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

SUPRESSÃO DA RESPOSTA IMUNE ANTI-OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS: PARTICIPAÇÃO DA IL-10 E DOS LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS (Tregs)

PATRÍCIA D`EMERY ALVES SANTOS

RECIFE - PE
2013

PATRÍCIA D`EMERY ALVES SANTOS

SUPRESSÃO DA RESPOSTA IMUNE ANTI-OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS: PARTICIPAÇÃO DA IL-10 E DOS LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS (Tregs)

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

Orientadora: Prof[a]. Dra[a]. Valdênia Maria Oliveira de Souza

RECIFE - PE

2013

Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Adelaide Lima - CRB4-647

S237s Santos, Patrícia d'Emery Alves.
Supressão da resposta imune anti-ovalbumina em camundongos descendentes de mães esquistossomóticas: participação da IL-10 e dos linfócitos T regulatórios (Tregs) / Patrícia d'Emery Alves Santos. – Recife: O autor, 2013.
222 f.: il.; gráf.; 30 cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Esquistossomose. 2. Amamentação. 3. Gestação. 4. Imunomodulação. 5. Ovalbumina. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de. (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-025)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL

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 de Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

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 de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vlaudia Maria Assis Costa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)
[1]

Relatório da Banca Examinadora daTese da Doutoranda

Patrícia d'Emery Alves Santos

No dia 30 de janeiro de 2013, às 9h00, na Sala Prof. Murillo La Grecca, situada no 3° andar do Centro de Ciências da Saúde (CCS-UFPE) os Membros Doutores: **Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa (UFPE), Drª. Silvia Maria Lucena Montenegro (CPq/AM-FIOCRUZ), Drª Virgínia Maria Barros de Lorena (CPq/AM-FIOCRUZ), Drª. Clarice Neuenschwander Lins de Morais (CPq/AM-FIOCRUZ) e Drª. Lígia de Almeida Paiva Costa(UFRJ)** componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a doutoranda **Patrícia d'Emery Alves Santos** sobre a sua Tese de Doutorado intitulada ***"Supressão da resposta imune anti-ovalbumina em camundongos descendentes de mães esquistossomóticas: participação da IL-10 e dos Linfócitos T regulatórios (Tregs)"***, 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.
Drª. Silvia Maria Lucena Montenegro	APROVADA
Drª Virgínia Maria Barros de Lorena	APROVADA.
Drª Clarice Neuenschwander Lins de Morais	Aprovada
Drª Lígia de Almeida Paiva Costa	Aprovada

[1] Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: http://www.ufpe.br/ppgmedtrop

DEDICO

À memória de Livinha.

Amiga, guerreira, esperançosa e feliz mesmo em todos os momentos que a vida lhe mostrava o contrário.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder sabedoria, disposição e paciência. À Santa Rita de Cássia, sempre recorrida.

A Painho, Mainha, Breno e Tati, por essa estrutura familiar sólida. Tudo fica mais fácil quando se vive em um ambiente acolhedor, com todos dispostos a ajudar e torcendo por suas conquistas.

À minha orientadora Valdênia, meus mais sinceros agradecimentos, por me proporcionar um dos melhores crescimentos pessoais, o conhecimento.

À profa. Elizabeth Malagueño, não tão presente fisicamente no meu Doutorado, mas a iniciadora de todo esse processo.

À Rafaela e Érica, pela ajuda inestimável. Presentes em todos os experimentos, dedicadas aos nossos camundongos, com certeza sem as duas tudo seria mais difícil.

À Cássia, Gabriela e Conceição, por facilitarem bastante minha vida com todo suporte necessário no laboratório.

À Vírginia, pela ajuda em todas as análises de citometria e pelos esclarecimentos em muitos questionamentos surgidos ao longo do trabalho.

A todos do setor de Imunologia do LIKA: às professoras Valdênia, Vlaudia e Mônica, e a todos os estagiários Rafaela, Érica, Cássia, Gabriela, Conceição, Wherverton, Roeckson e André.

A todos do biotério do CPqAM: as veterinárias Giuliana e Gerlane, a Laurimar, Eduardo e Rodrigo, por todos os cuidados com meus animais.

Aos amigos e colegas do Doutorado e aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.

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

Arthur Schopenhauer

RESUMO

SANTOS, Patrícia d`Emery Alves. Supressão da resposta imune anti-ovalbumina em camundongos descendentes de mães esquistossomóticas: participação da IL-10 e dos linfócitos T regulatórios (Tregs). 222 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco.

