⁻¹¹⁾. O TGF- β , por sua vez, favorece o desenvolvimento dos linfócitos B⁽¹²⁾ e, juntamente com IL-5 e IL-6, induz a proliferação e diferenciação de células plasmáticas secretoras de anticorpos⁽¹³⁻¹⁵⁾. Esses dados corroboram o aumento significativo da imunidade humoral do grupo AI.

A IL-17 atua na proteção contra bactérias extracelulares via anticorpos T-dependentes^(16, 17). Porém, os resultados do presente estudo mostraram baixos níveis de IL-17 nos camundongos AI. Esses achados, associados aos altos níveis de IL-6 e TGF- β , sugerem que os animais amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni* desenvolveram uma resposta Th17 clássica, menos nociva⁽¹⁰⁾. Esse fato pode ser importante uma vez que indica que os camundongos AI apresentaram uma resposta de anticorpos controlada contra antígenos vacinais, podendo evitar imunopatologias mediadas por anticorpos, como autoimunidades.

O contato prévio com o leite de mães infectadas não mudou a intensidade da RHT anti-OVA *in vivo*, no entanto, alterou sua celularidade. Nesse tipo de reação, o influxo de macrófagos/neutrófilos e eosinófilos nos tecidos é mediado por citocinas Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4/IL-5), respectivamente^(18, 19). Além disso, as células Th17 reforçam a infiltração neutrofílica^(10, 20). Em estudo anterior, a produção de IL-4 não foi detectada e os níveis de IFN- γ não foram alterados no grupo de animais que mamou em mães infectadas⁽⁵⁾. Todavia, os altos níveis de IL-5 podem atuar na maturação dos precursores eosinofílicos na medula óssea, assim como estimular a síntese de proteínas granulares⁽²¹⁾. Além disso, a expressão local de IL-5 facilita o influxo dessas células nos sítios inflamatórios⁽²²⁾.

Apesar de os nossos resultados terem identificado alta produção de IL-5 e eosinófilos no tecido cutâneo dos camundongos AI, a importância da amamentação na redução do risco de doenças alérgicas⁽²³⁾ torna importante o desenvolvimento de um modelo experimental murino de alergia, que possa auxiliar na compreensão da doença nesses descendentes adultos.

Essa abordagem vem sendo empregada em nosso laboratório para o modelo da asma. Da mesma forma, a avaliação do conteúdo do leite de mães esquistossomóticas por espectrometria de massa deverá ser realizada.

Em conclusão, o leite de mães infectadas pelo *S. mansoni* pode favorecer a produção de anticorpos, uma vez que aumenta a produção de citocinas envolvidas na maturação e manutenção da imunidade humoral. Além disso, a amamentação em mães esquistossomóticas pode induzir um predominate perfil Th2/eosinofilia em resposta ao antígeno heterólogos mais adjuvante. Esses achados destacam o uso de antígeno parasitário durante a amamentação como uma ferramenta de imunomodulação para alterar o resultado da imunopatologia cutânea induzida pela resposta Th1.

FIGURAS E LEGENDAS

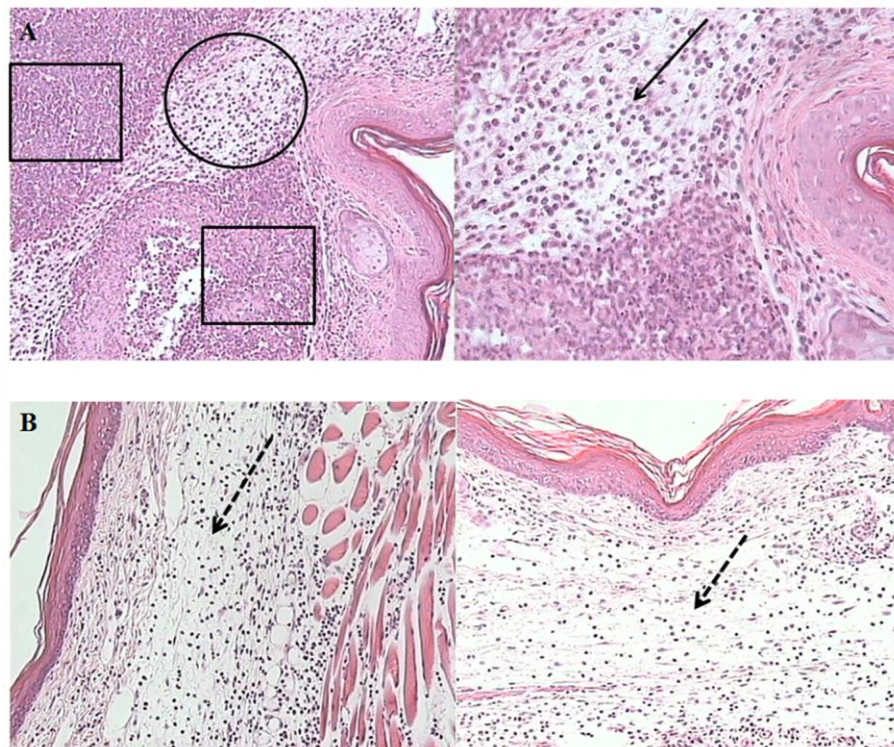


Figura 1: Infiltrado celular na pele da pata de camundongo C57BL/6 amamentado por mãe não infectada (NANI) (A) ou por mãe infectada pelo *Schistosoma mansoni* (AI) (B). Derma

profundo (círculo), focos de abcedação (quadrados), neutrófilos e piócitos (seta preta, quadrante superior direito). Edema da derme e infiltrado eosinofílico (setas pontilhadas). (Coloração de hematoxilina-eosina. **A.** 200x e 400x. **B.** 200x).

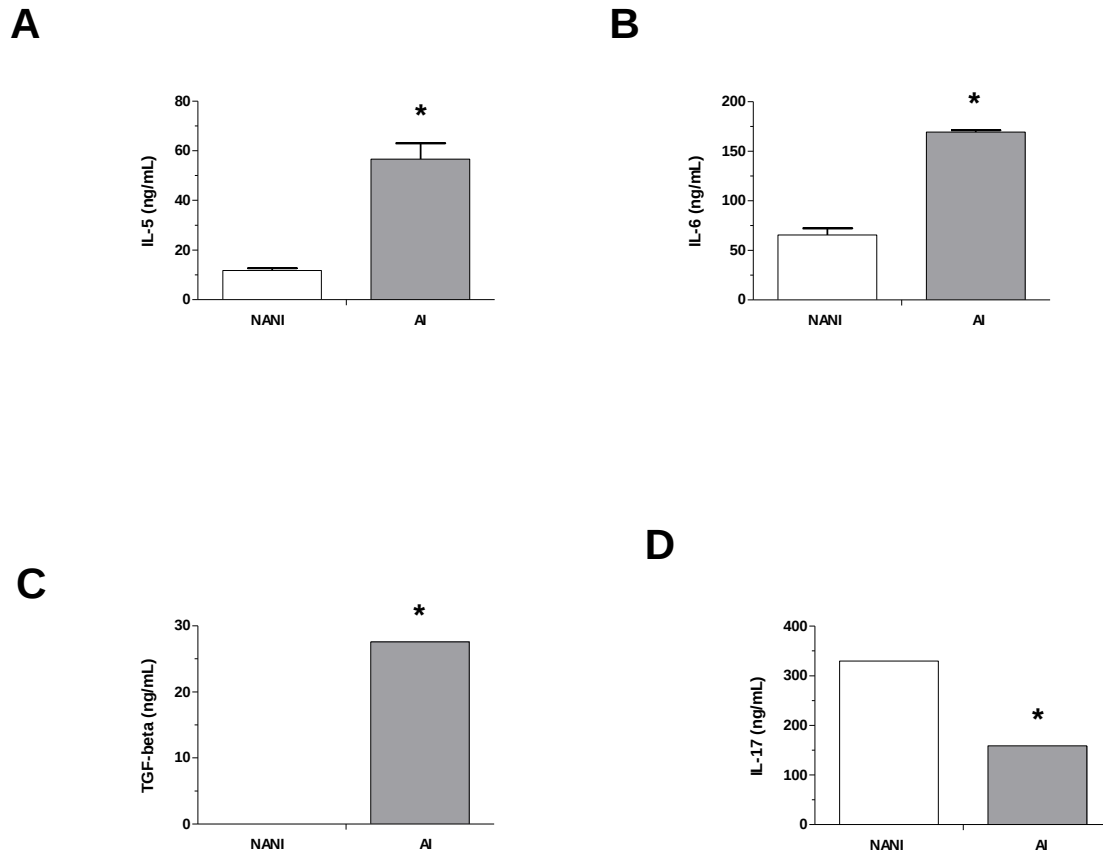


Figura 2: IL-5 (**A**), IL-6 (**B**), TGF- β (**C**) e IL-17 (**D**) secretadas por células esplênicas de camundongos C57BL/6, amamentados por mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (AI) ou por mães não infectadas (NANI), os quais foram imunizados com OVA em adjuvante (CFA). Um total de 5×10^6 células/mL foi estimulado com OVA (500 μ g/mL). As citocinas foram quantificadas em sobrenadante, após 48 horas, por ELISA de captura. Os resultados representam a média da concentração (pg/mL) $\pm$ desvio padrão da média de 7 camundongos/grupo. As células não estimuladas produziram <15.6 pg/mL of IL-5 and TGF- β , <7.8 pg/mL of IL-6 and <10.9 pg/mL of IL-17. * $p < 0.05$ comparado com o grupo NANI.

REFERÊNCIAS

- 1 Salawu OT & Odaibo AB. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *Int J Gynecol Obstet* 2013; **122**: 1-4.
- 2 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.
- 3 Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, *et al.* Helminth and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. *J Immunol* 1999; **162**: 6843-6848.
- 4 LaBeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL & King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *Plos Negl Trop Dis* 2009; **3**: e442.
- 5 Santos PEA, Sales IRF, Schirato GV, *et al.* Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res* 2010; **107**: 95-102.
- 6 Santos PEA, Lorena VMB, Fernandes ES, *et al.* Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cell from adult offspring mice. *Exp Parasitol* 2014; **141**: 62-67.
- 7 Jacysyn JF, Abrahamsohn IA & Macedo MS. Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen. *Immunology* 2001; **102**: 373-379.
- 8 Malanchère E, Huetz F & Coutinho A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 788-793.

- 9 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA & Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**: 2348–2357.
- 10 Akdis M, Palomares O, Veen WV, Splunter MV & Akdis CA. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 1438–1449.
- 11 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 133–146.
- 12 Weaver C, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M & Murphy KM. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; **24**: 677–688.
- 13 Messika EJ, Lu PS, Sung YJ, *et al.* Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med* 1998; **188**: 515–525.
- 14 Knödel M, Kuss AW, Berberich I & Schimpl A. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 1972–1980.
- 15 Cassese G, Arce S, Hauser AE, *et al.* Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 2003; **171**: 1684–1690.
- 16 Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, *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**: 375–87.

- 17 Ghilardi N, Kljavin N, Chen O, Lucas S, Gurney AL & Sauvage FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23- deficient mice. *J Immunol* 2004; **172**: 2827-2833.
- 18 Akkoc T, Eifan AO, Aydogan M, Ozkara S, Bahceciler NN & Barlan IB. Transfer of T cells from intranasal ovalbumin-immunized mice ameliorates allergic response in ova-sensitized recipient mice. *Allergy Asthma Proc* 2008; **29**: 411–416.
- 19 Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S & Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 2011; **66**: 989–998.
- 20 Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torre RM & Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 2007; **9**: 78–86.
- 21 Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **105**: 651-663.
- 22 Meeusen ENT & Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 2000; **16**: 95–101.
- 23 Kull IRN, Almquist C, Lilja G, Pershagen G & Wickman M. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **114**: 755-760.

5.2

Amamentação exercida por mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* melhora a produção de IL-5 e TGF- β em camundongos deficientes em IL-12p40, mas prejudica a produção de IL-6.

INTRODUÇÃO

Infecção esquistossomótica materna, durante o período de amamentação, pode alterar a resposta imune de descendentes 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). Em relação à imunidade para antígenos não relacionados ao parasita, em humanos, a infecção materna por *Schistosoma haematobium* diminuiu a eficácia da vacinação ao Bacilo Calmette-Guérin e a produção de IFN- γ (Malhotra et al. 1999). Do contrário, uma correlação positiva foi observada entre os níveis de IgE contra antígeno de *Schistosoma mansoni* e manifestações de alergias gastrointestinais em crianças que receberam leite de mães esquistossomóticas (Noureldin et al. 1998). O efeito da amamentação, separado da gestação, em mães infectadas pelo *S. mansoni* foi avaliado em descendentes adultos imunizados com ovalbumina (OVA). O contato prévio com leite de mães infectadas levou à maior produção de anticorpos anti-OVA e IL-2 (Santos et al. 2010), bem como, melhorou a capacidade de apresentação de antígenos pelos linfócitos B (Santos et al. 2014). Então, a capacidade do leite materno de facilitar a formação do repertório de células B no sistema imune imaturo e aprimorar a produção de anticorpos de diferentes especificidades (Malanchère et al. 1997) parece ser melhorada com a parasitose materna.

Antígenos parasitários e anticorpos contra o parasita, transferidos pelo leite materno (Lenzi et al. 1987; Attallah et al. 2003, 2006), podem entrar em contato com o sistema imune imaturo da mucosa intestinal ou atuar de forma sistêmica. De fato, há transporte de

componentes imunes funcionalmente intactos para a circulação sanguínea, devido a menor capacidade digestiva do recém-nascido (Rodewald, 1973; Zizka et al. 2007). Sendo assim, o leite de mães infectadas pode estimular mecanismos imunorregulatórios, entre eles a síntese de citocinas IL-12 e IL-23, que direcionam resposta imune para uma ótima produção de anticorpos/memória imunológica (Trinchieri, 2003; Beadling; Slifka, 2006; Ghilardi et al., 2004), predispondo os lactentes a desenvolverem uma acentuada imunidade humoral na vida adulta.

IL-12 e IL-23, produzidas por células dentríticas e macrófagos, compartilham a subunidade IL-12p40 (Parham et al. 2002; Trinchieri, 2003; Reiner, 2007), porém regulam a resposta imune por vias distintas. A IL-12 direciona a resposta imune para o perfil Th1, estimulando a produção de IFN- γ (Hsieh et al. 1993; Macatonia et al. 1993; 1995). Esta última citocina participa do *switching* para anticorpos IgG, opsonizantes e ativadores do sistema complemento, como também atua na resposta imune dependente de células contra patógenos intracelulares (Peng et al. 2002; Trinchieri, 2003). A IL-12 atua bloqueando a geração de células Th2 (Swain et al. 1990). Então, na incapacidade de produção de IL-12 há um direcionamento da resposta para o perfil Th2, com maior produção de IL-4, IL-5, IL-13 (Mosmann et al. 1986; Akdis et al. 2012) que estão envolvidas na ativação de células B, *switching* para anticorpos anafiláticos IgE and IgG1 (Matsumoto et al. 1989).

A IL-23 tem como principal sítio de produção o íleo distal do intestino (Becker et al. 2003) e induz amplamente a resposta de anticorpos para antígenos T-dependentes (Beadling and Slifka, 2006; Ghilardi et al. 2004). É um fator essencial na expansão e diferenciação terminal do subtipo de linfócitos Th17 (Nurieva et al. 2007). Na presença de TGF- β e IL-6 é gerado um perfil de linfócitos Th17 clássicos (produção de IL-21, IL-9 e IL-10). Em contraste, na ausência de TGF- β e presença de IL-6 e IL-23, são geradas células Th17 mais patogênicas produtoras de níveis elevados de IL-22, GM-CSF e IFN- γ (Akdis et al. 2012).

Então, o conjunto de ação da IL-23, junto com TGF- β e IL-6, pode influenciar na plasticidade das células Th17, seja no estabelecimento de hiperativação do sistema imune, defesa contra patógenos extracelulares ou quebra da tolerância oral (Aujla et al. 2007, 2008; Bettelli et al. 2006; Khader et al. 2007; McKenzie et al. 2006; Ouyang et al. 2008).

Para equilibrar a resposta Th17 a ação da IL-10 e das células T regulatórias (T reg) é essencial. O TGF- β é necessário para a diferenciação de ambos subtipos Th17 e T reg. Esta citocina induz a produção de IL-10 pelas células Th17, a qual é inibida pela IL-23 (Akdis et al. 2012). A IL-10 produzida pelas T reg, ou diretamente pelas células Th17 clássicas, bloqueia a exacerbação da reação inflamatória mediada por Th17 patogênicas (Shevach, 2000; Akdis et al. 2012).

Sabendo que o leite de mães esquistossomóticas hiperativa a resposta humoral para antígenos heterólogos, a longo prazo, a presente investigação verificou o comportamento imunológico dos descendentes adultos, previamente amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*, na ausência das citocinas interrelacionadas IL-12 e IL-23. Para isto, camundongos deficientes para a subunidade IL-12p40 foram amamentados em mães esquistossomóticas e, quando adultos, imunizados com ovalbumina em adjuvante. As reações de hipersensibilidade *in vivo* e a produção de anticorpos anti-OVA foram avaliadas, bem como, os níveis das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-6, IL-5, TGF- β e IL-10 produzidos por células esplênicas. Pôde ser observado que os descendentes que tiveram contato prévio com leite de mães infectadas apresentaram melhora na reação de hipersensibilidade tardia, produção de IgG2a, IL-5, TGF- β e IL-6, enquanto houve diminuição na síntese de IL-17. Na ausência de IL-12/IL-23, a amamentação prévia manteve este aumento na imunidade do descendente, exceto para IL-6.

Estes achados sugerem que em indivíduos de área endêmica para esquistossomose, o contato com antígenos parasitários, durante a lactação, predispõe a uma melhor imunidade

para anticorpos opsonizantes contra antígenos heterólogos. Entretanto, em condições de deficiência IFN- γ /IL-17, pode controlar uma exacerbada reação imune através da produção de TGF- β e inibição na produção de IL-6.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e infecção pelo S. mansoni

Camundongos C57BL/6 selvagens (*wild-type*/WT) ou deficientes em IL-12p40 (IL-12p40 KO) de ambos os sexos, com 4 semanas de idade, foram adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil). Para obter doadoras de leite materno, parte das fêmeas WT foi infectada, por via subcutânea (SC), com 30 cercárias de *S. mansoni*, cepa BH (Belo Horizonte- Minas Gerais, Brasil). Após 45 dias, a positividade da infecção foi confirmada pelo exame parasitológico das fezes, através da técnica de Kato-Katz. Sessenta dias após a infecção, os estros foram regulados pela administração de 5 UI (100 μ L) de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) mais 5 UI (100 μ L) de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), após 48h (Santos et al. 2010). Em seguida, as fêmeas foram acasaladas com machos WT, na proporção de um macho para cada fêmea. O sucesso do acasalamento foi verificado pela presença do “plug” vaginal. O mesmo procedimento foi realizado para as fêmeas não infectadas. Para obter recém-nascidos IL-12p40 KO, fêmeas e machos IL-12p40 KO foram acasalados seguindo o mesmo protocolo utilizado para os animais WT. Ao completarem seis semanas de idade, os descendentes machos foram separados para formação dos grupos experimentais e controles. Todos os animais foram mantidos no Biotério Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ – Pernambuco, Brasil). O protocolo

desse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brasil (Protocolo nº 01/2010).

Grupos de estudo e protocolo de imunização

Imediatamente após o nascimento, os recém-nascidos WT ou IL-12p40 KO foram submetidos ao protocolo de amamentação “adotiva”. Dessa forma, parte dos descendentes machos nascidos de fêmeas WT não infectadas foi amamentada por fêmeas WT infectadas (AI WT); a outra parte permaneceu amamentada pelas suas respectivas mães não infectadas (NANI WT). Da mesma forma, parte dos descendentes machos nascidos das mães IL-12p40 KO foi amamentada por fêmeas WT infectadas (AI IL-12p40 KO), enquanto a outra parte foi amamentada por fêmeas WT não infectadas (NANI IL-12p40 KO).

Após seis semanas, os descendentes machos foram agrupados em subgrupos (n = 5) e submetidos ao protocolo de imunização com OVA. Os camundongos foram imunizados, por via SC na base da cauda, com 100 µg de OVA 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), emulsificada na proporção de 1:1 em Adjuvante Completo de Freund – CFA (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), com volume total de 0,1 mL por animal. Para avaliar o efeito pós-natal da infecção pelo *S. mansoni* durante a amamentação foram formados oito subgrupos: (1) NANI IL-12p40 KO, camundongos geneticamente deficientes, amamentados por mães não infectadas, imunizados com OVA + CFA; (2) NANI IL-12p40 KO não imunizados; (3) AI IL-12p40 KO, camundongos geneticamente deficientes, amamentados por mães infectadas, imunizados com OVA + CFA; (4) AI IL-12p40 KO não imunizados; (5) AI WT, camundongos selvagens amamentados por mães infectadas, imunizados com OVA + CFA; (6) AI WT não imunizados; (7) NANI WT, camundongos

selvagens, amamentados por mães não infectadas, imunizados com OVA + CFA; (8) NANI WT não imunizados.