RESUMO Camundongos descendentes de mães esquistossomóticas apresentam, na vida adulta, alterações na resposta imune para o antígeno heterólogo, ovalbumina (OVA). A prévia amamentação em mães esquistossomóticas induziu aumento na produção de anticorpos anti-OVA, enquanto a gestação levou à diminuição. Aqui analisamos nos descendentes de mães esquistossomóticas: a influência da IL-10 na supressão dos anticorpos e a expressão de moléculas co-estimulatórias em resposta à OVA nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Além disso, analisamos nestes descendentes após a infecção ou administração i.p. de antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA), a presença de células T regulatórias (Tregs) e a intensidade da supressão ou potencialização anti-OVA. Camundongos machos formaram quatro grupos: animais nascidos de mães infectadas e amamentados em mães não-infectadas (MI), animais de mães não-infectadas e amamentados em mães infectadas (AI), animais nascidos/amamentados em mães infectadas (MIAI) e nascidos/amamentados em mães não-infectadas (Controle). Parte destes animais foi depletada da ação da IL-10. Em outra parte, após a imunização com OVA+adjuvante realizou-se a dupla marcação para APCs (CD45R/B220 ou CD11c e CD80/CD86/CD40/HLA-DR), e nas infecções pós-natais, para Tregs (Foxp3). Foi observado que a IL-10 esteve comprometida com a supressão de anticorpos nos camundongos do grupo MI ($p<0,05$) e a frequência de células CD11c+/CD86+ ($p<0,05$) e células B CD40+/CD80+/CD86+ ($p<0,01/p<0,01/p<0,05$) foi drasticamente reduzida. Enquanto no grupo AI, ocorreu um aumento na frequência de células B CD40+/CD80+ ($p<0,001/p<0,05$) tão logo a imunização com OVA, sem nenhuma alteração nas células CD11c+. Após infecção dos descendentes ou contato com SEA, todos os grupos infectados apresentaram supressão nas reações de hipersensibilidade imediatas anti-OVA ($p<0,05$), sendo mais intensa no grupo AI. Neste último, observou-se alta frequência de Tregs ($p<0,05$). Foi observada alta produção de IL-4 e IL-10 e baixos níveis de IFN-γ nos grupos infectados em comparação ao controle sem infecção ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças na produção de IgG1 e IgG2a anti-OVA entre os grupos. Então, a prévia amamentação em mães esquistossomóticas resulta em melhor apresentação antigênica pelas células B nos descendentes adultos, enquanto a gestação prejudica. As infecções pós-natais restauram a imunidade humoral anti-OVA, em descendentes nascidos ou amamentados em mães infectadas, e induzem um potencial imunossupressor nos camundongos previamente amamentados em mães infectadas.

Palavras-chave: Esquistossomose Materna; Amamentação; Gestação; Imunomodulação; Antígeno Heterólogo; Descendente Adulto.

ABSTRACT

SANTOS, Patrícia d`Emery Alves. Anti-ovalbumin immune response suppression in offspring mice of schistosomotic mothers: IL-10 and regulatory T cells (Tregs) role. 222 s. Doctoral Thesis, Federal University of Pernambuco - Health Sciences Center. Tropical Medicine Post-Graduation Program. Recife. Pernambuco.

ABSTRACT Offspring mice of schistosomotic mothers present, in adult life, immune response changes for ovalbumin (OA), a heterologous antigen. Previous suckling in schistosomotic mothers induced a higher production of anti-OA antibodies, while pregnancy impaired it. This study analyzes, in offspring of schistosomotic mothers, the IL-10 influence on antibody suppression and the costimulatory molecules expression in response to OA in antigen-presenting cells (APCs). Moreover, following infection or i.p. administration of *S. mansoni* soluble egg antigens (SEA), the presence of regulatory T cells (Tregs) in this offspring is analyzed. Male mice formed four groups: animals Born from Infected Mothers and suckled by non-infected mothers (BIM), animals from non-infected mothers and Suckled by Infected Mothers (SIM), animals Born/Suckled by Infected Mothers (BSIM), and born/suckled by non-infected mothers (Control). Part of these animals was depleted from the IL-10 action. Another part, following immunization with OA+adjuvant, a double labeling was performed for APCs (CD45R/B220 or CD11c plus CD80/CD86/CD40/HLA-DR), and in the postnatal infections, for Tregs (Foxp3). It was observed that IL-10 was compromised by the antibody suppression in the mice from BIM group ($p<0.05$) and the frequency of CD11c+/CD86+ cells ($p<0.05$) and B CD40+/CD80+/CD86+ cells ($p<0.01/p<0.01/p<0.05$) was drastically reduced. While in the SIM group, there was an increase in the frequency of B CD40+/CD80+ cells ($p<0.001/p<0.05$) as soon as OA immunization, without any change in CD11c+ cells. After *S. mansoni* infection or contact with SEA, all infected groups presented suppression in anti-OA immediate hypersensitivity reactions ($p<0.05$), was more pronounced in the SIM group. In the latter, it was observed a high frequency of Tregs ($p<0.05$). It was observed a high production of IL-4 and IL-10 and low levels of IFN-γ in the infected groups compared with the control group without infection ($p<0.05$). It was not observed differences among the groups regarding the production of anti-OA IgG1 and IgG2a. Therefore, previous suckling by schistosomotic mothers implies in better antigenic presentation by B cells in the adult offspring, while pregnancy impairs such presentation. Postnatal infections restore OA-specific humoral immune response in the born or suckled offspring of infected mothers and also induce an immunosuppressive potential in previously suckled mice by infected mothers.

Keywords: Maternal schistosomiasis; Suckling; Pregnancy; Immunomodulation; Heterologous Antigen; Adult Offspring.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1. Formação dos grupos de estudo e operacionalização 41

Esquema 2. Experimentos com bloqueio *in vivo* da IL-10 42

Esquema 3. Experimentos para marcação das APCs 43

Esquema 4. Experimentos para exposição aos antígenos parasitários e marcação das Tregs 44

ARTIGO 1

Figura 1. Seleção da janela de interesse para análise da expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs mielóides (CD11c+) e nos linfócitos B (CD45/B220+) 77

Figura 2. Expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 nas APCs mielóides (CD11c+) em descendentes adultos de mães esquistossomóticas 78

Figura 3. Frequência de células CD45/B220+ expressando CD80, CD86 e CD40 nas células esplênicas de camundongos nascidos (MI+OVA) ou amamentados (AI+OVA) em mães infectadas pelo *S. mansoni* 79

ARTIGO 2

Figura 1 - Reações de hipersensibilidade à OVA. Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B) e imunizados s.c. com OVA+CFA 109

Figura 2 - Níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA nos plasmas. Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A e C) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B e D) e imunizados s.c. com

OVA+CFA 110

Figura 3 - Níveis de IL-4 secretados pelas células esplênicas. Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B) e imunizados s.c. com OVA+CFA 111

Figura 4 - Níveis de IL-10 secretados pelas células esplênicas. Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B) e imunizados s.c. com OVA+CFA 112

Figura 5 - Níveis de IFN-γ secretados pelas células esplênicas. Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B) e imunizados s.c. com OVA+CFA 113

Figura 6 - Frequência de células esplênicas CD4+ expressando FoxP3+. Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B) e imunizados s.c. com OVA+CFA 114

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS FÍGADOS

Figura 1. Análise histomorfométrica de granulomas hepáticos em animais nascidos-MI (A), amamentados-AI (B) ou nascidos/amamentados-MIAI (C) em mães esquistossomóticas, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*, em comparação a camundongos infectados nascidos/amamentados em mães não-infectadas-Controle (D) 116

LISTA DE TABELAS

TRATAMENTO ANTI-IL-10

Tabela 1. Efeito do tratamento *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-IL-10 na produção de IgG1 e IgG2a OVA-específicas e nas reações de hipersensibilidade (RH) em camundongos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* 56

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS FÍGADOS

Tabela 2. Quantidade de ovos/g de fezes, número e tamanho dos granulomas hepáticos e deposição de colágeno observados em camundongos nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	"Antigen Presenting Cells" (Células apresentadoras de antígenos)
CD	"Cluster of Differentiation" (Grupo de diferenciação)
CFA	"Complete Freund`s Adjuvant" (Adjuvante completo de Freund)
Cepa SLM	Cepa São Lourenço da Mata
Con-A	Concanavalina A
DCs	"Dendritic Cells" (Células dendríticas)
FoxP3	"Forkhead box P3"
Grupo AI	Animais amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*
Grupo MI	Animais nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni*
Grupo MIAI	Animais nascidos/amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*
Grupo Controle	Animais nascidos/amamentados em mães não-infectadas
IFN-γ	Interferon γ
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
MHC	"Major Histocompatibility Complex" (Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal)
OVA	Ovalbumina
RH	Reações de hipersensibilidade
S. mansoni	*Schistosoma mansoni*
SEA	"Soluble Egg Antigen" (Antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni*)
TCR	"T Cell Receptors" (Receptores de células T)
Th	Linfócitos T "helper" (auxiliares)
Th1	Linfócitos T "helper" tipo 1
Th2	Linfócitos T "helper" tipo 2
Th17	Linfócitos T "helper" tipo 17
Tregs	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 APRESENTAÇÃO 17