Reações de hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade (RH) imediata e mediada por células foram avaliadas, nos diferentes grupos, no 8º dia após a imunização. Foram inoculados 30 µL de OVA agregada (2%) em uma das patas. A mesma quantidade de salina foi inoculada na pata contralateral. A espessura das patas foi medida com o auxílio de um paquímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) 3, 6, 9 e 24 horas após o desafio, sendo os resultados expressos como média aritmética das diferenças obtidas entre a mensuração das duas patas $\pm$ desvio padrão da média.

Deteção de anticorpos específicos para OVA por ELISA

No 9º dia, após a imunização, amostras de sangue de cada grupo de animais foram coletadas após administração de anestésicos (20 µL de Xilasina e 40 µL de Ketamina). As amostras de plasma foram testadas individualmente para os anticorpos IgG1 e IgG2a usando placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) sensibilizadas com OVA (20 µg/mL) e anticorpo biotilado *anti-mouse* IgG1 ou IgG2a (Southern Biotechninology Associates plates, Inc, AL, USA). As reações foram reveladas pela adição do conjugado enzimático (estreptoavidina-peroxidase a 1:6000 - Sigma Chemical, St. Louis, Mo. USA) e do

substrato contendo OPD (Ortho-phenyldiamine- Chemical, St. Louis, Mo. USA), 10 mL de tampão citrato (0,1 M, com pH de 5,5) e 10 μ L de peróxido de hidrogênio (30%). A leitura realizada a 450 nm em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550). Os resultados foram expressos como a média da densidade óptica das amostras de cada grupo, diluídas apropriadamente para cada isotipo $\pm$ desvio padrão (1:512 a 1:32 para IgG2a ou IgG1).

Determinação dos níveis de citocinas

Nove dias após a imunização, o baço de cada animal foi retirado após eutanásia por deslocamento cervical. Suspensões celulares foram preparadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com HEPES (10 mM), 2-mercaptoetanol (0,05 mM), L-glutamina (216 mg/L), gentamicina (50 mg/L) e 5% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich). As células esplênicas foram cultivadas a uma concentração final de 5×10^6 células viáveis/poço, em placas de 48 poços para cultura de tecidos (Costar Cambridge), estimuladas com OVA (500 μ g/mL) ou concanavalin A (ConA) (5 μ g/mL). Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e avaliados quanto à produção das citocinas IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β . Os níveis de citocinas produzidos foram mensurados pela técnica do ELISA de captura, utilizando kits comerciais (R&D Systems) MIF00 IFN- γ , M1700 IL-17, M5000 IL-5, M6000B IL-6, M1000 IL-10 ou MB100B TGF- β , de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550). As concentrações das citocinas nas amostras foram calculadas pelo programa Microplate Manager, versão 4.0, a partir de curvas-padrão obtidas com seus respectivos recombinantes. Os resultados são apresentados como média aritmética $\pm$ desvio padrão da média.

Análise estatística

Para os resultados das reações de hipersensibilidade foi utilizada a análise de variância *two-way* (tratamento x tempo), seguida por múltiplas comparações utilizando o teste de *Tukey*. Para a produção de anticorpos e citocinas, foi utilizada a análise de variância *one-way*, seguida por múltiplas comparações utilizando o teste de *Tukey*. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os resultados são representativos de três experimentos.

RESULTADOS

Reações de hipersensibilidade anti-OVA in vivo em descendentes adultos IL-12p40 KO que receberam leite de mães esquistossomóticas

Oito dias após a imunização com OVA, os camundongos IL-12p40 KO amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni* ou mães não infectadas foram desafiados, na pata, com OVA agregada. As cinéticas das reações de hipersensibilidade foram comparadas entre os camundongos WT imunizados com OVA amamentados por mães infectadas ou não infectadas, que foram similarmente desafiados (Figura 1). As reações de hipersensibilidade anti-OVA imediata (6h) e tardia (24h) foram similares entre os grupos NANI WT e AI WT. Nos camundongos NANI IL-12p40 KO e AI IL-12p40 KO essas reações foram significativamente mais baixas quando comparadas com os grupos NANI WT e AI WT,

respectivamente. As reações não específicas foram avaliadas nos grupos não imunizados com OVA e não foram significativas (dados não mostrados).

Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA em descendentes adultos IL-12p40 KO que receberam leite de mães esquistossomóticas

No 9º dia após a imunização, os animais de todos os grupos foram submetidos a sangria total e os níveis de anticorpos foram avaliados no plasma. A produção de IgG2a anti-OVA no grupo AI WT foi maior quando comparada com os animais que não tiveram contato prévio com o leite de mães infectadas (NANI WT) (Figura 2). Da mesma forma, a produção de IgG2a anti-OVA nos camundongos AI IL-12p40 KO foram significativamente mais altos em relação ao grupo NANI IL-12p40 KO. Com relação aos níveis de IgG1 anti-OVA, não houve diferença significativa entre os grupos. Não houve produção de IgG1 ou IgG2a específicos para OVA entre os grupos não imunizados (dados não mostrados).

Amamentação exercida por mães infectadas pelo S. mansoni melhorou a produção IL-5, TGF- β e IL-6, e na ausência de IL-12p40 apenas a produção de IL-6 foi prejudicada

Células esplênicas de camundongos imunizados com OVA foram cultivadas com OVA ou ConA e os sobrenadantes foram coletados para quantificação da produção de citocinas (Figure 3). Os resultados mostrados na Figura 3a mostram que a síntese de IFN- γ , após estimulação com OVA, foi mensurada apenas nos sobrenadantes dos grupos WT. Nessa

condição, não houve diferença significativa na produção de IFN- γ para o grupo AI WT, em comparação com o grupo NANI WT. Sob estimulação com mitógeno, foram detectados níveis mais altos de IFN- γ no grupo NANI WT em relação ao grupo AI WT. Houve uma mais baixa produção de IFN- γ nos camundongos geneticamente deficientes. Com relação aos níveis de IL-17 (Figura 3b) produzidos pelos grupos WT, sob estimulação *in vitro* com OVA, houve níveis mais altos no grupo NANI WT em relação ao grupo AI WT. Foram observados níveis mais baixos de IL-17 nos camundongos NANI IL-12p40 KO e AI IL-12p40 KO em comparação com os animais NANI WT e AI WT, respectivamente. No entanto, sob estimulação com ConA e OVA, houve diferença entre os grupos.

A Figura 3c mostrou que os níveis de IL-5 foram significativamente menores no sobrenadante do grupo NANI WT em relação ao grupo AI WT e, em relação aos camundongos geneticamente deficientes, após a estimulação OVA. Houve níveis maiores de IL-5 nos animais do grupo AI IL-12p40 KO em comparação com camundongos NANI IL-12p40 KO amamentados por mãe não infectada. Não houve diferença entre os grupos AI WT e AI IL-12p40 KO. A estimulação *in vitro* com ConA induziu síntese maior de IL-5 nos camundongos NANI IL-12p40 KO e AI IL-12p40 KO do que no grupo NANI WT e AI WT, respectivamente. Em relação à produção de IL-6 em resposta à re-estimulação com OVA (Figura 3d), houve níveis elevados nos camundongos AI WT em relação aos NANI WT. Na ausência IL-12p40 e o contato prévio com o leite materno de mães infectados (grupo AI IL-12p40 KO) a síntese de IL-6 foi menor do que nos camundongos amamentados por mães não infectadas (NANI IL-12p40 KO), bem como, em comparação com o grupo NANI WT. Para a estimulação com ConA, os camundongos geneticamente deficientes produziram menos IL-6 do que os animais selvagens.

A produção de IL-10, em resposta ao estímulo com OVA, foi semelhante entre os grupos controle e experimentais. Em resposta ao estímulo ConA, o nível dessa citocina foi

maior nos camundongos geneticamente deficientes do que nos camundongos selvagens (Figura 3e). Em relação ao TGF- β (Figura 3f), pôde ser observada maior produção desta citocina, em resposta à OVA, nos camundongos amamentados por mães infectadas, AI WT e AI IL-12p40 KO, em comparação ao NANI WT e NANI IL-12p40 KO, respectivamente. Para os grupos que receberam o leite de mães não infectadas, o TGF- β foi detectado apenas na NANI IL-12p40 KO. Para estimulação com ConA, houve níveis mais baixos no grupo NANI WT em relação ao AI WT e o grupo NANI IL-12p40 KO. Os animais AI IL-12p40 KO produziram menos TGF- β do grupo AI WT. Não houve alteração entre NANI IL-12p40 KO e AI IL-12p40 KO.

DISCUSSÃO

Cerca de 40 milhões de mulheres em idade fértil e 10 milhões de mulheres grávidas infectadas cronicamente pelo *Schistosoma* vivem em áreas endêmicas para a doença (Friedman et al. 2007; Hillier et al. 2008; Salawu and Odaibo, 2013) e a associação entre esquistossomose e gravidez e pode influenciar a resposta imune do descendente, a longo prazo (Noureldin et al. 1998; Malhotra et al. 1999; Lebeaud et al. 2009). Em relação ao contato com antígenos do parasita durante a lactação, estudos experimentais apontam para uma melhora na produção de anticorpos pelos descendentes adultos (Colley et al. 1999; Santos et al. 2010). Neste estudo, utilizando camundongos C57BL/6, foi demonstrado que o leite materno de mães esquistossomóticas favoreceu a produção de IL-5, TGF- β e IL-6, enquanto diminuiu a produção de IL-17, em resposta a um antígeno heterólogo. Na deficiência de IL-12p40, a produção de IgG2a, IL-5 e TGF- β foi tão elevada quanto nos grupos selvagens; no entanto, a síntese de IL-6 foi suprimida.

Apesar dos níveis elevados de IL-5, não houve maior produção de IgG1 anti-OVA ou elevada hipersensibilidade imediata (3 horas), dependente de IgG1, nos animais AI WT. No entanto, foi observado um aumento nos níveis de IgG2a anti-OVA. O *background* genético dos animais pode predispor à imunidade mediada por IFN- γ , facilitando a reação de hipersensibilidade tardia e a produção de IgG2a, mas a amamentação por mães infectadas parece influenciar estes resultados. Neste contexto, Santos et al. (2010) descreveram um aumento de cerca de 50% na produção de IgG1 e aproximadamente 80% nos níveis de IgG2a, sem qualquer aumento na produção de IFN- γ , em camundongos suíços. O contato com o leite de mães infectadas pelo *S. mansoni* melhorou a capacidade apresentação de antígenos pelos linfócitos B (Santos et al. 2014). IL-5 e IL-6 estão envolvidas na indução da proliferação e diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos (ASC) (*plasma cell longevity*) (Messika et al, 1998; Knödel et al 2001; Cassese et al 2003). TGF- β favorece o desenvolvimento dos linfócitos B e a produção de IgA e IgG2b (Weaver et al. 2006). Considerando a grande produção de IL-5, IL-6 e TGF- β no grupo AI WT, estas citocinas podem induzir uma geração rápida de células secretoras de anticorpos e contribuir para aparecimento de anticorpos IgG2a anti-OVA (Driver et al. 2001). No entanto, nos animais AI WT, não houve aumento significativo da reação de hipersensibilidade mediada por imunocomplexos (9 horas), IgG2a-dependente. Estes dados apontam para uma melhor condição na indução de anticorpos IgG2a, sem levar a reações de hipersensibilidade, como na resposta Th17 clássica. Esta hipótese é corroborada pelo aumento nos níveis de TGF- β e IL-6, acompanhados de níveis moderados de IL-17, induzidos pelo leite de mães infectadas. Esta resposta Th17 controlada pode ser devida a IL-5 nos camundongos AI WT, visto que a resposta Th2 controla negativamente a resposta Th17 (Harrington et al. 2005, Alber e Kamradt, 2007).

Nesta situação também se encaixam os animais AI IL-12p40 KO, uma vez que os níveis de IgG2a, IL-5 e TGF- β foram semelhantes aos dos animais do AI WT, porém houve diminuição na produção de IL-6 no primeiro grupo. Desta forma, a amamentação exercida por mães infectadas pelo *S. mansoni* parece favorecer o controle da imunidade anti-OVA, facilitando a ação supressora de TGF- β e IL-10. Tem sido demonstrado que, na ausência de IL-6, o TGF- β favorece a geração de células T reguladoras (Bettelli et al. 2006). Isto poderia explicar o fato de não ter havido aumento na produção de IL-5 nos animais deficientes em IL-12/IL-23.

Curiosamente, nos animais AI IL-12p40 KO foram observados níveis altos de IgG2a, porém semelhantes aos AI WT. Enquanto que não houve alteração nos níveis de anticorpos IgG1 anáfiláticos anti-OVA. Estes achados sugerem que, mesmo na presença de mecanismo supressor (TGF- β , IL-10 e possível ação de T reg) nos animais AI IL-12p40 KO, o compartimento de linfócitos B (resposta imune humoral) permanece preservado. André et al. (2009) mostraram a refratariedade de células apresentadoras de antígenos, previamente pulsadas em condições de cronicidade, à ação de células T reg. Porém, se este fenômeno está ocorrendo nos linfócitos B dos animais AI IL-12p40 KO merece ser melhor investigado.

O papel da amamentação em favorecer a produção de anticorpos, como forma de melhorar a resposta às vacinas e reduzir o risco de doenças alérgicas nos descendentes é bastante descrito (Kull et al. 2004; Malanchère et al. 1997). No entanto, o leite de mães infectadas aumenta tais propriedades por favorecer a produção do anticorpo opsonizante IgG2a e por controlar a produção de IL-5, restringindo, assim, o risco de reações alérgicas.

Nós descartamos a ação do perfil Th17 durante a amamentação devido à infecção materna, pois a resposta Th17 é fortemente controlada durante o curso da esquistossomose (Iwakura e Ishigame 2006; Wynn et al. 2004). Estamos conscientes de que há uma grande

distância até que essa abordagem experimental possa ser extrapolada para a população de áreas endêmicas para esquistossomose, principalmente no que se refere à família de células Th17 (Annunziato et al. 2008). Por outro lado, os resultados aqui encontrados mostram a importância do contato com os antígenos do parasita no início da vida, através do leite materno, a fim de aumentar a imunidade contra as bactérias extracelulares e antígenos vacinais. Destacamos a indução de resposta imune não deletéria (TGF- β /IL-6/Th17 e TGF- β /IL-10/T reg), que pode promover a redução das doenças autoimunes e das alergias em indivíduos de áreas endêmicas.

FIGURAS E LEGENDAS

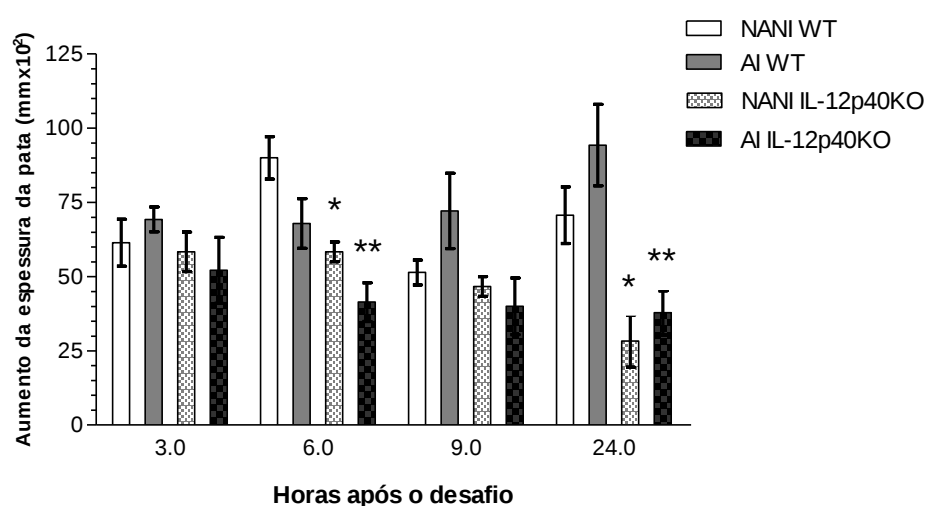


Figura 1: Reações de hipersensibilidade específicas para OVA em camundongos C57BL/6 com deficiência na produção das citocinas IL-12/IL-23 (IL-12p40 KO), amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni* (AI IL-12p40 KO) ou por mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO), bem como em seus respectivos controles *wild type*, sem deficiência na produção de IL-12/IL-23 (AI WT) e (NANI WT). Todos os camundongos foram imunizados com OVA em CFA e desafiados com injeção de OVA agregada na pata, por via subcutânea, no 8º dia após a imunização. Os resultados representam a média do aumento da espessura das patas $\pm$ desvio padrão. Cada grupo possui de 3 a 7 animais. * $p < 0,05$ comparado com NANI WT; ** $p < 0,05$ comparado com AI WT.

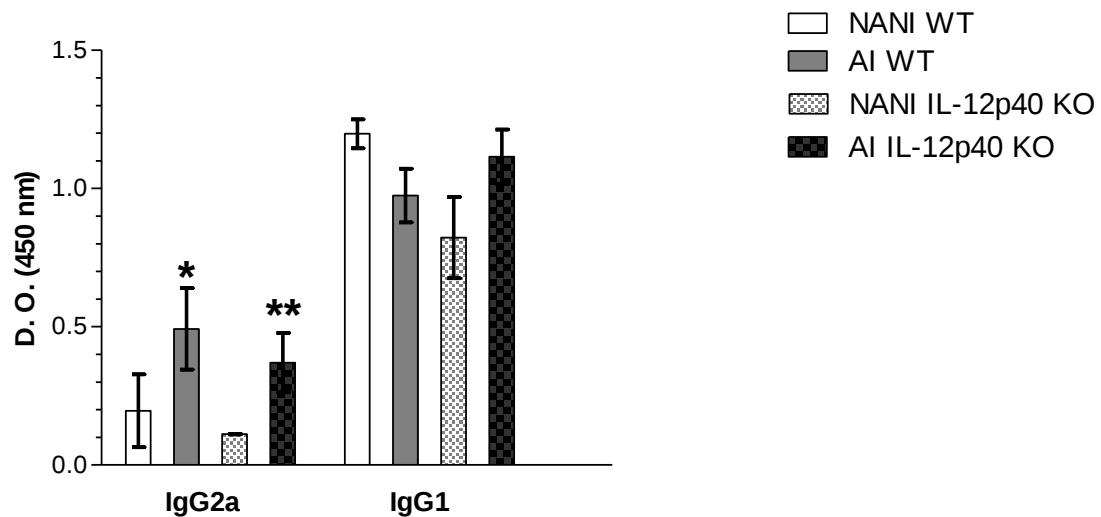


Figura 2: Produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA, por camundongos C57BL/6 com deficiência na produção das citocinas IL-12/IL-23 (IL-12p40 KO), amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni* (AI IL-12p40 KO) ou por mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO), bem como em seus respectivos controles *wild type*, sem deficiência na produção de IL-12/IL-23 (AI WT) e (NANI WT). Todos os camundongos foram imunizados com OVA em CFA. Os anticorpos foram mensurados no plasma dos camundongos pelo método de ELISA indireto, nas diluições 1:512 (IgG1) e 1:32 (IgG2a) nove dias após a imunização. Os resultados são apresentados pela mediana da absorbância (D. O) $\pm$ desvio médio, para um total de 3 a 7 animais por grupo. * $p < 0,05$ comparado com NANI WT; ** $p < 0,05$ comparado com NANI IL-12p40 KO.