2 REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1 ESQUISTOSSOMOSE 21

2.2 IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE 23

2.3 RELAÇÃO MATERNO-FETAL E A ESQUISTOSSOMOSE 27

2.4 ESQUISTOSSOMOSE MATERNA E A IMUNIDADE DOS DESCENDENTES A ANTÍGENOS HETERÓLOGOS 30

3 OBJETIVOS 35

3.1 OBJETIVO GERAL 36

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 36

4 MATERIAIS E MÉTODOS 38

4.1 DESENHO DO ESTUDO 39

4.2 LOCAL DO ESTUDO 39

4.3 ANIMAIS 40

4.4 OPERACIONALIZAÇÃO E GRUPOS DE ESTUDO 40

4.5 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS 44

4.5.1 Variável Independente 44

4.5.2 Variável Dependente 45

4.6 PARASITOLÓGICO DE FEZES 45

4.7 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTO 46

4.8 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVOS DE *S. mansoni*

(SEA) 46

4.9 IMUNIZAÇÕES E INFECÇÃO 47

4.10 DEPLEÇÃO *IN VIVO* DA CITOCINA IL-10 48

4.11 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE 48

4.12 SANGRIA TOTAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA 49

4.13 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS 49

4.14 CULTURA CELULAR PARA DOSAGEM DE CITOCINAS 50

4.15 DOSAGEM DE CITOCINAS 51

4.16 MARCAÇÃO PARA ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO 52

4.17 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO 52

4.18 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 53

4.19 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 54

5 RESULTADOS 55

5.1 TRATAMENTO ANTI-IL-10 56

5.2 ARTIGO 1

ESQUISTOSSOMOSE MATERNA ALTERA A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS EM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS DOS SEUS DESCENDENTES NA VIDA ADULTA 57

5.3 ARTIGO 2

A INFECÇÃO PÓS-NATAL INTENSIFICA A IMUNOMODULAÇÃO NEGATIVA PARA ANTÍGENO NÃO-RELACIONADO EM DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS 80

5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS FÍGADOS 115

6 CONCLUSÕES DA TESE 118

7 PERSPECTIVAS 121

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE 123

APÊNDICES

APÊNDICE A - VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS 135

APÊNDICE B - VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS 156

APÊNDICE C - Marcação de células F4/80+ (macrófagos) e moléculas CD86, CD80 e CD40 em descendentes adultos de mães esquistossomóticas 190

APÊNDICE D - Marcadores de atividade celular nas APCs logo após desmame . 191

APÊNDICE E - Relação Tregs:CD4+ nos grupos infectados ou administrados com SEA 193

ANEXOS

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ 195

ANEXO B - Santos et al., 2010. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice 196

ANEXO C - Normas para publicação no Memórias do Instituto Oswaldo Cruz ... 204

ANEXO D - Comprovante eletrônico de submissão (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz) 208

ANEXO E - Normas para publicação no International Journal for Parasitology ... 209

ANEXO F - Comprovante eletrônico de submissão (International Journal for Parasitology) 222

1 APRESENTAÇÃO

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* é caracterizada por uma doença de curso crônico associada à formação do granuloma, reação inflamatória e fibrótica ao redor dos ovos que ficam retidos nos tecidos (GRYSEELS et al., 2006). Durante a infecção, ocorre uma forte e predominante resposta imune tipo Th2, gerada em resposta aos antígenos dos ovos, com produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que modula negativamente a resposta inicial Th1 (IFN-γ, TNF-α e ativação de macrófagos) desenvolvida principalmente contra os antígenos cercarianos (PEARCE et al., 1991; VELLA; PEARCE, 1992; ABATH et al., 2006). Devido à produção de IL-10, citocina imunossupressora, o perfil de resposta Th2 foi associado com proteção e geração da cronicidade das infecções esquistossomóticas por controlar a resposta granulomatosa ao redor dos ovos (FINKELMAN et al., 1991; MOORE et al., 2001).

McKee e Pearce (2004) demonstraram que outro subtipo de células T CD4+, os linfócitos T regulatórios (Tregs), secretores de grande quantidade de IL-10, participavam da imunomodulação presente na esquistossomose. Contudo, alguns estudos não evidenciaram a essencial participação da IL-10, produzida por células Tregs sob estímulo de antígenos de ovos, nesta imunomodulação (TAYLOR; MOHRS; PEARCE, 2006), sugerindo a participação de outros mecanismos para o controle das respostas Th1 e Th2 pelas Tregs na esquistossomose.

Em áreas onde a esquistossomose é endêmica, é comum observar gestantes cronicamente infectadas pelo *S. mansoni*. Ocorre transferência de anticorpos maternos parasita-específicos (LENZI et al., 1987) e antígenos de *S. mansoni* (HASSAN et al., 1997; ATTALLAH et al., 2003) através da placenta e pelo leite. A exposição a esses anticorpos e antígenos, durante o período pré-natal ou a amamentação, está associada com a modulação da resposta imune dos descendentes para antígenos homólogos (HANG; BOROS; WARREN, 1974; MONTESANO et al., 1999). Há relatos de uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni* em camundongos nascidos de mães esquistossomóticas

maciçamente infectadas (LENZI et al., 1987; ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010).

Com relação à imunomodulação da resposta dos descendentes de mães infectadas aos antígenos heterólogos, ainda são poucos os estudos realizados. Estudo desenvolvido com a espécie *Schistosoma haematobium* demonstra que a infecção materna por este trematódeo durante a gravidez sensibiliza aproximadamente 50% dos recém-nascidos *in utero*, e que esta imunidade pré-natal persiste na criança com diminuição da eficácia da vacinação ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin) e da produção de IFN-γ (MALHOTRA et al., 1999).

Em estudos anteriores, demonstramos que mães esquistossomóticas podem alterar, durante a gravidez ou a amamentação, a resposta imune dos seus filhos contra o antígeno heterólogo ovalbumina (OVA), na vida adulta. Com relação ao efeito da gestação, camundongos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* adquiriram um potencial supressivo, caracterizado pela alta produção de IL-10 e supressão da resposta humoral anti-OVA. Do contrário, animais amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram potencialização na produção de anticorpos e da citocina IL-2, sem produção de IL-10 (SANTOS et al., 2010).

Como a maioria das vacinas atua justamente por estimulação da imunidade humoral e consequente geração de anticorpos (SIEGRIST, 2001), torna-se importante avaliar a real participação da IL-10 no perfil supressor observado nos descendentes adultos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni.* Observando também, a capacidade de ativação das células apresentadoras de antígenos (Antigen Presenting Cells - APCs).

Devido ao risco dos descendentes, moradores de área endêmica, se infectarem com o parasita e aos extensos programas de vacinação, analisamos, ainda, experimentalmente a presença de células Tregs e a intensidade da supressão da resposta imune anti-OVA sob condições de infecção e imunização pós-natais com *S. mansoni*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESQUISTOSSOMOSE

A ocorrência das parasitoses é predominante nos países em desenvolvimento por estar fortemente relacionada com a falta de educação sanitária, de investimentos em infraestrutura e de saneamento básico. Além disso, o baixo nível socioeconômico e cultural são fatores determinantes para aumentar as dificuldades de controle das mesmas (KLOOS et al., 2008). No Brasil, o rápido crescimento das cidades aliado à falta de recursos impede que as atividades sanitárias cheguem às áreas periurbanas, favorecendo a alta incidência dessas doenças nas populações mais carentes (PARISE FILHO; SILVEIRA, 2001). Entre as parasitoses mais importantes do mundo, está a esquistossomose (WHO, 2012).

Doença parasitária helmíntica, a esquistossomose é causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas espécies mais importantes que infestam humanos são *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum* (GRYSEELS et al., 2006). No Brasil, a esquistossomose é causada exclusivamente pela espécie *S. mansoni* e sua transmissão ocorre em 19 estados e no Distrito Federal, com os estados da Bahia e Minas Gerais apresentando as maiores áreas endêmicas (AMARAL et al., 2006). Pernambuco está entre os estados com alta prevalência de pessoas infectadas. Trabalho realizado com crianças de 9 a 12 anos em 43 municípios localizados na Zona da Mata do estado de Pernambuco, mostrou que 26 (60,4%) destes municípios merecem atenção especial considerando os níveis de prevalência e a intensidade da infecção (BARBOSA et al., 2006).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é do tipo heteroxênico. O homem é o hospedeiro vertebrado definitivo, onde ocorre a fase sexuada, no qual os vermes adultos são encontrados acasalados em cópula, no sistema porta hepático. Centenas de ovos são postos diariamente por cada fêmea, atravessam a parede intestinal, encontram-se ao longo do intestino e são eliminados nas fezes. Em contato com a água e influenciados pela temperatura, esses ovos

eclodem e liberam os miracídios, que infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria* (hospedeiros intermediários), transformam-se em esporocistos que assexuadamente dão origem a numerosas larvas (as cercárias). Devido à alta motilidade, estas cercárias penetram através da pele do hospedeiro definitivo, perdem a cauda e adquirem a forma de esquistossômulos, estes migram pelo tecido cutâneo, ganham o sistema sanguíneo ou linfático e chegam aos pulmões. Posteriormente migram para o sistema porta hepático, e dentro de 28 a 30 dias após a penetração, tornam-se vermes adultos, copulam e os ovos começam a ser liberados, reiniciando o ciclo (BLANCHARD, 2004; SOUZA et al., 2011).