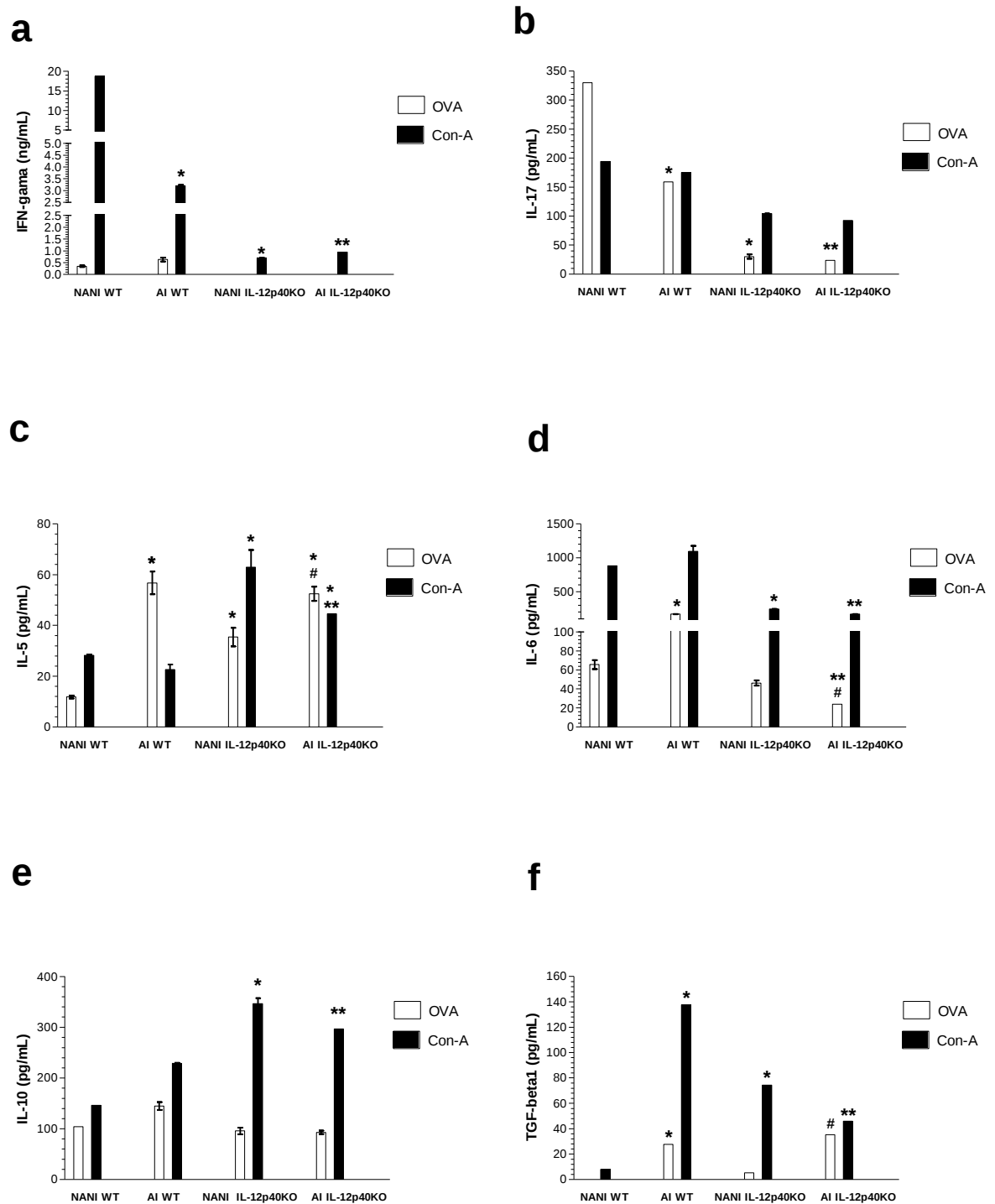


Figura 3: Níveis das citocinas IFN- γ (a), IL-17 (b), IL-5 (c), IL-6 (d), IL-10 (e) e TGF- β (f) produzidas em resposta a OVA, por camundongos C57BL/6 com deficiência na produção das citocinas IL-12/IL-23 (IL-12p40 KO), amamentados por mães infectadas pelo *S. mansoni* (AI IL-12p40 KO) ou por mães sem infecção (NANI IL-12p40 KO), bem como dos seus respectivos controles *wild type*, sem deficiência na produção de IL-12/IL-23 (AI WT) e (NANI WT). Todos os camundongos foram imunizados com OVA em CFA. As células

esplênicas foram cultivadas por 48 horas sob estímulo de OVA (2,5 µg/mL) ou ConA (5 µg/mL), ou apenas na presença de meio de cultura (produção basal), numa concentração de 5×10^6 células/mL. Os níveis das citocinas foram mensurados nos sobrenadantes através do ELISA de captura. Os resultados apresentados representam a média da concentração (pg/mL) $\pm$ desvio padrão, tendo sido previamente descontado, em cada grupo, o valor da produção basal. Cada grupo possui de 3 a 7 animais. * p <0.05 comparado com NANI WT; ** p <0.05 comparado com AI WT; # p <0.05 comparado com NANI IL-12p40 KO.

REFERÊNCIAS

- Alber, G. and Kamradt, T.** (2007). Regulation of Protective and Pathogenic Th17 Responses. *Current Immunology Reviews*. **3**, 3-16.
- Akdis, M., Palomares, O., Van de Veen, W., Van Splunter, M. and Akdis C. A.** (2012). Th17 and Th22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **129**, 1438-1449.
- Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S.** (2008). The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International Immunology*. **20**, 1361–1368
- Attallah, A. M., Ghanem, G. E., Ismail, H. and Waseef, A. M.** (2003). Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **68**, 647-651.
- Attallah, A. M., Abbas, A. T., Dessouky, M. I., EL-emshaty, H. M. and Elsheikha, H. M.** (2006). Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitology Research*. **99**, 137-145.
- Aujla, S. J., Dubin, P. J. and Kolls, J. K.** (2007) Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in Immunology*. **19**, 377-382.

Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J, Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. and Kolls, J. K. (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram- negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine*. **14**, 275-281.

Beadling, C. and Slifka, M. K. (2006). Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. **54**, 15–24.

Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P. R., Autenrieth, I. and Neurath, M. F. (2003). Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *The Journal of Clinical Investigation*. **112**, 693-706.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*. **441**, 235-238.

Cassese, G., Arce, S., Hauser, A. E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A. and Manz, R. A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *The Journal of Immunology*. **171**, 1684-1690.

Colley, D. G., Montesano, A. M., Jr Freeman, G. L. and Secor, E. W. (1999). Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes and Infection*. **1**, 517-524.

- Eissa, A. M., Saad, M. A., Abdel Ghaffar, A. K., el-Sharkaway, I. M. and Kamal, K. A.** (1989). Transmission of lymphocyte responsiveness to schistosomal antigens by breast feeding. *Tropical and Geographical Medicine*. **41**, 208-212.
- Friedman, J. F., Mital, P., Kanzaria, H. K., Olds, G. R. and Kurtis, J. D.** (2007). Schistosomiasis and pregnancy. *Trends in Parasitology*. **23**, 159–164.
- Ghilardi, N., Kljavin, N., Chen, Q., Lucas, S., Gurney, A. L. and Sauvage, F. J.** (2004). Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23- deficient mice. *The Journal of Immunology*. **172**, 2827-2833.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy. T. L., Murphy, K. M. and Weaver, C. T.** (2005). Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*. **6**, 1123-1132.
- Hillier, S. D., Booth, M., Muhangi, L., Nkurunziza, P., Khihembo, M., Kakande, M., Sewankambo, M., Kizindo, R., Kizza, M., Muwanga, M. and Elliott, A.** (2008). *Plasmodium falciparum* and Helminth Coinfection in a Semiurban Population of Pregnant Women in Uganda. *The Journal of Infection Diseases*. **198**, 920-927.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O' Garra, A. and Murphy, K. M.** (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. **260**, 547-549.
- Khader, S. A., Bell, G.K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G. E., Shen, F., Eaton, S. M., Gaffen, S. L., Swain, S. L., Locksley, R. M., Haynes, L. Randall, T. D. and Cooper, A. M.** (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective

pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunology*. **8**, 369-377.

Knödel, m., Kuss, A. W., Berberich, I. and Schimpl, A. (2001). Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *European Journal of Immunology*. **31**, 1972–1980.

Kull, I. R. N., Almqvist, C., Lilja, G., Pershagen, G. and Wickman, M. (2004). Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **114**, 755-760.

LaBeaud, A. D., Malhotra, I., King, M. J., King, C. L., King, C. H. (2009). Do Antenatal Parasite Infections Devalue Childhood Vaccination? *Plos Neglected Tropical Diseases*. **3**,1-6.

Lenzi, J. A., Sobral, A. C., Jr A, Grimaldi, F. G. and Lenzi, H. L. (1987). Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **82**, 257-267.

Macatonia, S. E., Hsieh, C., Murphy, K. M. and O’Garra, A. (1993). Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4⁺ T cells from αβ TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-γ production is IFN-γ-dependent. *International Immunology*. **5**, 1119-1128.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M. and O’Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology*. **154**, 5071-5079.

Malanchère, E., Huetz, F. and Coutinho A. (1997). Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *European Journal of Immunology*. **27**, 788-793.

- Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J. H., Kazura, J. W. and King, C. L.** (1999). Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. **162**, 6843-6848.
- Matsumoto, R., Matsumoto, M., Mita, S., Hitoshi, Y., Ando, M., Araki, S., Yamaguchi, N., Tominaga, N. and Takatsu, K.** (1989). Interleukin-5 induces maturation but not class switching of surface IgA-positive B cells into IgA-secreting cells. *Immunology*. **66**, 32-38.
- McKenzie, B. S., Kastelein, R. A. and Cua, D. J.** (2006). Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology*. **27**, 17-23.
- Messika, E. J., Lu, P. S., Sung, Y. J., Yao, T., Chi, J. T., Chien, Y. H. and Davis, M. M.** (1998). Differential effect of B lymphocyte–induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *Journal of Experimental Medicine*. **188**, 515-525.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M.A. and Coffman, R. L.** (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*. **136**, 2348-2357.
- Noureldin, M. S. and Shaltout, A. A.** (1998). Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. **28**, 539-550.
- Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma L, Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M. and Dong, C.** (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. **448**, 480-483.

- Othman, A. A., Shoheib, Z. S., Saied, A. M. and Soliman, R. H.** (2010). Congenital exposure to *Shistosoma mansoni* infection: Impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology*. **215**, 101-112.
- Ouyang, W., Kolls, J. K. and Zheng, Y.** (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines Inflammation. *Immunity*. **28**, 454-467.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrel, A. M., Mc Clanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Pennick, D. M., Kastelein, R. A., Malefyt, R. W. and Moore, K. W.** (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit IL-23R. *The Journal of Immunology*. **168**, 5699-5708.
- Peng, S. L., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H.** (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *PNAS*. **99**, 5545-5550.
- Rodewald, R.** (1973). Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *The Journal of Cell Biology*. **58**, 189-211.
- Reiner, S. L.** Development in Motion: Helper T cells at work. (2007). *Cell*. **129**, 33-36.
- Sadigursky, M., Falangola, M. F., Santos, R.O., Cardoso, S.A. and David, J.** (1987) Induced tolerance to *Schistosoma mansoni* antigens modulate periovular granuloma. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **82**, 269-271.
- Salawu, O. T. and Odaibo, A. B.** (2013). Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. **122**, 1-4.

Santos, P. E. A., Sales, I. R. F., Schirato, G. V., Costa, V. M. A., Albuquerque, M. C. P. A., Souza, V. M. O. and Malageno, E. (2010). Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitology Research*. **107**, 95-102.

Santos, P. E. A., Lorena, V. M. B., Fernandes, E. S., Sales, I. R. F., Albuquerque, M. C. P. A., Gomes, Y. M., Costa, V. M. A. and Souza, V. M. O. (2014). Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cell from adult offspring mice. *Experimental Parasitology*. **141**, 62-67.

Shevach, E. M. (2000). Regulatory T Cells in Autoimmunity. *Annual Review of Immunology*. **18**, 423-449.

Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. and Huston, G. (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *The journal of Immunology*. **145**, 3796- 3806.

Trinchieri, G. (2003a). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. **3**, 133-146.

Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. and Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. **24**, 677–688.

Iwakura, Y. and Ishigame, H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. **116**, 1218–1222.

Wynn, T. A., Thompson, R. W., Cheever, A. W. and Mentink-Kane, M. M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*. **201**, 156-167.

Zizka, J., Hrdy, J. Lodinová-Zadnikova, R., Kocourková, I., Novotná, O., Sterzl, I. and Prokesova, L. (2007). Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. *Pediatric Allergy and Immunology*. **18**, 486–494.



CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A amamentação em mães esquistossomóticas não alterou a intensidade das reações de hipersensibilidade *in vivo* anti-OVA dos descendentes, contudo modificou a celularidade da reação inflamatória nas 24 horas, aumentando o conteúdo de eosinófilos, característico do perfil Th2.
- A amamentação exercida por mães esquistossomóticas induziu efeito benéfico sobre a imunidade humoral do descendente, no modelo de imunização OVA+CFA, elevando a produção do anticorpo neutralizante IgG2a, mesmo na ausência de IL-12/IL-23.
- O contato prévio com leite de mães infectadas induz a geração de células com perfil Th17 clássico, não patogênico (níveis altos de TGF- β , IL-6 e IL-5, e moderados de IL-17 e IL-10).
- Na ausência de IL-12/IL-23 o contato com o leite de mães infectadas induziu a produção de TGF- β , e níveis muito baixos de IL-6. Esse fato sugere o desenvolvimento de um mecanismo de regulação cruzada entre essas citocinas, com provável atuação de células T reg, o qual confere proteção para os indivíduos amamentados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitol.**, Oxford, 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. In: _____. **Imunologia Celular e Molecular**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, cap. 13, p. 293- 317.
- AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278 n. 3, p. 1910-1914, 2003.
- AKDIS, M. et al. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. **J. allergy Clin. Immunol.**, Berlim, v. 129, n. 6, p. 1438–1449; quiz 1450–1451, 2012.
- AKDIS, M.; AKDIS, C. A. IgE class switching and cellular memory. **Nature Immunol.**, London, v. 13, n. 4, p. 312–314, 2012.
- AKKOC, T. et al. Transfer of T cells from intranasal ovalbumin-immunized mice ameliorates allergic response in ova-sensitized recipient mice. **Allergy Asthma Proc.**, Providence, v. 29, n. 4, p. 411–416, 2008.
- AMARAL, R. S. et al. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 79-85, 2006.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. **Arthritis Res. Ther.**, Rockville Pike, v. 11, n. 6, p. 257, 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. 170, n. 4, p. 1635-1639, 2003.
- ARAÚJO, K. C. G. M. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 409-417, 2007.
- 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.**, Lawrence, 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.**, Nova York, v. 99, n. 2, p. 137–145, 2006.
- AUJLA, S. J.; KOLLS, J. K. IL-22: a critical mediator in mucosal host defense. **J. Mol. Med.**, Berlin, v. 87, n. 5, p. 451–454, 2009.
- BARBOSA, C. S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 55-62, 2006.

BARBOSA, C. S. et al. Casos autoctones de esquistossomose mansônica em crianças de Recife, PE. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 47, p. 684-690, 2013.

BARBOSA, C. S. et al. Specific situations related acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 169-172, 2001.

BARBOSA, V. S. et al. Spatial distribution of schistosomiasis and geohelminthiasis cases in the rural areas of Pernambuco, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 45, p. 633-638, 2012.

BARCELLOS, C. et al. Organização espacial, saúde e qualidade de vida: análise espacial e uso de indicadores na avaliação de situações de saúde. **Inf. Epidemiol. SUS.**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 115-128 2002.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **Nature**, Londres, v. 441, p. 235–238, 2006.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. T_H17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat. Immunol.**, Nova York, v. 8, p. 345–350, 2007.

BLEWEET, H. J. H. et al. The immunological components of human milk. **Adv. Food Nutr. res.**, Nova York, v.54, p. 45-80, 2008.

BLOIS, S. M. et al. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 70, n. 4, p. 1018-1023, 2004.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scand. J. Immunol.**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 505–515, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Morbidade Hospitalar do Sistema Único de Saúde. **Departamento de Análise de Situação de Saúde**, 2011a. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em: 03 jul 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação Sobre Mortalidade (SIM). **Departamento de Análise de Situação de Saúde**, 2011b. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>>. Acesso em: 03 jul 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informações de Agravos de Notificação**, 2014. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/esquisto/bases/esquistobrnet.def>>. Acesso em: 03 jul 2014.

BRUNET, L. R. et al. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 159, n. 2, p. 777–785, 1997.

BURGLER, S. et al. Differentiation and functional analysis of human T_H17 cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Berlim, v. 123, n. 3, p. 588-595.e7, 2009.

CARLIER Y.; TRUYENS, C. Influence of maternal infection on offspring resistance to wards parasites. **Parasitol. Today**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 94-99, 1995,

CARLIER, Y. et al. Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni*-infected African parturients and their newborn children. **J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 29, n. 1, p. 74–81, 1980.

CARMO, H. E.; BARRETO, M. L. Esquistossomose mansônica no estado da Bahia, Brasil: Tendências histórias e medidas de controle. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 4, p. 425-39, 1994.

CARVALHO, E. M. F. et al. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole? **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 787-795, 1998.

CHEEVER, A. W. et al. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Trop. Med. Hyg.**, Lawrence, v. 37, n. 1, p. 85–97, 1987.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol. Today.**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 465–466, 2000.

CHIARAMONTE, M. G. et al. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 104, n. 6, p. 777–785, 1999.

CLARK, S. L. The ingestion of proteins and colloidal materials by columnar absorptive cells of the small intestine in suckling rats and mice. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, Baltimore, v. 5, n. 1, p. 41–50, 1959.

COFFMAN, R. L. Origins of the T_H1-T_H2 model: a personal perspective. **Nature Immunol.**, Nova York, v. 7, n. 6, p. 539–541, 2006.

COFFMAN, R. L.; CARTY, J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 136, n. 3, p. 949–954, 1986.

COSMI, L. et al. T helper cells plasticity in inflammation. **Cytometry A.**, Hoboken, v. 85, n. 1, p. 36–42, 2014.

COSMI, L. et al. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. **Allergy**, Copenhagen, v. 66, n. 8, p. 989–998, 2011.

CRAMER, D. V.; KUNZ, H. W.; GILL, T. L. Immunologic sensitization prior to birth. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Saint Louis, v. 120, p. 431-439, 1974.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; LAFAILLE, J. J. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**, Cambridge, v. 30, n.5, p. 626–635, 2009.

EISSA, A. M. et al. Transmission of lymphocyte responsiveness to schistosomal antigens by breast feeding. **Trop. Geogr. Med.**, Amsterdam, v. 41, p. 208-212, 1989.

FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 164, n. 5, p. 2585–2591, 2000.

FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunol. Today**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 29–35, 2000.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 569-576, 2001.

FORCHIELLI, M. L.; WALKER, W. A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **Brit. J. Nutr.**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 41–48, 2005.

FORLOW, S. B. et al. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. **Blood**, New York, v. 98, n. 12, p. 3309–3314, 2001.

FOSSIEZ, F. et al. Interleukin-17. **Int. Rev. Immunol.**, London, v. 16, n. 5-6, p. 541–551, 1998.

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.**, Baltimore, v. 140, n. 12, p. 4245–4252, 1988.

GAROFALO, R. P.; GOLDMAN, A. S. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. **Clin. Perinatol.**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 361–377, 1999.

GEIJTENBEEK, T. B. H. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Med.**, Nova York, 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.**, Baltimore, v. 172, p. 2827-2833, 2004.

GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. **Nature**, Londres, v. 467, n. 7318, p. 967–971, 2010.

GOMES, E. C. S. et al. Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. **BMC Infect. Dis.**, Londres, v. 14, p. 101, 2014.

GRASSI; COSTA; VAZ. Immunologic factors of human milk. **Pediatrics**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 258-263, 2001.

HAMOSH, M. Bioactive factors in human milk. **Pediatr. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 48, n. 1, p. 69–86, 2001.

HAPPEL, K. I. et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. **J. Immunol.**, Baltimore, Md.: 1950, v. 170, n. 9, p. 4432–4436, 2003.

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.**, Nova York, v. 6, n. 11, p. 1132-1132, 2005.

HEIKKINEN, J. et al. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, Londres, v. 131, n. 3, p. 498-505, 2003.

- HEIKKINEN, J. et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clin. Exp. Immunol.**, Londres, v. 136, n.2, p. 373-378, 2004.
- 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.**, Baltimore, v. 164, n. 12, p. 6406–6416, 2000.
- IVANOV, I. I. et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. **Cell Host Microbe.**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 337–349, 2008.
- IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006.
- JANKOVIC, D. et al. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 163. n. 1, p. 337–342, 1999.
- KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Critical analysis of the estimated number of *Schistosomiasis mansoni* carriers in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, n. 3, 303-308. 2000.
- KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, Cambridge, v. 21, n. 4, p. 467–476, 2004.
- KONG, N. et al. Antigen-specific transforming growth factor β -induced Treg cells, but not natural Treg cells, ameliorate autoimmune arthritis in mice by shifting the Th17/Treg cell balance from Th17 predominance to Treg cell predominance. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 64, n. 8, p. 2548–2558, 2012.
- KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T_H17 cells. **Nature**, Londres, v. 448, n. 7152, p. 484–487, 2007.
- KRAJINA, T. et al. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4⁺ T cell-induced colitis. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 33, n. 4, p. 1073–1083, 2003.
- LAAN, M. et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, n. 4, p. 2347–2352, 1999.
- LAGADARI, M. et al. Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status. **Am. J. Reprod. Immunol.**, Nova York, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2004.
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 422-435, 2010.
- LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, NovaYork, v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005.
- LENZI, J. A. et al. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 257-267, 1987.
- LIN, X. et al. Advances in distinguishing natural from induced Foxp3⁺ regulatory T cells. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 116-123, 2013.

- LUDWIG, K. M. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 32, n. 5, p. 547-55, 1999.
- MA, X. et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. **J. Exp. Med.**, Nova York, v. 183, p. 147-157, 1996.
- MACHADO, E. R.; SANTOS, D. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Enteroparasites and commensals among children in four peripheral districts of Uberlândia, State of Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 581-585, 2008.
- MACHADO, M. T. et al. Ascariasis in the subdistrict of Cavacos, municipality of Alterosa (MG), Brazil: Effect of mass treatment with albendazole on the intensity of infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 265-271, 1996.
- MAGRAM, J. et al. IL-12-Deficient mice are defective in IFN- γ production and Type 1 cytokine responses. **Immunity**, Cambridge, v. 4, p. 471-481, 1996.
- MALHOTRA, I. et al. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, p. 6843-6848, 1999.
- MALHOTRA, I. et al. In utero exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. **J. Clin. Invest.**, Nova York, v. 99, n. 7, p. 1759-1766, 1997.
- MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, Londres, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.
- MCALLISTER, F. et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 175, n. 1, p. 404-412, 2005.
- McKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 1224-1231, 2004.
- MCKENZIE, B. S.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 17-23, 2006.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.
- NACHER, M. et al. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 107-113, 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**, Cambridge, v. 17, p. 375-387, 2002.

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**, Cairo, v. 28, p. 539-550, 1998.

NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, Londres, v. 448, n. 7152, p. 480-483, 2007.

OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 715-725, 2000.

OTHMAN, A. A. et al. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiol.**, Stuttgart, v. 215, n. 2, p. 101-112, 2010.

PARHAM, C. et al. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 168, n. 11, p. 5699-5708, 2002.

PATTON, E. A. et al. Severe schistosomiasis in the absence of interleukin-4 (IL-4) is IL-12 independent. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, n. 1, p. 589-592, 2001.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, Londres, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PEDRAZA, D. F.; QUEIROZ, D.; SALES, M. C. Infectious diseases among Brazilian preschool children attending daycare centers. **Ciê. Saúde Coletiva.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 511-528, 2014.

PETERS, A.; LEE, Y.; KUCHROO, V. K. The many faces of Th17 cells. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, Hagerstown, v. 23, n. 6, p. 702-706, 2011.

PETERSON, R. A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. **Toxic. Pathol.**, Newark, v. 40, n. 2, p. 186-204, 2012.

PFLANZ, S. et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. **Immunity**, Berlim, v. 16, n. 6, p. 779-790, 2002.

PICCIANO, M. F. Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. **Biol. Neonate**, Nova York, v. 74, n. 2, p. 84-93, 1998.

REINER, S. L. Development in motion: helper T cells at work. **Cell**, Cambridge, v. 129, p. 33-36, 2007.

RESENDE CO, T. et al. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis* immunity and clinical response to tuberculosis therapy. **Clin. Exp. Immunol.**, Londres, v. 147, n. 1, p. 45-52, 2006.

RIBEIRO, P. J. et al. Educational program in schistosomiasis: a model for a methodological approach. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 415-421, 2004.

RODEWALD, R. Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. **J. Cell Biol.**, Nova York, v. 58, n. 1, p. 189-211, 1973.

RODEWALD, R. Selective antibody transport in the proximal small intestine of the neonatal rat. **J. Cell Biol.**, Nova York, v. 45, n. 3, p. 635–640, 1970.

RUTITZKY, L. I. et al. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 180, n. 4, p. 2486–2495, 2008.

RUTITZKY, L. I.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 98, n. 23, p. 13243–13248, 2001.

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.**, Baltimore, v. 175, n. 6, p. 3920–3926, 2005.

RUTITZKY, L. I.; SMITH, P. M.; STADECKER, M. J. T-bet protects against exacerbation of schistosome egg-induced immunopathology by regulating Th17-mediated inflammation. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 39, n. 9, p. 2470–2481, 2009.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 41, n. 9, p. 2677–2687, 2011.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, Nova York, v. 6, n. 4, p. 345–352, 2005.

SANTOS, P.E. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **J. Parasitol. Res.**, Nova York, v. 107, n. 1, p. 95–102, 2010.

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

SCHULZ, O.; PABST, O. Antigen sampling in the small intestine. **T. Immunol.**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 155–161, 2013.

SCHWARZENBERGER, P. et al. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 161, n. 11, p. 6383–6389, 1998.

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. U. S. A.**, Washington, v. 90, n. 21, p. 10188–10192, 1993.

SHEVACH, E. M. Suppressor T cells: Rebirth, function and homeostasis. **Curr. Biol.**, London, v. 10, n. 15, p. 572–575, 2000.

SILVA, L. M. P. et al. The Maternal immunomodulation in normal and pathological pregnancy. **Femina**, [S. l.], v. 4, p. 283–290, 2006.

- 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.
- SMITS, H. H. et al. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 34, n. 5, p. 1371–1380, 2004.
- SOUZA, M. A. A. et al. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 252-256, 2008.
- STARK, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 285–294, 2005.
- STEINMAN, L. A brief history of T_H17, the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat. Med.**, Nova York, v. 13, n. 2, p. 139–145, 2007.
- SURI-PAYER, E. et al. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 160, n. 3, p. 1212–1218, 1998.
- TACHON, P.; BOROJEVIC, R. Mother-child relation in human schistosomiasis mansoni: skin test and cord blood reactivity to schistosomal antigens. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Londres, v. 72, n. 6, p. 605–609, 1978.
- TASKER, L.; MARSHALL-CLARKE, S. Immature B cells from neonatal mice show a selective inability to up-regulate MHC class II expression in response to antigen receptor ligation. **Int. Immunol.**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 475-484, 1997.
- TAVARES-DIAS, M.; GRANDINI, A. A. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 63-65, 1999.
- TAYLOR, S.; BRYSON, Y. J. Impaired production of gamma-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 134, n. 3, p. 1493-1497, 1985.
- TRAVIS, M. A. et al. Loss of integrin $\alpha_v\beta_8$ on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. **Nature**, Londres, v. 449, n. 7160, p. 361–365, 2007.
- TRINCHIERI, G. et al. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. **Prog. Growth. Factor. Res.**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 355–368, 1992.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, Londres, v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. **Adv. Immunol.**, Nova York, v. 70, p. 83–243, 1998.
- TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, Cambridge, v. 19, n. 5, p. 641–644, 2003.

- UHLIG, H. H. et al. Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. **Immunity**, Cambridge, v. 25, n. 2, p. 309–318, 2006.
- WAKKACH, A. et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 605–617, 2003.
- WATFORD, W. T. et al. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 361–368, 2003.
- WEAVER, C. T. et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **An. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 25, p. 821–852, 2007.
- WEAVER, et al. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, Cambridge, v. 24, p. 677–688, 2006.
- WITOWSKI, J. et al. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO α chemokine from mesothelial cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 165, n. 10, p. 5814–5821, 2000.
- WOLD, A. E.; ADLERBERTH, I. Breast feeding and the intestinal microflora of the infant--implications for protection against infectious diseases. **Adv. Exp. Med. Biol.**, Nova York, v. 478, 77–93, 2000.
- 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.**, Paris, 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.**, Baltimore, v. 160, n. 9, p. 4473–4480, 1998.
- XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biol. Neonate**, Nova York, v. 74, n. 2, p. 121–133, 1998.
- YAMANE, H.; PAUL, W. E. Cytokines of the γ_c family control CD4⁺ T cell differentiation and function. **Nat. Immunol.**, Nova York, v. 13, n. 11, p. 1037–1044, 2012.
- YE, P. et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. **J. Exp. Med.**, Nova York, v. 194, n. 4, p. 519–527, 2001.
- ZHENG, S. G.; WANG, J.; HORWITZ, D. A. Cutting edge: Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF- β are resistant to Th17 conversion by IL-6. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 180, n. 11, p. 7112–7116, 2008.
- ZHOU, L. et al. TGF- β induced FoxP3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. **Nature**, Londres, v. 453, p. 236–240, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Versão em inglês do artigo 1

**IL-5, IL-6, TGF- β and eosinophil, but not IL-17, are improved by breastfeeding in
Schistosoma mansoni-infected mice**

Fabiana Leticia da Silva¹, Erica Souza Fernandes¹, Maria da Conceição Silva¹, Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda¹, Roeckson Carlos Peixoto Silva¹, Eridan de Medeiros Coutinho², Silvia Maria Lucena Montenegro², Clarice Neuenschwander Lins de Moraes², Valdênia Maria Oliveira de Souza^{1,3}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Setor de Imunologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Pernambuco, Brazil.

² Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Pernambuco, Brazil.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Farmacêuticas, Pernambuco, Brasil

Corresponding author: Valdênia Maria Oliveira de Souza

Corresponding author's address: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Avenida Professor Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária, Campus da UFPE – Recife - PE, Brazil. CEP: 50670-901.

Email: valdenia.souza@gmail.com

DISCLOSURES: None

ABSTRACT

In experimental maternal *Schistosoma mansoni* infection, the suckling effect was the improvement in the anti-ovalbumin (OA) antibodies, IL-2 production and antigen

presentation ability by B cells on adult offspring. Here, it was carried out the cytokines involved in the support of humoral immunity (IL-5, IL-6, TGF- β and IL-17) and histopathology of the *in vivo* delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions in adult offspring breastfed by a *S. mansoni*-infected mother in response to OA. Newborn mice were divided into two groups: animals from non-infected mothers Suckled by Infected Mothers (SIM) and animals born/suckled by non-infected mothers (CONTROL). The adult offspring were immunized with subcutaneous OA+adjuvant. After 8 days, the mice were challenged with aggregated OA in the footpad. After 24h, paws and spleens were taken off for histopathology and splenocyte cultures, respectively. In SIM group, there were high levels of IL-5, TGF- β and IL-6, while IL-17 production dropped, accompanied of edema and predominant eosinophils in the DTH, compared to CONTROL. These data suggest that ingestion of milk from *S. mansoni*-infected mothers, in the early, life improves the synthesis of cytokines involved in the maturation and maintenance of the humoral immunity and favors Th2-mediated cells influx in the cutaneous tissue in the adult life.

Keywords: Schistosomiasis; Cytokine; Immune modulation; Eosinophil.

INTRODUCTION

About 40 million women of fertile age and 10 million pregnant women have been infected by *Schistosoma* parasitic worms in endemic areas⁽¹⁾. Such infection may influence the long-term immune response of offspring⁽²⁻⁴⁾. We have studied experimental maternal *Schistosoma mansoni* infection and the suckling effect (separate from gestation) in adult offspring immunized with ovalbumin (OA). The results revealed an improvement in anti-OA antibodies and IL-2 production⁽⁵⁾ and enhanced B cell antigen presentation ability⁽⁶⁾. IL-10

and IFN- γ production was not altered⁽⁵⁾. However, cytokines involved in the support and amplification of humoral immune response were not evaluated.

The cellularity of the *in vivo* delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction is altered when preceded by immediate hypersensitivity reaction, which develop within minutes or up to a few hours after an antigen challenge due to anaphylactic antibodies or immune complexes⁽⁷⁾. In the breastfed adult offspring from a *S. mansoni*-infected mother, there was no alteration in intensity of the *in vivo* anti-OA DTH reaction despite enhancement of humoral immunity⁽⁵⁾. However, analyses of the cell influx were not performed yet.

The aim of the present study was therefore to perform IL-5, IL-6, TGF- β and IL-17 cytokine analysis and histopathology of the *in vivo* DTH reactions of adult offspring breastfed by *S. mansoni*-infected mother.

MATERIALS AND METHODS

C57BL/6 mice (4 week-old) obtained from the Laboratory Animal Breeding Center (Centro de Criação de Animais de Laboratório - CECAL) of Oswaldo Cruz Foundation (Fundação Oswaldo Cruz, RJ-Brazil) were used. To obtain breast milk donors, females were infected percutaneously (s.c) with 30 *S. mansoni* cercariae (BH strain). On the 60th day post-infection, estruses were synchronized⁽⁵⁾ and females were mated male mice (1:1). The same procedure of mating was performed with non-infected females. Immediately after birth, the newborns were housed in cages with changed breast milk donor mothers. Then, part of the offspring male mice born from non-infected mothers were Suckled by Infected Mothers (SIM); the other part remained suckling in their own non-infected mothers (CONTROL).

After six weeks from birth, the male offspring mice were immunized (s.c), with 100 μ g of ovalbumin (OA; grade V, Sigma-Aldrich) emulsified in 1:1 complete Freund's adjuvant

(CFA, Sigma-Aldrich), on the base of the tail (0.1 mL/animal). Mice were divided into four group (n=6): (1) mice SIM+OA; (2) non-immunized mice SIM; (3) CONTROL + OA and (4) non-immunized CONTROL. After eight days, the mice were challenged in the hind footpad with 2% aggregated OA and the DTH reaction was measured 24 hours later. Histopathological analyses on footpads (stained with hematoxylin-eosin/HE) from of animals in each group were compared. For that, it was considered the mean obtained from the analysis of three microscope slides per group: 0 – absent; light – scarce eosinophils; moderate – 10 to 15 eosinophils; intense – 20 or more eosinophils. The mice were bleeding and anti-OA IgG1 and IgG2a antibodies in the plasma measurement by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Spleen cells (5×10^6 cells/mL) were cultured with OA (500 μ g/mL) and supernatants harvested (48h) for analyses of the cytokines (R&D system M5000, M6000B, MB100B and M1700 for IL-5, IL-6 TGF- β and IL-17, respectively). The samples were quantified by comparison with the standard curves of purified recombinant cytokines with resulting detection limits of 15.6 pg/mL for IL-5 and TGF- β , 7.8 pg/mL for IL-6 and 10.9 pg/mL for IL-17. An one-way analysis of variance followed by multiple comparisons using the Tukey's method was used. The results were representative of three experiments. The protocol study was approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz, Pernambuco, Brazil (Protocol 01/2010).

RESULTS

The DTH reaction among OA-immunized mice which had previous contact with the milk of infected mothers (SIM) 24h after antigen challenge was similar to that of CONTROL mice (data not shown). Histopathological analyses of footpads revealed an intense

inflammatory process among CONTROL group mice with neutrophils and dead leukocytes (black arrow, small quadrant I), occupying the deep dermis (circle) and the hypoderma and invading the underlying muscles, resulting in abscessation foci (squares) (Fig. 1A). Unlike in the SIM (Fig. 1B) group, there was intense and extensive inflammatory cell infiltration with severe edema of the dermis (black dotted arrow) and the hypoderma occupied by moderate eosinophilic infiltration, extending along the underlying musculature. Macrophages and plasma cells were observed in the histological sections for both groups.

As expected, there were higher levels of anti-OA antibodies in the SIM group than in the CONTROL group (data not shown). With regard to IL-5, IL-6 and TGF- β production, levels were significantly higher in the SIM group than in the CONTROL group (Fig. 2A, 2B, 2C), whereas the production of IL-17 was lower in the experimental group (Fig. 2D).

DISCUSSION

The ability of breast milk to facilitate the formation of B cells in the immature immune system and enhance the production of different types of antibodies⁽⁸⁾ appears to be incremented by *S. mansoni* maternal infection⁽²⁻⁶⁾. Here, C57BL/6 mice which had prior contact with the milk of infected mothers displayed significant IL-5, IL-6, TGF- β synthesis and favored tissue influx mediated by the Th2 profile.

The classical orchestration of the Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4) cytokines in controlling the secretion of the opsonizing/complement activators (IgG) and anaphylactic (IgE/IgG1) antibody, respectively, has previously been described⁽⁹⁻¹¹⁾. However, TGF- β favors the development of B lymphocytes⁽¹²⁾, which together with IL-5 and IL-6 proliferate and differentiate into antibody-secreting cells (ASC) (plasma cell longevity)⁽¹³⁻¹⁵⁾. These results therefore corroborate the improvement in humoral immunity in SIM mice.

The IL-17 cytokine also plays a role in extracellular bacterial protection via the T-dependent antibody^(16, 17). However, the results of the present study showed low IL-17 levels in SIM mice. This finding, together with the high level of IL-6 and TGF- β , suggests a “classic” Th17, or less severe, profile⁽¹⁰⁾. This fact can be important for balancing antibody response to vaccine antigen and avoiding severe antibody-mediated immunopathology (autoimmunity).

In relation to *in vivo* anti-OA DTH reaction, prior contact with infected maternal milk did not change the intensity of DTH, but rather its cellularity. Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4/IL-5) cytokines mediate DTH reaction through macrophages/neutrophils and eosinophilic influx, respectively⁽¹⁸⁻¹⁹⁾. IL-17 cells boost neutrophilic infiltration^(10, 20). In the SIM group, IL-4 was not detected and IFN- γ were not altered⁽⁵⁾, but high IL-5 levels may act in the maturation of eosinophil precursors in the bone marrow, as well as stimulating the synthesis of granular proteins⁽²¹⁾. Additionally, the local expression of IL-5 facilitates the influx of these cells into inflammatory sites⁽²²⁾.

The role of breastfeeding in reducing the risk of allergic diseases in offspring has been previously described⁽²³⁾. Despite the fact that the results of the present study identified IL-5 production and eosinophil in the cutaneous tissue, it is vital that an allergy murine model experiment evaluating the outcome of the disease in these adult offspring is performed. This approach has already been employed in our laboratory for asthma. In the same way, evaluation of the content of this milk by mass spectral interpretation should be carried out.

In conclusion, the milk from *S.mansoni*-infected mothers can favor the production of antibodies, as it improves cytokine production, which is involved in the maturation and maintenance of the humoral immunity. It does, however, induce a predominant eosinophil/Th2 profile in response to heterologous protein plus adjuvant. This finding

highlights the use of the parasite antigen during breastfeeding as an immunomodulation tool in changing the outcome of Th1-mediated cutaneous immunopathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

In this study, the authors Fabiana Leticia da Silva and Valdênia Maria Oliveira de Souza designed the study, performed experiments, analyzed the data and wrote the paper. Erica Souza Fernandes, Maria da Conceição, Gabriela Calixto and Roeckson Carlos Peixoto Silva performed experiments. Eridan de Medeiros Coutinho conducted histopathological study. Silvia Maria Lucena Montenegro and Clarice Neuenschwander Lins de Moraes contributed the essential reagents, tools and mice for the study. The authors would like to thank Roni Evencio Araujo for technical assistance; Dr. Constança Simões Barbosa for providing cercariae of *Schistosoma mansoni*; Dr. Gerlane by veterinary assistance to animals, and the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for granting the scholarship.

REFERENCES

- 1 Salawu OT & Odaibo AB. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *Int J Gynecol Obstet* 2013; **122**: 1-4.
- 2 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.

- 3 Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, *et al.* Helminth and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. *J Immunol* 1999; **162**: 6843-6848.
- 4 LaBeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL & King CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? *Plos Negl Trop Dis* 2009; **3**: e442.
- 5 Santos PEA, Sales IRF, Schirato GV, *et al.* Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res* 2010; **107**: 95-102.
- 6 Santos PEA, Lorena VMB, Fernandes ES, *et al.* Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cell from adult offspring mice. *Exp Parasitol* 2014; **141**: 62-67.
- 7 Jacysyn JF, Abrahamsohn IA & Macedo MS. Modulation of delayed-type hypersensitivity during the time course of immune response to a protein antigen. *Immunology* 2001; **102**: 373-379.
- 8 Malanchère E, Huetz F & Coutinho A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 788-793.
- 9 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA & Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**: 2348–2357.
- 10 Akdis M, Palomares O, Veen WV, Splunter MV & Akdis CA. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 1438–1449.