As formas clínicas da esquistossomose são muito variadas. Caracterizam-se por uma fase aguda, algumas vezes assintomática, e outra fase crônica, com diferentes manifestações e implicações para o doente (PEARCE; MacDONALD, 2002). O evento patogênico mais significante da fase crônica da doença ocorre quando os ovos, não eliminados, se alojam nos tecidos, principalmente hepático e intestinal, e liberam antígenos solúveis estimulando intensamente a resposta imunológica. Há acúmulo de células ao redor dos ovos, com predomínio de eosinófilos, macrófagos e linfócitos T, resultando na formação do granuloma clássico da esquistossomose (HAGAN; NDHLOVU; DUNNE, 1998; GRYSEELS et al., 2006).

A doença crônica com manifestações graves é um evento relativamente incomum, afetando aproximadamente 10% dos indivíduos infectados. Uma minoria de pacientes com infecção acentuada sem tratamento por muito tempo pode vir a desenvolver esquistossomose hepática crônica ou fibrótica, resultante de uma maciça deposição de colágeno nos espaços periportais. A fibrose pode levar a uma oclusão progressiva das veias portais, com hipertensão portal, esplenomegalia, ascite e varizes gastroesofágicas (HAGAN; NDHLOVU; DUNNE, 1998; GRYSEELS et al., 2006). Já o envolvimento do sistema nervoso central é mais raro, mas causa importantes complicações, podendo estar associado a lesões cerebrais e do cordão

espinhal (BLANCHARD, 2004). Outras formas ectópicas raras, mas com complicações importantes também são observadas. Nas mulheres, lesões nos ovários e trompas de falópio podem levar à infertilidade, e nos homens, os testículos, epidídimo, cordão espermático e próstata podem ser afetados (GRYSEELS et al., 2006).

2.2 IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE

Como já mencionado, as principais complicações da esquistossomose ocorrem devido aos ovos que ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, principalmente hepático e intestinal, onde há liberação de antígenos solúveis que induzem a formação do granuloma e da fibrose (CALDAS et al., 2008). Muitos estudos têm demonstrado a importância das citocinas na formação e na modulação da resposta imune granulomatosa aos ovos tanto em humanos, quanto em modelos experimentais. Sendo assim, a infecção pelo *S. mansoni* está associada a uma forte e predominante resposta imunológica de perfil Th2, com produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e aumento no número de macrófagos alternativamente ativados, produtores de IL-4 e IL-13, bem como de eosinófilos ao redor dos ovos retidos (ABATH et al., 2006; WILSON et al., 2007). Contudo, foi demonstrado que antes da postura dos ovos ocorre secreção de citocinas Th1 (IFN-γ, TNF-α e IL-2) desencadeada pelos antígenos cercarianos, e que a oviposição e a produção de citocinas Th2 modulam negativamente esta resposta inicial Th1 (PEARCE et al., 1991).

A supressão da resposta Th1 e o controle da reação granulomatosa ao redor dos ovos observado na fase crônica da esquistossomose, foram associados à IL-10 produzida principalmente pelos clones Th2 (FLORES-VILLANUEVA et al., 1993; STADECKER; FLORES-VILLANUEVA, 1994). Contudo, estudos posteriores sobre os mecanismos de modulação do granuloma na esquistossomose murina mostraram que a IL-10 não atua só no

controle da resposta Th1, como também modula a resposta Th2. Animais IL-$10^{-/-}$ (geneticamente deficientes da produção de IL-10) desenvolvem um perfil misto Th1/Th2, havendo aumento de IFN-γ/IL-5, acompanhado de níveis maiores ou não alterados de IL-4 (WYNN et al., 1997; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000). A ação supressora da IL-10 em clones de células Th2 também foi observada em outros modelos experimentais. Animais tratados com IL-10 recombinante apresentaram diminuição na produção de IL-5 e consequente queda no acúmulo de eosinófilos em resposta a OVA quando analisado o fluido da cavidade peritonial (ZUANY-AMORIM et al., 1996). Já camundongos infectados pelo *Heligmosomoides polygyrus* e sensibilizados com extrato de alérgeno que tiveram sua IL-10 neutralizada apresentaram elevada produção da IgE específica para o alérgeno, bem como dos sintomas anafiláticos (BASHIR et al., 2002).

Estes estudos corroboram o de Zhou et al. (2005), o qual demonstra que a IL-10 pode ser considerada uma citocina amplamente regulatória, uma vez que sua ação anti-inflamatória não é restrita a um dos subtipos Th1 ou Th2. Atualmente, já se sabe que a ação supressora da IL-10 deve-se, principalmente, à sua capacidade de inibir a ativação de macrófagos, diminuir a expressão das moléculas co-estimulatórias (IL-12 e CD80/CD86) e moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (Major Histocompatibility Complex - MHC) nas APCs (MOORE et al., 2001).

A indução das respostas Th1 e Th2 requer um envolvimento inicial das células dendríticas (Dendritic Cells - DCs), que são APCs derivadas da medula óssea (SHORTMAN; LIU, 2002). No perfil de resposta Th1, está bem estabelecido que as DCs, apresentando antígenos bacterianos e de protozoários, promovem a produção de IL-12, IL-18 e IFN-α e regulam a expressão de moléculas co-estimulatórias como o CD80 e o CD86 (REIS E SOUSA et al., 1997; MAIZELS et al., 2004; REIS E SOUSA, 2006). A respeito do perfil Th2, ainda é controverso como as DCs estimulam este tipo de resposta, não se sabe ao certo

quais citocinas e moléculas de superfície estimulam a diferenciação em Th2 ou se é a incapacidade de algumas DCs maduras de produzir IL-12 e direcionar a resposta para o perfil Th1 que resulta num perfil Th2 (JANKOVIC; LIU; GAUSE, 2001; REIS E SOUSA, 2006; KOOL; HAMMAD; LAMBRECHT, 2012). Muitos estudos experimentais mostram que a indução da resposta Th2 pode ser reproduzida *in vivo* e *in vitro* simplesmente pela exposição das DCs aos produtos helmínticos, entre eles o antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* (Soluble Egg Antigen - SEA) ou apenas ao ômega-1, glicoproteína constituinte do SEA (MacDONALD et al., 2001; EVERTS et al., 2009). Nenhum novo fenótipo das DCs estimuladas por antígenos helmínticos foi detectado, nem ocorreu aumento significativo das citocinas IL-4 e IL-10 (que poderiam estar inibindo a resposta Th1). Estas evidências dão suporte a hipótese de que a resposta imune Th2 ocorre devido a uma maturação de DCs incapazes de produzir IL-12 (PEARCE; MacDONALD, 2002; MAIZELS et al., 2004).

Alguns antígenos têm a capacidade de induzir a produção de IL-10 nas APCs, através de um caminho alternativo de ativação via moléculas DC-SING (DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Nonintegrin), resultando em uma imunossupressão devido à modulação na função das células dendríticas (GEIJTENBEEK et al., 2003). Esta IL-10, produzida na fase inicial da resposta imune, é importante na geração e manutenção de células T regulatórias (WAKKACH et al., 2003). As células Tregs diferem das células Th1 e Th2 na produção de citocinas: secretam altos níveis de IL-10, produzem ainda IL-5 e IFN-γ, com baixa produção de IL-2 e não secretam IL-4. Possuem como principal característica a habilidade de inibir a proliferação de ambos os clones das células T efetoras (Th1 e Th2) (GROUX et al., 1997; COTTREZ et al., 2000). Os ovos e vermes de *S. mansoni* possuem açúcares potencialmente indutores de IL-10 nas DCs (APPELMELK et al., 2003).

Outros subtipos de células Tregs vêm sendo encontrados na presença de antígenos de *S. mansoni*. Um perfil característico de células Th3, produtoras de IL-10/TGF-β (McGUIRK;

MILLS, 2002), foi encontrado em resposta a injeção de ovos de *S. mansoni* (SEWELL et al., 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que células T regulatórias CD4+CD25+, chamadas de Tregs naturais FoxP3+ (Forkhead box P3), eram necessárias para manutenção da resposta Th2 e, portanto essenciais no processo de imunomodulação presente na esquistossomose (McKEE; PEARCE, 2004). Curiosamente, apesar da capacidade das células Tregs de produzir IL-10 após injeção dos ovos, a participação desta citocina neste processo não foi evidenciada, sugerindo outros mecanismos para o controle da resposta Th1 e Th2 pelas células Tregs (TAYLOR; MOHRS; PEARCE, 2006).