- 11 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 133–146.
- 12 Weaver C, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M & Murphy KM. Th17: An effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; **24**: 677-688.
- 13 Messika EJ, Lu PS, Sung YJ, *et al.* Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med* 1998; **188**: 515-525.
- 14 Knödel M, Kuss AW, Berberich I & Schimpl A. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 1972–1980.
- 15 Cassese G, Arce S, Hauser AE, *et al.* Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 2003; **171**: 1684-1690.
- 16 Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, *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**: 375–87.
- 17 Ghilardi N, Kljavin N, Chen O, Lucas S, Gurney AL & Sauvage FJ. Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23- deficient mice. *J Immunol* 2004; **172**: 2827-2833.
- 18 Akkoc T, Eifan AO, Aydogan M, Ozkara S, Bahceciler NN & Barlan IB. Transfer of T cells from intranasal ovalbumin-immunized mice ameliorates allergic response in ova-sensitized recipient mice. *Allergy Asthma Proc* 2008; **29**: 411–416.

- 19 Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S & Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy* 2011; **66**: 989–998.
- 20 Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torre RM & Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 2007; **9**: 78–86.
- 21 Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; **105**: 651–663.
- 22 Meeusen ENT & Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 2000; **16**: 95–101.
- 23 Kull IRN, Almquist C, Lilja G, Pershagen G & Wickman M. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *J Allergy Clin Immunol* 2004; **114**: 755–760.

FIGURES AND LEGENDS

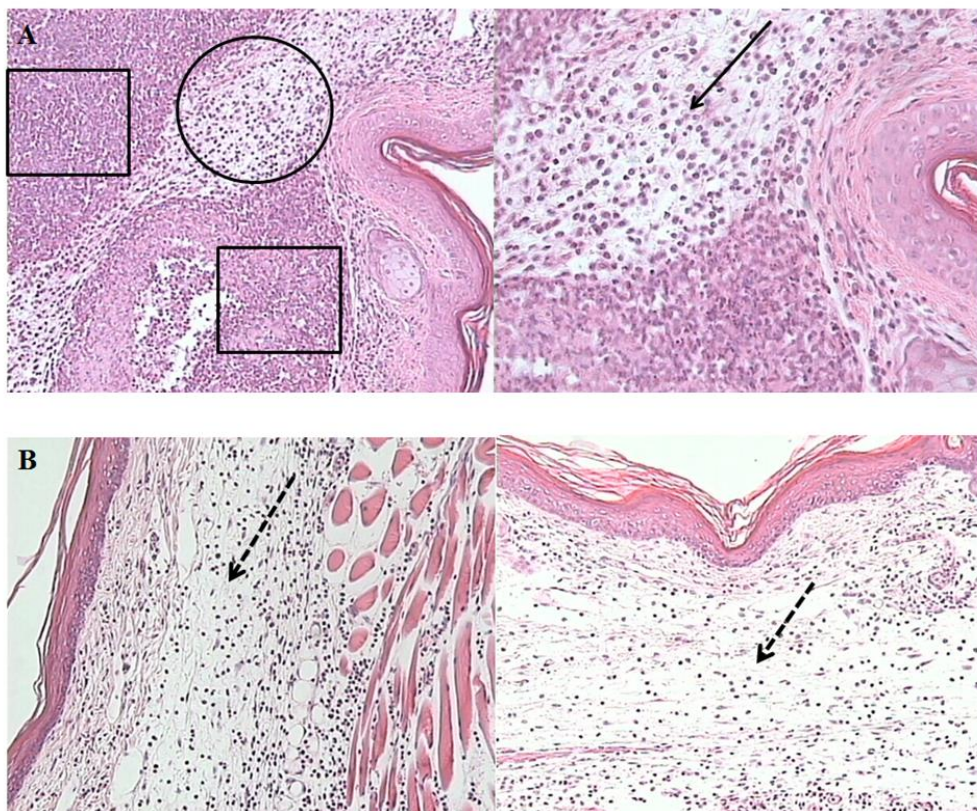


Figure 1: Cellular infiltrate in footpad skin from C57BL/6 mice suckled by non-infected mothers (CONTROL) (A) or *S. mansoni*-infected mothers (SIM) (B). Deep dermis (circle), focus of abscessation (square), neutrophils and dead leukocytes (black arrows). Edema of the dermis and eosinophilic infiltration (black dotted arrow). (Hematoxylin-eosin stain. A. 200x and 400x. B. 200x).

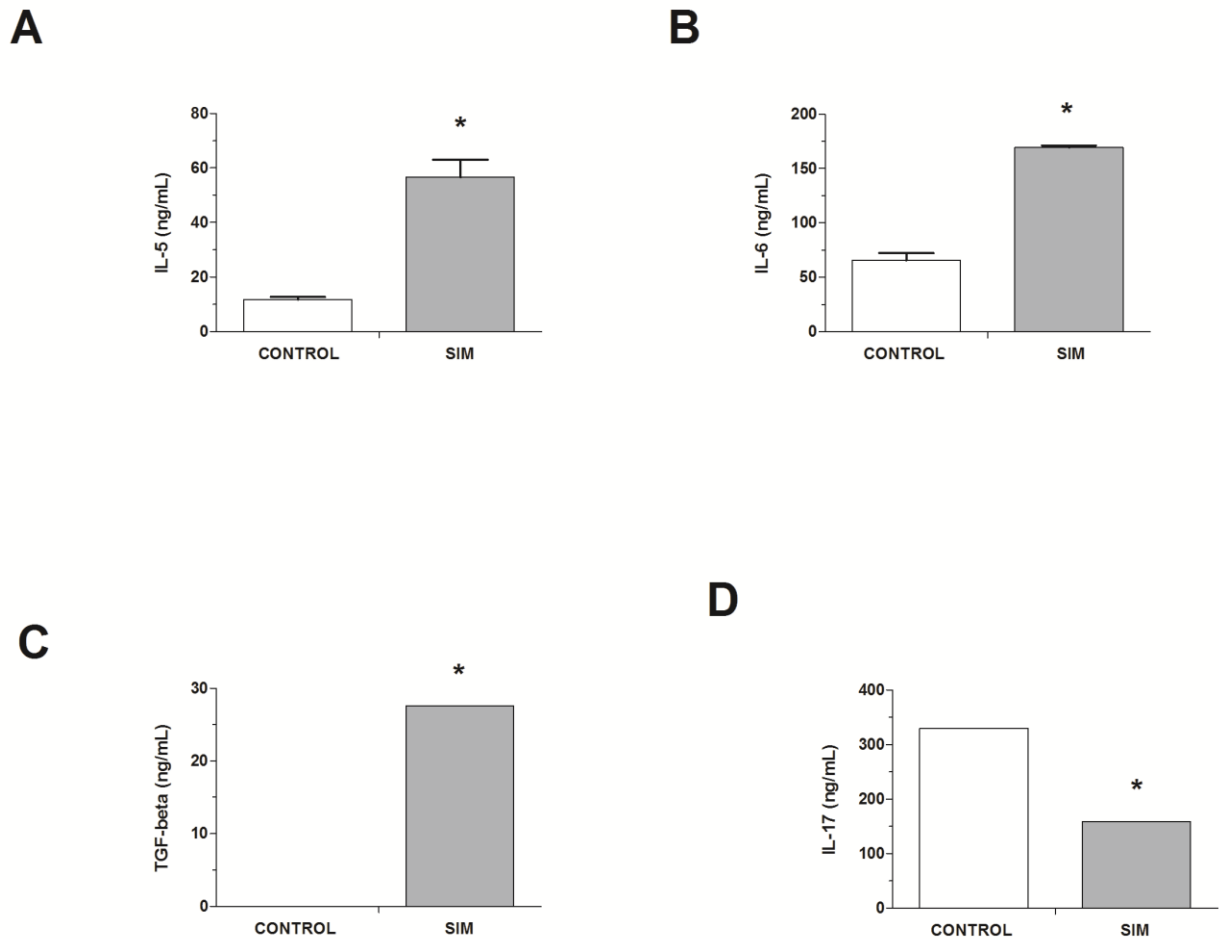


Figure 2: IL-5 (A), IL-6 (B), TGF- β (C) and IL-17 (D) secreted by spleen cells from C57BL/6 mice, suckled by *S. mansoni*-infected mothers (SIM) or non-infected mothers (CONTROL) that were immunized with OA in CFA. A total of 5×10^6 cells/mL were stimulated with OA (500 μ g/mL). Cytokines were quantified in supernatants harvested after 48 h by sandwich ELISA. The results represent the mean concentration (pg/mL) $\pm$ standard deviation for seven animal/group. Non-stimulated cells produced <15.6 pg/mL of IL-2 and TGF- β , <7.8 pg/mL of IL-6 and <10.9 pg/mL of IL-17. * p < 0.05 compared with the CONTROL group.

APÊNDICE B - Versão em inglês do artigo 2

Breastfeeding by *Schistosoma mansoni* infected improves IL-5 and TGF- β in the IL-12p40 deficient mice, but impair the IL-6 production

Fabiana Leticia da Silva¹, Erica Souza Fernandes¹, Maria da Conceição Silva¹, Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda¹, Roeckson Carlos Peixoto Silva¹, Eridan de Medeiros Coutinho², Silvia Maria Lucena Montenegro², Clarice Neuenschwander Lins de Moraes², Valdênia Maria Oliveira de Souza^{1,3}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Setor de Imunologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Pernambuco, Brasil.

² Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Pernambuco, Brasil.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Farmacêuticas, Pernambuco, Brasil

Corresponding Author: Valdênia Maria Oliveira de Souza

Address for correspondence: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Avenida Professor Moraes Rego, S/N. Cidade Universitária, Campus da UFPE – Recife - PE, Brazil. CEP: 50670-901.

E-mail: valdenia.souza@gmail.com

SUMMARY

Breastfeeding by *Schistosoma mansoni* infected mice improves the antibodies production of the lactants, in the long run, to heterologous antigens. In this study, we investigate the role of the adoptive breastfeeding by infected mothers, in the anti-ovalbumin (OA) response, in the setting of the IL-12/IL-23 absence due to importance in the neutralizing antibodies production and control immediate hypersensitivity. For this, wild-type mice suckled by *S. mansoni* infected (SIM) or non-infected mothers (CONTROL) and it had compared the hypersensitivities responses (HR), IgG1 and IgG2a levels, cytokine productions (IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 and TGF- β) with IL-12/IL-23 deficient mice suckled by non-infected mothers (IL-12p40-knockout/KO) or infected (IL-12p40KO-SIM). SIM group showed improvement in the delayed-type HR, IgG2a, IL-5, TGF- β and IL-6 production, with low level of IL-17. In IL-12p40KO-SIM animals, the production of IgG2a, IL-5 and TGF- β was higher than in the group IL-12p40KO and similar to group SIM, but the production of IL-6 was the lowest. In conclusion, the contact with parasite antigens during the lactation induced a better condition for producing neutralizing antibodies and, in IL-12/IL-23 deficiency, although had had a notable IL-5 production, the lactation in infected mothers can modulate the hyperactivation status by cross-regulation TGF- β and IL-6.

Keywords: Schistosomiasis mansoni; Breastfeeding; Interleukin-12; Interleukin-23; Heterologous antigens; Adult offspring.

INTRODUCTION

Maternal schistosomotic infection during the suckling period may alter the offspring' immune response in the long run (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). In relation to the immunity to non-related antigens to the parasite, in humans, the *Schistosoma*

haematobium maternal infection decreased the efficacy of vaccination against the Calmette-Guérin Bacillus and the IFN- γ production (Malhotra et al. 1999). In the contrary, a positive relation was observed between the levels of IgE against *Schistosoma mansoni* antigen and gastrointestinal allergy responses in children suckled by schistosomotic mothers (Noureldin et al. 1998). The suckling effect, separated from the gestation, in mothers infected by *S. mansoni* was evaluated in adult offspring immunized with ovalbumin (OA). The previous contact with breast milk from infected mothers led to a higher production of anti-OA antibodies and IL-2 (Santos et al. 2010), as well as, raised the antigen presentation ability by B cells (Santos et al. 2014). Therefore, the breast milk ability of facilitating the formation of B cells in the immature immune system and of enhancing the production of different types of antibodies (Malanchère et al. 1997) seems to be incremented with the maternal infections.

Both the parasite antigens and its antibodies, transferred via breast milk (Lenzi et al. 1987; Attallah et al. 2003, 2006), can be in contact with the immature immune system intestinal mucosa, or act systemically. In fact, there is transport of functionally intact immune compounds to the bloodstream due to the newborn undeveloped digestive ability (Rodewald, 1973; Zizka et al. 2007).

Therefore, infected breast milk may stimulate immunoregulatory mechanisms, among them the synthesis of cytokines IL-12 and IL-23, which direct the immune response to both a great production of neutralizing antibodies (Trinchieri, 2003; Beadling; Slifka, 2006; Ghilardi et al., 2004).

IL-12 and IL-23, produced by dendritic cells and macrophages, share the subunit IL-12p40 and the common chain IL-12R β 1 of the cellular receptors (Parham et al. 2002; Trinchieri, 2003; Reiner, 2007), but regulate the immune response through distinct ways. IL-12 direct the response to Th1, stimulating the production of IFN- γ (Hsieh et al. 1993;

Macatonia et al. 1993; 1995). The last cytokine participates switching to opsonizing and complement activators IgG antibodies; it also participates on the dependent immune response from cells to intracellular pathogens (Peng et al. 2002; Trinchieri, 2003). IL-12 acts blocking the generation of Th2 (Swain et al. 1990). Consequently, when there is no production of IL-12, the response is redirected to a Th2 profile, with higher production of IL-4, IL-5 and IL-13 (Mosmann et al. 1986; Akdis et al. 2012), which are involved in the activation of B cells and in the switch to anaphylactic antibodies IgE and IgG1 (IL-4 and IL-13) (Matsumoto et al. 1989).

IL-23 is mainly produced in the distal ileum (Becker et al. 2003) and largely induces the response of antibodies to T-dependent antigens (Beadling and Slifka, 2006; Ghilardi et al. 2004). IL-23 is an essential factor in the expansion of Th17 lymphocytes subtype (Nurieva et al. 2007), while it is required the presence of TGF- β and IL-6 in the microenvironment so there can be an effective differentiation of Th17 cells (Bettelli et al. 2006; Mangan et al. 2006). In the presence of TGF- β and IL-6, it is generated a classic profile of Th17 lymphocytes (production of IL-21, IL-9 and IL-10). However, when in absence of TGF- β and presence of IL-6 e IL-23, more pathogenic Th17 cells are generated, which produce higher levels of IL-22, GM-CSF and IFN- γ (Akdis et al. 2012). Therefore, the actions of IL-23, along with TGF- β e IL-6, may influence the plasticity of Th17 cells in the establishment of immune system hyperactivation and breakage of oral tolerance, as well as, in the defense against extracellular pathogens (Aujla et al. 2007, 2008; Bettelli et al. 2006; Khader et al. 2007; McKenzie et al. 2006; Ouyang et al. 2008).

To balance the Th17 response, the action of IL-10 and regulatory T cells (T reg) is essential. For the differentiation of both Th17 and T reg it is required the action of TGF- β . This cytokine induces the production of IL-10 in Th17 cells, while IL-23 inhibits it (Akdis et al. 2012). IL-10 produced by T reg or directly by classic Th17 cells blocks the aggravation of

inflammatory reaction mediated by pathogenic Th17 lymphocytes (Shevach, 2000; Akdis et al. 2012).

Knowing that the breastfeeding by schistosomotic mothers improve the humoral response to heterological antigens, in the long run, the present investigation verified the immunological behavior of adult offspring unable to synthesis IL-12 and IL-23 that it are interrelated with neutralizing antibodies productions and control of the immediate hypersensitivity. For this, deficient mice in the subunit IL-12p40 were fed by schistosomotic mothers and, when adults, they were immunized with OA in adjuvant. The *in vivo* hypersensitivity reactions and the production of anti-OA antibodies were evaluated, as well as, IFN- γ , IL-17, IL-6, IL-5, TGF- β e IL-10 syntheses by spleen cells. It was observed that the offspring who had previous contact with infected breast milk presented an improvement in producing delayed-type IgG2a, IL-5, TGF- β and IL-6, while there was a reduction in the synthesis of IL-17. In the absence of IL-12 and IL-23, the suckling maintained the enhancement of offspring's immunity, except for IL-6. These findings point out that in individuals in endemic areas for schistosomiasis, the contact with parasite antigens during lactation predisposes a greater immunity for neutralizing antibodies against heterologous antigens. On the other hand, when in deficiency of IL-12 and IL-23, breast milk from infected mother seems control exacerbated immune reaction through of TGF- β production and inhibition of the IL-6 production

MATERIALS AND METHODS

Animals and S. mansoni infection

C57BL/6 wild-type (wt) or deficient in IL-12p40 (IL-12p40 KO) mice of both sexes, four- weeks-old, were acquired from Animal Breeding Center (CECAL) of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil).

To obtain breast milk donor female, wt females were infected subcutaneously (sc) with 30 *S. mansoni* cercariae, BH strain (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). On 45th days, the infection was confirmed by Kato-Katz method. On day 60th post-infection, estruses were synchronized by administration of 5 IU (100 µL) hormone eCG (equine chorionic gonadotropin) plus, after 48h, injection of 5 IU (100 µL) of hCG (human chorionic gonadotropin) (Santos et al. 2010). The females were caged with wild-type male mice at a 1:1 ratio and successful mating was checked by presence of a vaginal plug. The same procedure was realized in non-infected females. To obtain IL-12p40 KO newborns, IL-12p40 KO female and male mice were caged at a 1:1 ratio and successful mating was checked by presence of a vaginal plug. Six-week-old offspring males were taken for the experimental and control groups. The mice were housed in the Animal Care Facility at the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil. The protocol study was approved by the Ethics Committee For Animal Research (CEUA) of the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil.

Study groups and immunization protocol

Immediately after birth, the wild-type and IL-12p40 KO newborns were housed in cages with changed breast milk donor mothers. Then, after the adoptive nursing, part of the offspring male mice born from wt non-infected mothers were Suckled by Infected wt Mothers (SIM); another part remained suckling in their own non-infected mothers (CONTROL mice). Offspring male mice born from IL-12p40 KO mothers were Suckled by Infected wt Mothers

(IL-12p40 KO-SIM); another part were suckled by non-infected wt mothers (IL-12p40 KO). After six weeks, the male offspring mice were divided into groups (n = 5) and submitted to the OA immunization protocol. Mice were immunized, subcutaneously (sc), with 100 µg of ovalbumin (OA; grade V, Sigma-Aldrich) emulsified in 1:1 complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich), on the base of the tail (0.1 mL/animal). For evaluating the postnatal effects of exposure to *S. mansoni* infection during nursing were used eight groups: (1) IL-12p40 KO mice, genetically deficient mice suckled by non-infected mothers and immunized with OA+CFA; (2) non-immunized IL-12p40 KO mice; (3) IL-12p40 KO-SIM mice, genetically deficient mice suckled by infected mothers and immunized with OA+CFA; (4) non-immunized IL-12p40 KO-SIM mice; (5) mice SIM+OA, wt animals suckled by infected mothers and immunized with OA+CFA; (6) non-immunized mice SIM; (7) CONTROL, wt animals born and suckled by non-infected mothers and immunized with OA+CFA; and (8) non-immunized control

Hypersensitivity reactions

Immediate and cell-mediated hypersensitivity reactions (HR) in the different groups were elicited 8 days after OA immunization. Briefly, 30 µl of 2% aggregated OVA was injected into a hind and the same volume of saline in the other. Footpad swelling was measured at 3, 6, 9 and 24 h after challenge, using a pocket thickness gauge (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) and expressed as the increase in thickness relative to saline-injected paw. The results are expressed as median ± standard deviation for each group. Mice non-immunized with OA (groups 2, 4, 6 and 8) were equally challenged to test the controls for non-specific swelling.

Detection of OA-specific antibodies by ELISA

On the ninth day after immunization, blood samples were taken from each group under intramuscular anesthesia with Xylazine and Ketamine (20 μ L of Xylazine and 40 μ L of Ketamine). Plasma samples were tested individually for IgG1 and IgG2a antibodies using 96-well plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) sensitized with OA (20 μ g/mL) and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Southern Biotechnology Associates plates, Inc, AL, USA). The reactions were developed with streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an OPD (O-phenyldiamine, Sigma) solution in 0.1 M citrate buffer plus H₂O₂ (30%). The plates were read of (450 nm) in an automatic ELISA reader (BIO RAD model 2550). Titration curves carried out for all the samples. The results are expressed as the median of the sample optical (O. D.) from each group in an appropriate dilution (within the linear part of the titration curve) for each isotype $\pm$ standard deviation (1: 512 to 1:32 for IgG2a or IgG1).

Determination of cytokine levels

Nine days after immunization, the spleen of each animal harvested after euthanasia by cervical dislocation. Cell suspensions were prepared in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with HEPES (10 mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM), 216 mg of L-glutamine/L, gentamicin (50 mg/L) and 5% of fetal bovine serum (Sigma-Aldrich). The spleen cells were cultivated at a final concentration of 5×10^6 viable/well in 48-well tissue culture plates (Costar Cambridge) and subsequently stimulated with OA (500 μ g/mL) or

concanavalin A (ConA) (5 µg/mL). Supernatants were harvested after 48 hours and assayed for cytokines content: IFN- γ , IL-17, IL-5, IL-6, IL-10 and TGF- β 1. The cytokines were measured using sandwich ELISA, using the following commercial kits: MIF00 IFN- γ , M1700 IL-17, M5000 IL-5, M6000B for IL-6, M1000 IL-10 and MB100B TGF - β all from (R & D Systems). The reactions were performed according to the manufacturer's instructions. The plates were read (405 nm) in an automatic ELISA reader (Bio Rad Model 2550). The samples were quantified using Microplate Manager software, version 4.0 program by comparison with the standard curves of respective recombinant. The results are presented as arithmetic median $\pm$ standard deviation.

Statistical analysis

To analyze the hypersensitivity were assessed using a two-way analysis of variance (treatment $\times$ time) followed by multiple comparisons using Tukey's method. For antibody production and cytokine analysis, a one-way analysis of variance followed by multiple comparison using the Tukey's method was used. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The results were representative of three experiments.

RESULTS

In vivo anti-OA hypersensitivity reactions in IL-12p40 KO adult offspring that received milk from schistosomotic mothers

Eight days after immunization with OA, IL-12p40 KO mice suckled by *S. mansoni*-infected or uninfected mothers were challenged with aggregated OA in the footpads. The kinetic hypersensitivity reactions were compared to OA-immunized wild-type mice suckled by infected or uninfected mothers that were similarly challenged (Figure 1). The anti-OA immediate (6h) hypersensitivity reaction and reaction delayed-type hypersensitivity (24h) were similar in the CONTROL and SIM groups. In the IL-12p40 KO and IL-12p40 KO-SIM these reactions were significantly low when compared to CONTROL or SIM groups, respectively.

The non-specific swellings were evaluated in the OA non-immunized groups and were unremarkable (data not shown).

OA-specific IgG1 and IgG2a antibodies production in IL-12p40 KO adult offspring that received milk from schistosomotic mothers

On the 9th day of the immunization, all the above groups were bled and the antibody levels were assessed in the plasma. Anti-OA IgG2a production in the SIM mice had increased when compared to animals without previous infected-mother contact (CONTROL) (Figure 2). In the same way, the anti-OA IgG2a production in the mice IL-12p40 KO-SIM was significantly high in relation to IL-12p40 KO group. Regarding anti-OA IgG1 antibodies levels, there was no significant difference among the groups. The production of OA-specific IgG1 or IgG2a antibodies did not occur in any of the non-immunized groups (data not shown).

Suckling by S. mansoni-infected mothers improved the IL-5, TGF- β and IL-6 and in the IL-12p40 absence only the IL-6 production was impaired

Spleen cells from the OA-immunized groups were cultured with OA or ConA and the supernatants were collected to quantify cytokine content (Figure 3). The results depicted in Fig. 3a shows that the synthesis of IFN- γ , in response to OA re-stimulation, could be measured only in the supernatants of wild-type mice. In this condition, there was no significant difference in the IFN- γ production for the SIM group in comparison to the CONTROL group. Upon mitogenic stimulation, it was detected higher levels of IFN- γ in the CONTROL group in relation to SIM group. There was much lower IFN- γ production in the genetically deficient mice. With regard to IL-17 levels (Fig. 3b) in the wild-type mice, for *in vitro* stimulus with OA, there was higher level of this cytokine in the CONTROL group in relation to SIM group. It was observed IL-17 levels lower in the IL-12p40 KO and IL-12p40 KO-SIM mice in comparison to CONTROL and SIM mice, respectively. However, upon ConA and OA stimulation, there were difference among the groups

The figure 3c showed that the IL-5 content was significantly lower in the supernatant from CONTROL group in relation to SIM group and to genetically deficient mice, upon OA re-stimulation. There was higher IL-5 level in the IL-12p40 KO-SIM group mice in comparison to mice IL-12p40 KO suckled by uninfected mother. There was no difference for SIM and IL-12p40 KO-SIM group. *In vitro* ConA stimulation induced more IL-5 synthesis in IL-12p40 KO and IL-12p40 KO-SIM group than in CONTROL and SIM group, respectively. Regarding IL-6 production, in response to OA re-stimulation (Fig 3d), there were high levels in the SIM mice in relation to CONTROL mice. In the IL12p40 absence and previous contact with maternal milk from infected-mother (IL-12p40 KO-SIM group) the IL-6 synthesis was

lower than in those suckled by uninfected mother (IL-12p40 KO), as well as, for SIM group. For ConA stimulation, genetically deficient mice produced less IL-6 than wild-type mice.

The IL-10 production, in response to OA re-stimulus, was similar among the CONTROL and experimental groups. In response to ConA stimulus, the cytokine level was higher in the genetically deficient mice than in the wild-type mice (Fig. 3e). In regard to TGF- β (Fig. 3f), it could be observed higher production of this cytokine, in response to OA, in the mice suckled by infected mother, SIM and IL-12p40 KO-SIM, in comparison to CONTROL and IL-12p40 KO, respectively. For groups that received milk from uninfected mothers, TGF- β was only detected in the IL-12p40 KO. For ConA stimulation, there was lower levels in the CONTROL group in comparison to SIM and 12p40 KO group. 12p40 KO-SIM produced less TGF- β than SIM group. There was no alteration between IL-12p40 KO and IL-12p40 KO-SIM.

DISCUSSION

About 40 million women in fertile age and 10 million pregnant women chronically infected by the *Schistosoma* have been living endemic areas (Friedman et al. 2007; Hillier et al. 2008; Salawu and Odaibo, 2013) and may influence the immune response of the offspring in the long run (Noureldin et al. 1998; Malhotra et al. 1999; Lebeaud et al. 2009). In relation to the contact with parasite antigens during lactation, experimental studies point towards an improvement in the production of antibodies by adult offspring (Colley et al. 1999; Santos et al. 2010). In this study, using C57BL/6 animals, it was shown that breast milk by schistosomiac mothers favored the production of IL-5, TGF- β and IL-6, while decreasing production of IL-17, in response to a heterologous antigen. In IL-12p40 deficiency, IgG2a, IL-5 and TGF- β production was as high as the wild-type group; however, the IL-6 synthesis was down-regulated.

Despite the high levels of IL-5, there was no larger anti-OA IgG1 production or great immediate hypersensitivity (3 hours), IgG1-dependent, in SIM animals. Nonetheless, an increase in anti-OA IgG2a levels was observed. The genetic background of the animals can predispose the immunity mediated by IFN- γ , facilitating the DTH and production of IgG2a, but the breastfeeding by infected mothers seem to influence these findings. In this context, Santos *et al.* (2010), described an enhancement of ~50% in IgG1 and ~80% in IgG2a levels, without verifying any increase in IFN- γ , in Swiss mice. The contact with breast milk from *S. mansoni* infected-mothers improved the antigen presentation ability by B lymphocytes (Santos et al. 2014). IL-5 and IL-6 are involved in B cells to induce proliferation and differentiation into antibody-secreting cells (ASC) (plasma cell longevity) (Messika et al. 1998; Knödel et al. 2001; Cassese et al. 2003). TGF- β favors the development of B lymphocytes and the IgA and IgG2b production (Weaver et al. 2006). Considering the great production of IL-5, IL-6 and TGF- β in the SIM group, these cytokine could induce a fast generation of ASC and contribute to appearance of anti-OA IgG2a antibodies (Driver et al. 2001). However, in the SIM animals, there was no significant raise on hypersensitivity reactions mediated by immune complexes (9 hours), IgG2a-dependent. These data point out a better condition in eliciting IgG2a antibodies, without leading to hypersensitivity reactions, like in classical Th17 response. This hypothesis is supported by the increase in TGF- β and IL-6, accompanied of mild levels of IL-17, induced by breastfeeding milk by infected mother. This controlled Th17 response can be due to IL-5 in SIM mice (Harrington et al. 2005, Alber and Kamradt, 2007).

In this setting would also fit in animals IL-12p40 KO-SIM, since the levels of IgG2a, IL-5 and TGF- β was similar to the SIM animals, but there was a decrease in production of IL-6 in the first group. In this way, the breastfeeding by *S. mansoni* infected-mothers seems to favor the control of the anti-OA immunity, facilitating the suppressive action of TGF- β and

IL-10. It has been shown that, in absence of IL-6, the TGF- β favors the generation of T reg cells (Bettelli et al. 2006). Such fact could explain the lack of increase in production of IL-5 and IgG2a in IL-12/IL-23 deficient animals.

The roll of breastfeeding in favoring the production of antibodies as a way of answering to the vaccines and reducing the risk of allergenic diseases in the offspring is well described (Kull et al. 2004; Malanchère et al. 1997). However, the infected breast milk increases such property by producing more IgG2a opsonizing antibodies, by controlling the production of IL-5 and by restraining the risk of allergic responses.

We have discarded the action of the Th17 profile during the breastfeeding due to maternal infection, because Th17 response is striking controlled during the course of schistosomiasis (Iwakura and Ishigame, 2006; Wynn et al. 2004). We are aware that there is a great distance for this experimental approach to be translated for the population from schistosomiasis endemic areas, mainly in the family of Th17 cells (Annunziato et al. 2008). On the other hand, the results here found bring up the importance of contact with parasite antigens in the early life, through breast milk, in order to increasing the immunity to extracellular bacteria and vaccines antigens. We highlighted the induction non-deleterious immune response, (TGF- β /IL-6/Th17 and TGF- β /IL-10/T reg) that could promote the reduction of autoimmune and allergic diseases in individuals of endemic areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Roni Evencio Araujo for technical assistance; Dra. Constança Simões Barbosa for providing cercariae of *Schistosoma mansoni*; Dra Gerlane by

veterinary assistance to animals, and the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for granting the scholarship.

REFERENCES

- Alber, G. and Kamradt, T.** (2007). Regulation of Protective and Pathogenic Th17 Responses. *Current Immunology Reviews*. **3**, 3-16.
- Akdis, M., Palomares, O., Van de Veen, W., Van Splunter, M. and Akdis C. A.** (2012). Th17 and Th22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **129**, 1438-1449.
- Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S.** (2008). The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International Immunology*. **20**, 1361–1368
- Attallah, A. M., Ghanem, G. E., Ismail, H. and Waseef, A. M.** (2003). Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **68**, 647-651.
- Attallah, A. M., Abbas, A. T., Dessouky, M. I., EL-emshaty, H. M. and Elsheikha, H. M.** (2006). Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitology Research*. **99**, 137-145.
- Aujla, S. J., Dubin, P. J. and Kolls, J. K.** (2007) Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in Immunology*. **19**, 377-382.
- Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J, Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. and Kolls, J. K.** (2008). IL-22

mediates mucosal host defense against Gram- negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine*. **14**, 275-281.

Beadling, C. and Slifka, M. K. (2006). Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. **54**, 15–24.

Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P. R., Autenrieth, I. and Neurath, M. F. (2003). Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *The Journal of Clinical Investigation*. **112**, 693-706.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*. **441**, 235-238.

Cassese, G., Arce, S., Hauser, A. E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A. and Manz, R. A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *The Journal of Immunology*. **171**, 1684-1690.

Colley, D. G., Montesano, A. M., Jr Freeman, G. L. and Secor, E. W. (1999). Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes and Infection*. **1**, 517-524.

Eissa, A. M., Saad, M. A., Abdel Ghaffar, A. K., el-Sharkaway, I. M. and Kamal, K. A. (1989). Transmission of lymphocyte responsiveness to schistosomal antigens by breast feeding. *Tropical and Geographical Medicine*. **41**, 208-212.

- Friedman, J. F., Mital, P., Kanzaria, H. K., Olds, G. R. and Kurtis, J. D.** (2007). Schistosomiasis and pregnancy. *Trends in Parasitology*. **23**, 159–164.
- Ghilardi, N., Kljavin, N., Chen, Q., Lucas, S., Gurney, A. L. and Sauvage, F. J.** (2004). Compromised humoral and delayed-type hypersensitivity responses in IL-23- deficient mice. *The Journal of Immunology*. **172**, 2827-2833.
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy. T. L., Murphy, K. M. and Weaver, C. T.** (2005). Interleukin 17–producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology*. **6**, 1123-1132.
- Hillier, S. D., Booth, M., Muhangi, L., Nkurunziza, P., Khihembo, M., Kakande, M., Sewankambo, M., Kizindo, R., Kizza, M., Muwanga, M. and Elliott, A.** (2008). *Plasmodium falciparum* and Helminth Coinfection in a Semiurban Population of Pregnant Women in Uganda. *The Journal of Infection Diseases*. **198**, 920-927.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O' Garra, A. and Murphy, K. M.** (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. **260**, 547-549.
- Khader, S. A., Bell, G.K., Pearl, J. E., Fountain, J. J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G. E., Shen, F., Eaton, S. M., Gaffen, S. L., Swain, S. L., Locksley, R. M., Haynes, L. Randall, T. D. and Cooper, A. M.** (2007). IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature Immunology*. **8**, 369-377.

Knödel, m., Kuss, A. W., Berberich, I. and Schimpl, A. (2001). Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *European Journal of Immunology*. **31**, 1972–1980.

Kull, I. R. N., Almqvist, C., Lilja, G., Pershagen, G. and Wickman, M. (2004). Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **114**, 755-760.

LaBeaud, A. D., Malhotra, I., King, M. J., King, C. L., King, C. H. (2009). Do Antenatal Parasite Infections Devalue Childhood Vaccination? *Plos Neglected Tropical Diseases*. **3**,1-6.

Lenzi, J. A., Sobral, A. C., Jr A, Grimaldi, F. G. and Lenzi, H. L. (1987). Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **82**, 257-267.

Macatonia, S. E., Hsieh, C., Murphy, K. M. and O’Garra, A. (1993). Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4⁺ T cells from $\alpha\beta$ TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN- γ production is IFN- γ -dependent. *International Immunology*. **5**, 1119-1128.

Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M. and O’Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naïve CD4⁺ T cells. *The Journal of Immunology*. **154**, 5071-5079.

Malanchère, E., Huetz, F. and Coutinho A. (1997). Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *European Journal of Immunology*. **27**, 788-793.

Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J. H., Kazura, J. W. and King, C. L. (1999). Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children

sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. **162**, 6843-6848.

Mangan, P. R., Harrington, L. E., O'Quinn, D. B., Helms, W. S., Bullard, D. C., Elson, C. O., Hatton, R. D., Wahl, S. M., Schoeb, T. R. and Weaver, C. T. (2006). Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. *Nature*. **441**, 231-234.

Matsumoto, R., Matsumoto, M., Mita, S., Hitoshi, Y., Ando, M., Araki, S., Yamaguchi, N., Tominaga, N. and Takatsu, K. (1989). Interleukin-5 induces maturation but not class switching of surface IgA-positive B cells into IgA-secreting cells. *Immunology*. **66**, 32-38.

McKenzie, B. S., Kastelein, R. A. and Cua, D. J. (2006). Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology*. **27**, 17-23.

Messika, E. J., Lu, P. S., Sung, Y. J., Yao, T., Chi, J. T., Chien, Y. H. and Davis, M. M. (1998). Differential effect of B lymphocyte–induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *Journal of Experimental Medicine*. **188**, 515-525.

Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M.A. and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*. **136**, 2348-2357.

Noureldin, M. S. and Shaltout, A. A. (1998). Anti-schistosomal IgE and its relation to gastrointestinal allergy in breast-fed infants of *Schistosoma mansoni* infected mothers. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. **28**, 539-550.

Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma L, Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M. and Dong, C. (2007). Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. **448**, 480-483.

- Othman, A. A., Shoheib, Z. S., Saied, A. M. and Soliman, R. H.** (2010). Congenital exposure to *Shistosoma mansoni* infection: Impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology*. **215**, 101-112.
- Ouyang, W., Kolls, J. K. and Zheng, Y.** (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines Inflammation. *Immunity*. **28**, 454-467.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrel, A. M., Mc Clanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Pennick, D. M., Kastelein, R. A., Malefyt, R. W. and Moore, K. W.** (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit IL-23R. *The Journal of Immunology*. **168**, 5699-5708.
- Peng, S. L., Szabo, S. J. and Glimcher, L. H.** (2002). T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *PNAS*. **99**, 5545-5550.
- Rodewald, R.** (1973). Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *The Journal of Cell Biology*. **58**, 189-211.
- Reiner, S. L.** Development in Motion: Helper T cells at work. (2007). *Cell*. **129**, 33-36.
- Sadigursky, M., Falangola, M. F., Santos, R.O., Cardoso, S.A. and David, J.** (1987) Induced tolerance to *Schistosoma mansoni* antigens modulate periovular granuloma. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **82**, 269-271.
- Salawu, O. T. and Odaibo, A. B.** (2013). Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. **122**, 1-4.

Santos, P. E. A., Sales, I. R. F., Schirato, G. V., Costa, V. M. A., Albuquerque, M. C. P. A., Souza, V. M. O. and Malageno, E. (2010). Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitology Research*. **107**, 95-102.

Santos, P. E. A., Lorena, V. M. B., Fernandes, E. S., Sales, I. R. F., Albuquerque, M. C. P. A., Gomes, Y. M., Costa, V. M. A. and Souza, V. M. O. (2014). Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cell from adult offspring mice. *Experimental Parasitology*. **141**, 62-67.

Shevach, E. M. (2000). Regulatory T Cells in Autoimmunity. *Annual Review of Immunology*. **18**, 423-449.

Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. and Huston, G. (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *The journal of Immunology*. **145**, 3796- 3806.

Trinchieri, G. (2003a). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. **3**, 133-146.

Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. and Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. **24**, 677–688.

Iwakura, Y. and Ishigame, H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. **116**, 1218–1222.

Wynn, T. A., Thompson, R. W., Cheever, A. W. and Mentink-Kane, M. M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*. **201**, 156-167.

Zizka, J., Hrdy, J. Lodinová-Zadnikova, R., Kocourková, I., Novotná, O., Sterzl, I. and Prokesova, L. (2007). Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. *Pediatric Allergy and Immunology*. **18**, 486–494.

Figures and Legends

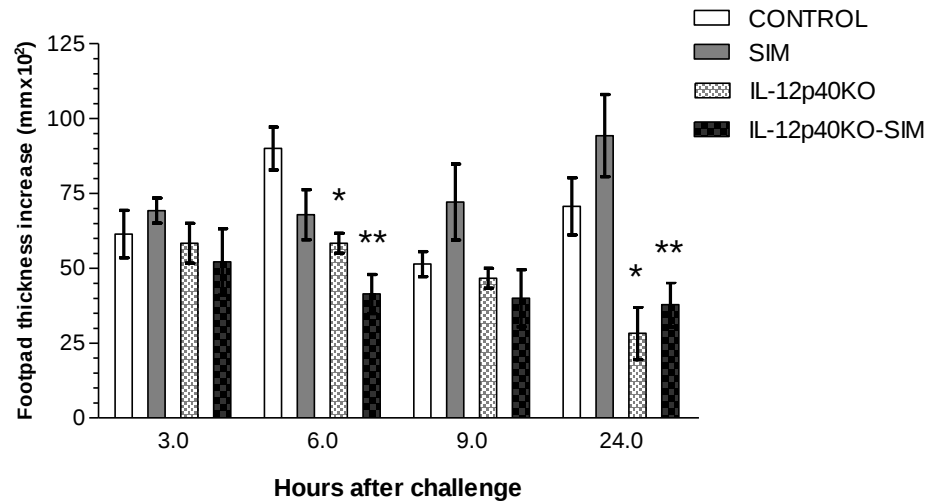


Figure 1: Hypersensitivity reactions delayed-type to specific OA in wild-type and IL-12p40 deficient C57BL/6 mice suckled by *S. mansoni* infected mothers, SIM and IL-12p40KO-SIM group, respectively, which were immunized with OA in CFA. Mice were challenged with aggregated OA in the footpad 8 days after immunization. Wild-type (CONTROL) and IL-12p40KO mice suckled by uninfected mothers and immunized with OA were equally challenged. The results represent the mean of the net increase in footpad thickness of five mice/group $\pm$ standard error. * $p < 0.05$ compared with the CONTROL group, ** $p < 0.05$ compared with the SIM group.

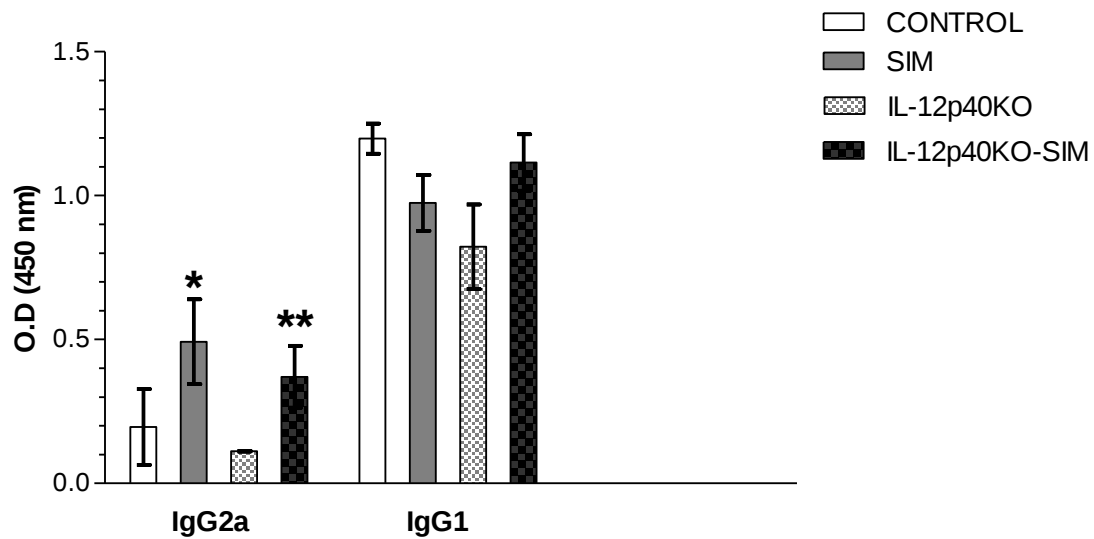


Figure 2: OA-specific IgG1 (a) and IgG2a (b) antibodies produced by wild-type and IL-12p40 deficient mice suckled by *S. mansoni* infected mothers, SIM and IL12p40KO-SIM group, respectively, which were immunized with OA in CFA. Isotype levels in the plasma were measured by ELISA in dilutions 1:512 (IgG1) and 1:32 (IgG2a) 9 days after immunization. Isotype levels from wild-type (CONTROL) and IL-12p40KO mice suckled by uninfected mothers and immunized with OA were also measured. The results represent the mean of absorbance (O.D.) $\pm$ standard error for five animals/group. * $p < 0.05$ compared with the Control group, ** $p < 0.05$ compared with the IL-12p40KO group.

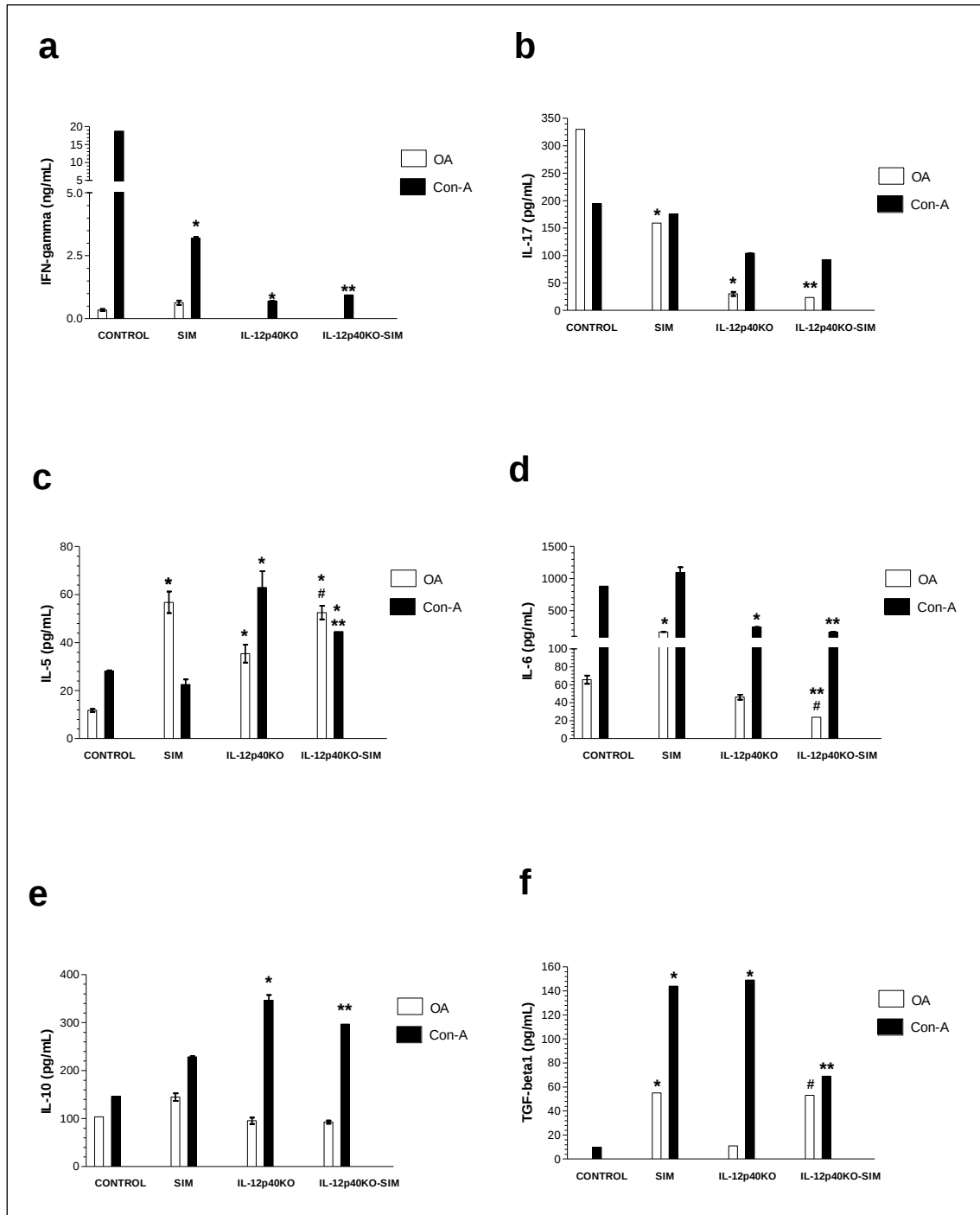


Figure 3. IFN- γ (a), IL-17 (b), IL-5 (c), IL-6 (d), IL-10 (e) e TGF- β 1 (f) secreted by spleen cells from wild-type and IL12p40 deficient mice suckled by *S. mansoni* infected mothers, SIM and IL12p40KO-SIM group, respectively, which were immunized with OA in CFA nine days before. A total of 5×10^6 cells were stimulated with OA (500 μ g/ml) or Con A (5 μ g/ml), for 48h, and cytokines quantified in supernatants by sandwich ELISA. Cytokine levels produced by the group of mice wild-type (CONTROL) and IL-12p40KO mice suckled by uninfected mothers and immunized with OA were also measured quantified. The results represent the mean $\pm$ standard error for five animals/group. Non-stimulated cells produced <0.44 ng/ml of IL-2, <1.25 ng/ml of IFN- γ , and <0.31 ng/ml of IL-10. * $p < 0.05$ compared

with the Control group, ** $p < 0.05$ compared with the SIM group, # $p < 0.05$ compared with the SIM group IL-12p40KO group.



ANEXOS

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

 **FIOCRUZ**
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado: **AVALIAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA TH17 DE CAMUNDONGOS AMAMENTADOS EM MÃES INFECTADAS PELO SCHISTOSOMA MANSONI, FRENTE AO ANTÍGENO HETORÓLOGO OVALBUMINA**, protocolado sob o Nº 01/2010, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **SILVIA MARIA LUCENA MONTENEGRO**, 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 28/04/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até Dezembro de 2013.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie - linhagem	Nº de Animais
Camundongos <i>Mus musculus</i>	480
Descendentes	64
Linhagem C57BL/6 p40KO	92
Descendentes	48
Linhagem C57BL/6 p35KO	92
Descendentes	48
TOTAL	664 (Progenitores) 160 (Descendentes)

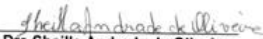
We certify that the project entitled **AVALIAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA Th17 DE CAMUNDONGOS AMAMENTADOS EM MÃES INFECTADAS PELO SCHISTOSOMA MANSONI, FRENTE AO ANTÍGENO HETORÓLOGO OVALBUMINA** (CEUA Protocol Nº 01/2010), coordinated by **SILVIA MARIA LUCENA MONTENEGRO**

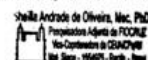
Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.mniam.fiocruz.br

 **FIOCRUZ**
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

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 february 24, 2011. In the present version this project is licensed and valid until December 2013.

Recife (PE, Brazil) may 23, 2011.


Dra Sheilla Andrade de Oliveira
Vice- Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ



Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.mniam.fiocruz.br

ANEXO B: Parecer da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio - CPqAM/FIOCRUZ).

 Núcleo de Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

 **CIBio**

PARER TÉCNICO DE EXTENSÃO DE COB

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação do papel da resposta Th17 de camundongos amamentados em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni*, frente ao antígeno heterólogo Ovalbumina.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sílvia Maria Lucena Montenegro.

LABORATÓRIO ONDE SERÁ REALIZADO O PROJETO: Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (Departamento de Imunologia) e Biotério

DATA DE APRESENTAÇÃO A CIBio: 27/09/2010.

REGISTRO NA CIBio: 02/2010.

DADOS GERAIS DO PROJETO

NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA DO LABORATÓRIO (OGM): NB 1

MICROORGANISMOS MANIPULADOS (NÃO OGM): *Schistosoma mansoni*

MICROORGANISMOS MANIPULADOS (AnGM): *Mus musculus* C57BL/6

DATA DA AVALIAÇÃO DA INFRAESTRUTURA LABORATORIAL: 20/10/2010

COLABORADOR ACOMPANHANTE DA INSPEÇÃO: Sílvia Maria Lucena Montenegro / Fabiana Leticia da Silva

PARECER

A CIBio/CPqAM, no uso de suas atribuições, em conformidade com a Resolução Normativa nº 1, de 20 de junho de 2006, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), avaliou o projeto acima descrito e considera que o mesmo atende os requisitos necessários para execução das pesquisas em Nível de Biossegurança 1.

O projeto está **APROVADO** para ser realizado conforme sua última versão apresentada à CIBio/CPqAM.

Cada novo projeto de pesquisa, mudança ou acréscimo de salas no laboratório e/ou biotério deve ser acompanhada de uma nova submissão à CIBio para obtenção de nova autorização. Isto significa que a autorização obtida é válida apenas para o desenvolvimento do projeto submetido à análise e para as instalações existentes no momento da submissão.

O pesquisador principal deverá apresentar anualmente à CIBio os relatórios dos projetos de pesquisas que envolvam OGM e/ou AnGM.

Segue algumas **RECOMENDAÇÕES GERAIS** para atender as inconformidades encontradas durante a inspeção para avaliação da infraestrutura laboratorial.

1. Solicitar o ajuste da cabine de segurança biológica (F-CPqAM-8686) da sala de cultura de Tecidos do Departamento de Imunologia, visto que a mesma não passou no teste de certificação realizado em abril de 2010.
2. Instituir rotina de limpeza e descontaminação periódica das centrífugas (rotores) e das estufas utilizadas na execução do trabalho.
3. Adotar procedimentos de armazenamento e descarte de produtos químicos considerando-se a compatibilidade os mesmos.
4. Implantar controle de acesso para o laboratório. O controle de acesso central da Instituição não inviabiliza a entrada de pessoas não autorizadas nas dependências do laboratório.

 Núcleo de Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

5. Solicitar a reparação de infiltrações nas paredes.

6. Solicitar a instalação de um lavatório para assepsia das mãos na entrada do laboratório, uma vez que a pia exclusiva para lavagem de mãos é uma medida transitória.

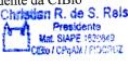
7. Solicitar implantação programa de desinsetização periódica.

8. Solicitar instalação de armários para guarda de objetos pessoais na entrada do laboratório

Observações: O Biotério oferece as condições necessárias para execução do projeto, de acordo com parecer emitido em 14/07/2010. Atualmente, todavia, é importante ressaltar que carcaças dos animais de experimentação estão sendo encaminhados diretamente para incineração, visto que a autoclave do setor está quebrada. Assim, é importante que o pesquisador principal deste projeto solicite à Administração o conserto do referido equipamento para adequação das condições de Biossegurança, assim como solicitar a manutenção/certificação da cabine de segurança biológica da sala de experimentação do Biotério

Recife, 10 de novembro de 2010


Christian Robson de Souza Reis
Presidente da CIBio


Christian R. de S. Reis
Presidente
Mat. SIAPE 1520943
CIBio/CPqAM/FIOCRUZ

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.610-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br

ANEXO C: Normas de publicação da revista Parasite Immunology



Parasite Immunology

Author Guidelines

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 point Times New Roman font. The preferred file type formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .docx, .rtf, .ppt, .xls; please do not save them as portable document files (PDF) files. Ideally, illustrations should be uploaded in native format of PICT if created on a Mac, or in native format or WMF if created in Windows. Files saved as PS, EPS, GIF and TIF may also be used. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. Detailed information on our digital illustration standards is available on-line at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Each submission should include a title page which should contain: the paper title, full names and affiliations of all authors, and should indicate an author for use for correspondence (including an email address). For each author, disclose potential conflicts of interest, including all relevant financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding) in any company or institution that might benefit from the publication (or state 'none'). Authors do not need to report the sums concerned. Please can you therefore add a small paragraph entitled "Disclosures" and then include any relevant details or "none" if there is nothing to disclose, if you have not already done so. For indexing purposes a short number of 'key words' should be included.

If you are not a native English-language speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission. A list of companies that will edit your manuscript for a fee can be found

here http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. Professional editing is not compulsory, but will mean that reviewers are better able to read and assess your manuscript. Use of one of these companies does not guarantee acceptance or preference for publication in this journal.

Manuscript Types and Style

Original Papers

The text should be preceded by a short abstract not exceeding 200 words. The abstract of a paper in *Parasite Immunology* is the face of the paper turned to the world. It is not a précis of the paper, but is a clear, direct account of what was done, why it was done, and why the outcome matters. This is not the place for details or data, or for speculation. Avoid abbreviations, write sparingly, but simply and clearly as to a general audience, and give the highlights only. You can make some simple changes to your title and abstract to improve your article's ranking in search engines: guidelines on this can be found here. Please review your article's title and abstract in the light of these suggestions to improve your paper prior to submission and maximise its potential readership.

The abstract should be followed by these sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to Tables and Figures, Tables and Figures. Pages should be numbered consecutively in arabic numerals. Please also ensure that the lines in your manuscript are numbered. Acknowledgements should include an indication of the source of funding for the work and the contribution of individual authors (see "Authorship" below).

References should be cited in the Vancouver style. In the text they should be numbered in superscript in the order in which they appear. The reference list should follow the numbering sequence used in the text and should include: the names and initials of all authors; the full title of the article; the source of reference using abbreviations for journal titles as shown in *Index Medicus*, the year, volume number and first and last pages. For references with more than six authors, the first three should be listed, followed by et al. For references cited from books, the title of the book should be followed by the names and initials of the editors, the edition, the place of publication, the publisher, the year of publication and the first and last pages.

Examples:

1) Rogerson SJ, Novakovic S, Cooke BM, Brown GV. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes adhere to the proteoglycan thrombomodulin in static and flow-base systems. *Exp Parasitol* 1997; 86 8-18.

2) Parks DR, Lanier LL, Herzenberg LA. In *Handbook of Experimental Immunology*, ed. Weir DM, Oxford: Blackwell Science Ltd; 1986; 29

Authors are responsible for the accuracy of their references.

Spelling should conform to *The Concise Oxford Dictionary of Current English* and units of measurement, symbols and abbreviations with those in *Units, Symbols and Abbreviations* (1977) published and supplied by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE. This specifies the use of SI units.

Tables and figures should be referred to in the text together with an indication of their approximate position. Colour illustrations are encouraged; there is no charge to the author for the inclusion of colour illustrations.

Brief Definitive Reports

The journal publishes studies that are not required to be written up as conventional papers. They should not be structured like original papers but should contain brief accounts of background studies, methods used, results and discussion. References should be kept to a minimum and there should be no more than one table and one figure. Maximum length accepted is four pages of typescript. They will be given some priority in publication as the schedule permits.

Review

Articles

We would be happy to receive Review articles with a limit of 5000 words that are structured in the same format as Original Articles.

Letters to the Editor

These are published if they comment usefully on material published in previous issues, and should not exceed 400 words.

Meeting Reports

Reports on meetings or parts of meetings concerned with parasite immunology will be published. Again, these reports will be commissioned, but the editors will be pleased to receive reports that might be used.

Authorship

All authors must fulfil the following three criteria:

- Have made a substantial contribution to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data;
- Have drafted the paper or revised it critically;
- Have approved the submitted and final versions.

In the Acknowledgments section of the paper all authors must indicate their specific contributions to the work described in the manuscript. Some examples include

- X performed the research;
- Y designed the research study;
- Z contributed essential reagents or tools;
- A analysed the data;
- B wrote the paper.

An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work. E.g. 'A performed the research, A and C analysed the data and wrote the paper, E contributed the knockout mice for the study and G designed the research study and wrote the paper'.

Supporting Information

Online Supporting Information can include additional explanatory notes, data sets, videos, lists, figures or tables that will not be published in the print edition of the journal and which are ancillary to, rather than central to, the article. Supporting Information must be approved by the Editors and should be supplied as a single PDF file headed by the title of the paper and the authors' names, addresses and contact information. Supporting Information will be published exactly as supplied and it is the author's responsibility to ensure that the material is logically laid out, adequately described, and in a format accessible to readers. Animations and other moving images or sound files in standard formats must be supplied as separate files. Figures and tables in Supporting Information should be referred to in the main text and labelled Fig. S1, Fig. S2 or Table S1, etc., in the order cited. Full guidelines and information on acceptable file formats may be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

Display of Sequences

Prepare sequences as figures, not tables. This will ensure that proper alignment is preserved.

Submission of Sequences to GenBank

Original DNA sequences reported in *Parasite Immunology* must also be submitted to GenBank. Instructions for submission can be found at the following address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. An accession number should be supplied parenthetically at a relevant location in the text.

Human and Murine Genes

For human genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Nomenclature Committee. Approved gene symbols should be obtained prior to submission from the HUGO Nomenclature Committee, nome@galton.ucl.ac.uk. For nomenclature guidelines, see White et al., 'Guidelines for Human Gene Nomenclature' [Genomics, 45, 468-471 (1997)]. The Gene Name Proposal form may be completed on the Nomenclature Web page: <http://www.genenames.org>. Use ISCN nomenclature for cytogenetics notation [Mitelman, F. (ed.) ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S. Karger, Basel]. Human gene names and loci should be written in uppercase italics and Arabic numerals. Protein products are not italicized. For mouse strain and genetic nomenclature, refer to the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: <http://www.informatics.jax.org/nomen/>. New symbols and names for genes should be obtained prior to submission through the online symbol registry form at: http://www.informatics.jax.org/nomen/nomen_submit_form.shtml.

Microarray Databases

Parasite Immunology supports the efforts of the Microarray Gene Expression Data Society to standardize the presentation of microarray data, and we recommend that authors follow their guidelines and checklist (http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html). In addition, the journal strongly recommends the supplemental microarray data be deposited in a public database such as Gene Expression Omnibus (or GEO, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or submitted for peer-review with the initial submission of the manuscript.

Ethical Policy and Guidelines

Parasite Immunology encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the International Committee of Medical Journal Editors. The Editors reserve the right to reject a paper that does not meet these standards.

Parasite Immunology will not consider papers that have been accepted for publication or published elsewhere. Copies of existing manuscripts with potentially overlapping or duplicative material should be submitted together with the manuscript, so that the Editors can judge suitability for publication.

Please click here to read the Ethical Policies of *Parasite Immunology*.

For more detailed ethical guidelines please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp>

All papers to *Parasite Immunology* are checked for potential plagiarism using CrossCheck plagiarism detection software. By submitting your manuscript to *Parasite Immunology* you accept that your manuscript will be screened for plagiarism against previously published works.

Animal Experimentation

The Editors will not allow any papers to be published that describe experiments on living animals which may reasonably be presumed to have inflicted unnecessary pain or discomfort upon them. Experiments on living vertebrates or *Octopus vulgaris* should conform in principle to the legal requirements in the UK. Whenever appropriate, a statement should be included indicating that experiments were performed in accordance with local/national guidelines.

ARRIVE Guidelines

Authors are expected to comply with the ARRIVE guidelines for reporting research before submission of a manuscript. While the guidelines refer to animal experiments, most of the elements are common to all forms of research communication and adherence will strengthen the transparency and completeness of reporting.

Clinical Trials Registry

In accordance with the guidelines published by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), *Parasite Immunology* will require, as a condition of consideration for publication, that all clinical trials be registered in a public trials registry (for example, at www.clinicaltrials.gov). Trials must register at or before the onset of patient enrollment. For more information, see www.icmje.org and go to Section III.J.

Data Sharing

Parasite Immunology supports the efforts to encourage open sharing of publication-related data. *Parasite Immunology* adheres to the beliefs that authors should include in their publications the data, algorithms, or other information that is central or integral to the publication or make it freely and readily accessible; use public repositories for data whenever possible; and make patented material available under a license for research use. For more information, see the NAS website: <http://books.nap.edu/books/0309088593/html/1.html>

Distribution of Reagents

The Editors of *Parasite Immunology* have adopted the policy that any readily renewable resources mentioned in a journal article not already obtainable from commercial sources shall be made available to all qualified investigators in the field. The policy stems from the long-standing scientific principle that authenticity requires reproducibility. Publication in *Parasite Immunology* constitutes *ade facto* acceptance of this policy. Included are reagents that can be easily provided; specifically, nucleic acid sequences, cDNA and genomic clones, cell lines, and monoclonal antibody clones. Small amounts (sufficient for the replication of any *in vitro* work reported) of novel protein reagents are also considered easily transferable.

Although the Editors appreciate that many of the reagents mentioned in *Parasite Immunology* are proprietary or unique, neither condition is considered adequate grounds for deviation from this policy. Suitable material transfer agreements can be drawn up between the provider and requester, but if a

reasonable request is turned down and submitted to the Editor-in-Chief, the corresponding author will be held accountable. The consequence for noncompliance is simple: the corresponding author will not publish in *Parasite Immunology* for the following three years.

Disclosures and Conflict Interest

Authors are required to disclose financial interests in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must complete and sign the Conflict of Interests Form. The completed form must be returned to the editorial office. A competing interest exists when a primary interest (such as patients' welfare or the validity of research) might be influenced by a secondary interest (such as financial gain or personal rivalry). It may arise for the authors of a *Parasite Immunology* article when they have a financial interest that may influence their interpretation of their results or those of others.

Financial interests are the easiest to define and they have the greatest potential to influence the objectivity, integrity or perceived value of a publication. They may include any or all, but are not limited to, the following:

- **Personal financial interests:** Stocks or shares in companies that may gain or lose financially through publication; consultant fees or fees from speakers bureaus other forms of remuneration from organisations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication.
 - **Funding:** Research support from organisations that might gain or lose financially through publication of the paper.
 - **Employment:** Recent, present or anticipated employment of you or a family member by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper. Any such competing interest that authors may have should be declared. The aim of the statement is not to eradicate competing interests, as they are almost inevitable. Papers will not be rejected because there is a competing interest, but a declaration on whether or not there are competing interests will be added to the paper.
 - **Patent rights**
 - **Consultancy work.** All authors must disclose competing interests, or state "none" via the Journal's ScholarOne Manuscripts website.
- All sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred. Examples:
- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
 - This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
 - This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.
- For papers where there are no competing interests, all authors must include the statement 'Competing

interests: the authors have no competing interests.' We will also ask reviewers to provide a statement of competing interests.

Copyright and OnlineOpen

Authors of all accepted manuscripts are required to license copyright in their paper to Wiley-Blackwell.

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. Click here for the full list of terms and conditions.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Papers are accepted on the understanding that they have not been and will not be published elsewhere.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Citing Accepted Articles

To include the Digital Object Identifier (DOI) in a citation to an article, simply append it to the reference as in the following example:

Choi, B and Kropf, P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarisation *ex vivo* and *in vitro*. *Parasite Immunol*; DOI: 10.1111/j.1365-3024.2008.01094.x

To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/ " as per the following example:

DOI 10.1111/pim.12023, becomes [http://dx.doi.org/ 10.1111/pim.12023](http://dx.doi.org/10.1111/pim.12023)

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: Adobe Reader Download. This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be

posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Author Services

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit Author Services for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form, which accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is more if the order form arrives too late for the main print run. Offprints are normally dispatched within three weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the following if offprints do not arrive: C.O.S. Printers Pte Ltd., 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; Email: offprint@cosprinters.com. However, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to six weeks to arrive. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.

Woods Hole Immuno-Parasitology Prize

Parasite Immunology awards a prize for the best paper published each year by an early-stage investigator. An early-stage investigator is either a student (undergraduate, Masters or PhD level) or a research fellow with no more than three years of post-doctoral research experience, who is the first author of the paper. The prize winner will receive £500 to cover the cost of registering for the annual Woods Hole Immuno-Parasitology meeting and will also have the opportunity to present their paper at this meeting. On submission of your manuscript you will be asked to indicate whether the first author of your paper qualifies for consideration for the Prize.

Immunity, Inflammation and Disease

Parasite Immunology collaborates with Wiley's open access journal *Immunity, Inflammation and Disease* to enable rapid publication of good quality research that we are unable to accept for publication in *Parasite Immunology*. Authors will be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of *Immunity, Inflammation and Disease*. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. The Editor

of *Immunity, Inflammation and Disease* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. *Immunity, Inflammation and Disease* is a Wiley Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to www.immunityinflammationdisease.com.

ANEXO D: Comprovante eletrônico de submissão do artigo 1 à revista Parasite Immunology

Submission Confirmation		 Print
Thank you for your submission		
Submitted to Parasite Immunology		
Manuscript ID PIM-2015-0138		
Title IL-5, IL-6, TGF- β and eosinophil, but not IL-17, are improved by breastfeeding in <i>Schistosoma mansoni</i> -infected mice		
Authors Silva, Fabiana FERNANDES, ERICA Holanda, Gabriela Silva, Roekson Carlos SILVA, MARIA DA CONCEIÇÃO COUTINHO, ERIDAN DE MEDEIROS Montenegro, Silvia Morais, Clarice Souza, Valdenia		
Date Submitted 08-Dec-2015		

ANEXO E: Normas para publicação da revista *Parasitology*.

CAMBRIDGE

Instructions for Authors

Parasitology

Scope

Parasitology publishes original papers on pure and applied parasitology, including biochemistry, molecular biology, immunology, genetics, physiology, epidemiology, ecology, vaccine and drug studies, and the control of parasitic infections, the application of new techniques, advances in the understanding of host-parasite relationships, theoretical studies and **major** systematic revisions. There is no minimum or maximum length for a paper but all manuscripts, including short ones, must be prepared in the standard format for this journal and any manuscript that is excessively long will be returned for shortening.

Editorial Process

All manuscripts submitted to *Parasitology* are received by the Editor-in-Chief, Professor Stephen Phillips, who will make a first assessment of their suitability for the journal. At this stage a very small number of submissions are immediately rejected. Thereafter the manuscripts deemed appropriate for the journal are passed to the one of the Editors or retained by the E-in-C, to be then sent out to external reviewers for comment and advice. The referees are often members of the Editorial Board and their names and expertise are published on the *Parasitology* website. (The names of all of the Referees used each year are published in the journal.) The Editor detailed to process a manuscript will make the final decision although he or she might ask for advice from another Editor. An Editor who submits a manuscript to the journal takes no part in the refereeing process and has no access to the names of the referees involved.

Manuscripts are submitted electronically to *Parasitology*, allowing authors to benefit from faster review and quicker online publication. Authors should submit their manuscripts online to <http://mc.manuscriptcentral.com/par>. All enquiries should be directed to the Editorial Office at parasitology@cambridge.org.

Authors must follow these *Instructions for Authors* and should refer to a recent issue of *Parasitology* for the correct style. Authors of **Reviews** must follow these instructions with major headings in UPPER CASE and secondary headings in lower case *italics*.

The preferred word processing packages are Word or WordPerfect in either PC or Macintosh format.

Submission of a manuscript implies that it has been approved **in its final form** by all the named authors, that it reports on unpublished work and that it has not been published or submitted for publication, in whole or in part, elsewhere. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that these conditions are fulfilled. Authors of articles published in the journal assign copyright to Cambridge University Press (with certain rights reserved), and a copyright assignment form must be completed on acceptance of the paper. On acceptance the corresponding author will be asked to supply a final version of the manuscript. Once a proof has been returned only minor changes will be allowed. **Authors should be aware that large numbers of changes may lead to the paper being returned to reviewers for approval, delaying publication, in addition to incurring costs associated with making the changes.**

Manuscript Format

Please note that failure to follow the Instructions for Authors will almost certainly result in the manuscript being returned to the author for correct formatting before it is sent out to the referees and hence there will be an unavoidable delay in the processing of your manuscript.

The manuscript should be organized as follows:

1. **TITLE PAGE.** The title page should contain (i) a concise and informative full title, (ii) the initials and name(s) of the authors and family names, (iii) the full postal address(es) of the institution(s) where the work was carried out, (iv) a short informative running title and (v) the name and address, telephone and fax numbers, and E-mail address of the corresponding author. Footnotes containing other addresses may be included. **Nothing else should appear on the title page.**

2. **SUMMARY.** This should not be more than about 150-200 words and its purpose is to summarize the main aims, results and conclusions in such a way that they could be understood by any interested reader and not only experts in the subject, and could be used by an abstracting journal. References to published or unpublished work and unnecessary abbreviations should be avoided. Appended to the Summary should be 3-10 relevant **key words**, suitable for indexing. **Nothing else should appear on the Summary page.**

3. **KEY FINDINGS** (only necessary for original articles not special issue articles). Distil the key results and/or conclusions of the study into 3 to 5 short bullet points of less than 90 characters each. These key points will give the editor and referees an immediate overview of the paper and an insight into the importance of your findings.

4. **INTRODUCTION.** This should be as short as possible, normally not more than 2-3 paragraphs, and should simply serve to introduce the reader to the purpose and significance of the work described. It should neither be a mini-review nor should it be so bland as to be uninformative. When making general statements, reference should be made to recent reviews, and specific references should be cited only if they are particularly relevant.

5. **MATERIALS AND METHODS.** Sufficient information for the reader to be able to repeat the work must be given, but techniques described in detail in other publications need not be repeated, provided that an adequate reference is cited. Major modifications to methods should be clearly described. The numbers of experiments, replicates, etc. and any statistical tests used should be stated.

The full binomial name should be given for all organisms, except those such as mice, rats and rabbits, commonly used in laboratories and domesticated animals such as cows, dogs and cats. Generic names should be given in full when first mentioned and subsequently if any confusion is likely to arise. If reference is made to an uncommon taxon the authority for the taxon and date should be stated.

Abbreviations such as *An.* (for *Anopheles*) should be avoided unless absolutely essential, for example when referring to two or more generic names beginning with the same letter. Authors should follow *International Rules for Nomenclature* and, if new names are introduced, the *International Code for Zoological Nomenclature*. All strains and sources of hosts and parasites should be stated. Abbreviations should be used sparingly and unambiguously. SI units should be used wherever appropriate and other standard statistical, chemical, biochemical and molecular abbreviations may also be used. In case of any doubt, authors are advised to spell out the term in full, followed by the abbreviation in parenthesis, when it is first used.

6. RESULTS. These should be confined to a factual account of the actual results obtained. Where necessary results should be analysed using an appropriate statistical test. Discussion and reference to other work should be left to the Discussion.

- (i) *Tables*. Each table, headed by a self-explanatory title, must be double spaced on a separate page and numbered consecutively. Rules, particularly vertical ones, should be avoided. Each table should be referred to consecutively as Table 1 etc in the text. The use of bold and italic text should be avoided unless absolutely necessary.
- (ii) *Figures*. These may be line drawings or photographs and all should be referred to consecutively in the text as Fig. 1 etc. Component parts of figures should be labelled A, B, C etc. Legends for figures should be self-explanatory and must not contain details of results.

Line drawings should not be larger than **twice** the final size and in no circumstances should exceed 170 x 250 mm. Line drawings should be as simple as possible, lines should be bold enough to stand reduction to about 0.25-0.35 mm. Preferred symbols are open and filled circles, squares and triangles, and these should be used consistently. Lettering should be kept to a minimum and should be self-explanatory and unambiguous and of sufficiently high quality and size to be clearly visible after reduction to final size.

Photographs should be the same size as they will appear in the journal and should be selected to fit neatly into one column (80 mm) or two columns (166 mm). Photographs should be labelled and numbered as for line drawings. For microscopical preparations, scale bars with appropriate units (e.g. 50µm) must be provided; statements of magnification are not acceptable.

Colour figures may be accepted provided that they are of a very high quality and scientifically necessary. The final decision for use of colour will be at the discretion of the Editors. Charges of £200 per page may apply. If colour figures are accepted, but are not deemed to be necessary for the print version, or funds are not available, we are able to publish articles in colour for the online version of the journal. In these instances two versions of the figures should be submitted (i.e., one set in colour and one set in black and white), ensuring that the figure legends provided are able to accurately describe the qualities of both.

7. DISCUSSION. The results (including further reference to figures and tables) should neither be repeated in detail nor should new information be introduced. Speculation is encouraged but should not go beyond reasonable and testable hypotheses. The Discussion should not attempt to be a mini-review.

8. ACKNOWLEDGEMENTS. You may acknowledge individuals or organisations that provided advice, support (non-financial). Formal financial support and funding should be listed in the following section.

9. FINANCIAL SUPPORT. Please provide details of the sources of financial support for all authors, including grant numbers. For example, "This work was supported by the Medical research Council (grant number XXXXXX)". Multiple grant numbers should be separated by a comma and space, and where research was funded by more than one agency the different agencies should be separated by a semi-colon, with "and" before the final funder. Grants held by different authors should be identified as belonging to individual authors by the authors' initials. For example, "This work was supported by the Wellcome Trust (A.B., grant numbers XXXX, YYYY), (C.D., grant number ZZZZ); the Natural Environment Research Council (E.F., grant number FFFF); and the National Institutes of Health (A.B., grant number GGGG), (E.F., grant number HHHH). Where no specific funding has been provided for research, please provide the following statement "This research received no specific grant from any funding agency, commercial or not-for-profit sectors."

10. REFERENCES. It is **essential** that the appropriate reference format for *Parasitology* is adhered to precisely.

Where using reference management software Endnote, please note that Endnote version 7 is compatible with this journal's formatting.

(i) *References in the text.*

References should be kept to an essential minimum. Only references to published work or work actually 'in Press' are permitted. Reference to unpublished work is acceptable but only as either 'unpublished results' or 'personal communication' and under no circumstances should references to unpublished work, work in preparation or un-refereed abstracts be included in the Reference List. Lists of text references should be arranged in ascending date order and then alphabetically, please note the first line of references is no longer indented.

e.g.:

Brown and Green, 1961; Black, 1995, 2011; Brown, 1995; Brown *et al.* 2001, 2002a,b, 2010

For papers with more than two authors *et al.* should be used. Brown, A. *et al.* (1992a)

When authors are not directly referred to the reference should be in parentheses as follows: All currently known COI sequences of *G. salaris* from rainbow trout (Hansen *et al.* 2003; Meinilä *et al.* 2004) are haplotype F.

(ii) *List of References*

References, **which must be double spaced and listed alphabetically**, should begin on a separate page following the Discussion and Acknowledgements. The accuracy and appropriateness of the references are solely the responsibility of the author and are not checked in the editorial office.

The format required by this journal is given below and, if in any doubt, authors should refer to a recent copy of the journal. Please note that the names of **all** authors should be given in **bold** font and that the journal name should be *italicized* and given **in full**, not abbreviated. Where known, the article Digital Object Identifier (doi) should be included, at the end of the entry (see example below).

Journal References

Higgs, S., Snow, K. and Gould, E. A. (2003). The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**, 82-87. doi: 10.1016/S0035-9203(03)00004-X.

Books

Smyth, J. D. (1994). *Introduction to Animal Parasitology*, 3rd Edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Chapters in Books

Grenfell, B. T., Dietz, K. and Roberts, M. G. (1995). Modelling the immuno-epidemiology of macroparasites in naturally-fluctuating host populations. In *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations* (ed. Grenfell, B. T. and Dobson, A. P.), pp. 362-383. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

WHO publications

World Health Organization (1995). *Onchocerciasis and its Control*. WHO Technical Report Series No. 852. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

When referencing Parasitology Supplements

Jenkins, D. J. and MacPherson, C. N. L. (2003). Transmission ecology of *Echinococcus* in wild-life in Australia and Africa. *Parasitology* **127** (Suppl.), S63-S72. doi: 10.1017/S0031182003003871.

11. REVIEWS AND SPECIAL ISSUES: The headings for papers should be as follows:

- Title page as described above
- Summary (and key words)
- Introduction
- Additional headings and sub-headings as appropriate to each paper
- Discussion
- Conclusions/Future directions
- Acknowledgements
- Financial support
- References

Headings (not in bold) are formatted as follows: primary - UPPER CASE; secondary sub-heading - lower case *italics* on separate line; tertiary sub-heading - lower case *italics* running on

12. ETHICAL AND REGULATORY GUIDELINES: policy on animal (vertebrates and higher invertebrates) use:

The authors must demonstrate the experimental procedures employed conform to the accepted principles of animal welfare in experimental science. The principles defined and explained in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes and its appendix and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals should be followed. A statement acknowledging conformation to these standards and that the authors have involved the minimum number of animals to produce statistically reproducible results must be included in the covering letter to the Editor-in-Chief as well as in the 'Materials and Methods' section of the manuscript. If experimental methodology raises particular ethical or welfare concerns then the Editor will take additional guidance from Animals (Scientific Procedures) Act 1986, when making decisions. The Editor's decision with regard to ethics will be final.

On Acceptance

On acceptance to the journal the final version of the manuscript containing the following should be submitted: *Title Page, Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure legends.*

In particular, each table should occupy a separate page.

Please ensure that your figures are submitted separately **at final publication size** (one column, 80mm) or two-column (166 mm) and are in the recommended file formats. Following these guidelines will result in high quality images being reproduced in both the print and the online versions of the journal. Please do not submit the final versions of figures in MS WORD, .jpeg or Powerpoint (.ppt) format.

Line artwork

Format: .tif or .eps

Colour mode: black and white (also known as 1-bit) Resolution: 1000 dpi

Combination artwork (line/tone)

Format: .tif or .eps

Colour mode: greyscale (also known as 8-bit) Resolution: 600 dpi

Black and white halftone artwork

Format: .tif

Colour mode: greyscale (also known as 8-bit)

Resolution: 300 dpi

Colour halftone artwork

Format: .tif

Colour mode: CMYK colour

Resolution: 300 dpi

For further information, please refer to the Cambridge Journals Artwork Guide, which can be found online at <http://journals.cambridge.org/artworkguide>.

Open Access

Under the conditions detailed on the Journal's standard transfer of copyright form, when an article is accepted, its authors are free to post their version of the accepted manuscript on a website or repository. As such, the Journal is compliant with the 'Open Access' mandates of the vast majority of academic institutions and funding sources.

Authors also have the option to publish their paper under a fully 'Open Access' agreement, upon the payment of a one-off 'Article Processing Charge' of £1,695/\$2,700.

In this case, the final published 'Version of Record' shall be made freely available to all, in perpetuity, and will be published under a creative commons licence, enabling its free re-use and re- distribution for non-commercial means. Click here for the paid option Open Access transfer of copyright form. The corresponding author will be able to choose between standard publication and publication under the 'Open Access' agreement once their paper has been accepted.

Proofs

Page proofs will be forwarded as PDF files by E-mail to the corresponding author. It is the responsibility of the author to ensure that no errors are present. **Only essential corrections should be made and authors will be charged for excessive alterations at the proof stage.** If corrections are deemed to be substantial **the paper will be rejected** and the author asked to resubmit their work for peer review.

Author Language Services

Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

(Revised 17/03/2014)

ANEXO F: Comprovante eletrônico de submissão do artigo 2 à revista Parasitology.

Dear Professor/Dr Leticia:

A manuscript titled Breastfeeding by *Schistosoma mansoni* infected improves IL-5 and TGF- β in the IL-12p40 deficient mice, but impair the IL-6 production (PAR-2014-0234) has been submitted by Dr. Valdênia Souza to Parasitology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/par>

USER ID: fabileticial@hotmail.com

PASSWORD:

To enter your account, please do the following:

1. Go to: <http://mc.manuscriptcentral.com/par>
2. Log in using this information:

Your USER ID is fabileticial@hotmail.com

Your case-sensitive PASSWORD is wttnx52f

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. This password is case-sensitive and temporary. Please log in to <http://mc.manuscriptcentral.com/par> to update your account information and change your password.

Thank you for your participation.

Sincerely,

Parasitology Editorial Office