Este perfil imunossupressor gerado pelas infecções por *S. mansoni* se estende às respostas Th1 e Th2 específicas para antígenos heterólogos. Ocorre supressão da resposta Th1 para antígenos virais ou bacterianos durante infecções concomitantes ou vacinações. Em humanos, foi demonstrado que indivíduos infectados com *S. mansoni*, apresentam atenuação na resposta Th1 à vacinação com toxóide tetânico (SABIN et al., 1996). Em camundongos, a gravidade da resposta Th1 na encefalomielite autoimune, frente à administração de mielina básica, foi diminuída durante infecção e imunizações com antígenos de *S. mansoni* (SEWELL et al., 2003; LA FLAMME; RUDDENKLAU; BACKSTROM, 2003).

Um subtipo de células T CD4+ descoberto mais recentemente, o perfil Th17, vem sendo descrito como altamente pró-inflamatório e responsável pela gravidade de doenças autoimunes. As células produzem IL-17, mas também são importantes para o desenvolvimento e manutenção deste perfil a IL-23, IL-6 e TGF-β (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007; STOCKINGER; VELDHOEN; MARTIN, 2007). Trabalhos estudando o comportamento do perfil Th17 na esquistossomose demonstram, experimentalmente, que animais infectados pelo *S. mansoni* quando recebem SEA em adjuvante completo de Freund (Complete Freund`s Adjuvant - CFA) apresentam exacerbação na imunopatologia da doença, com alta produção de IL-17, dependente da presença da IL-23 (RUTITZKY; LOPES DA

ROSA; STADECKER, 2005; RUTITZKY; STADECKER, 2006; SHAINHEIT et al., 2007). Por outro lado, quando analisadas infecções concomitantes, observamos que a presença da infecção esquistossomótica é capaz de reduzir a gravidade de doenças autoimunes (como a artrite induzida por colágeno e a colite experimental) dependentes do perfil Th17 (OSADA et al., 2009; RUYSSERS et al., 2010).

Uma relação inversa entre a infecção esquistossomótica e a presença de reações alérgicas também tem sido evidenciada. Medeiros et al. (2003), analisando o curso da asma em pacientes infectados ou não pelo *S. mansoni*, observaram atenuação do quadro clínico nos pacientes asmáticos infectados. Em trabalho de Araújo et al. (2004), também realizado em pacientes infectados pelo *S. mansoni* e com asma foi demonstrada uma produção menor de IL-5 e IL-4 e maior de IL-10 em resposta a *Dermatophagoides pteronyssinus*, quando comparada com a produção destas citocinas em pacientes asmáticos e não-parasitados. Em camundongos, quando analisada a susceptibilidade de animais infectados pelo *S. mansoni* ao desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica e hiperresponsividade das vias aéreas em diferentes fases e intensidades da infecção, foi observado que o efeito protetor da esquistossomose na asma alérgica, em resposta à ovalbumina, ocorre durante a fase crônica da infecção e é dependente da IL-10 (SMITS et al., 2007).

2.3 RELAÇÃO MATERNO-FETAL E A ESQUISTOSSOMOSE

Outra forma de modulação da resposta imune muito estudada ocorre durante a gestação, onde é observado um predomínio de citocinas de resposta Th2 e Th3 (IL-10, IL-4 e TGF-β), as quais estão relacionadas com prevenção de aborto (RAGHUPATHY, 2001)**.** Um aumento de 100 vezes na produção de IL-10 pelas células do estroma endometrial foi observado durante o estabelecimento da gestação em comparação às mulheres em estado não-

gestacional (KRASNOW et al., 1996). Contudo, o IFN-γ produzido por células "natural killers" (NK) uterinas é requerido no processo inicial de vascularização no útero necessário na fase de implantação (CHAOUAT, 2003).

Na interface útero-placenta é encontrado um ambiente potencialmente imunossupressor, com presença de macrófagos inibitórios, células dendríticas imaturas e células T regulatórias (LAGADARI et al., 2004; BLOIS et al., 2004; HEIKKINEN et al., 2004). Uma maior população de APCs encontradas na decídua (mucosa uterina) são macrófagos (CD14+), que produzem espontaneamente IL-10 (HEIKKINEN et al., 2003). As DCs apresentam intracelularmente maiores quantidades de IL-10 do que IL-12 durante a maior parte da gestação (BLOIS et al., 2004) e 14% das células T CD4+ são células CD25+ (Tregs) que secretam fatores imunomodulatórios como IL-10 e TGF-β (HEIKKINEN et al., 2004).

Na decídua humana vem sendo descrita uma população de células imaturas "tipo-DCs/macrófagos". Esta população parece ser composta por vários tipos celulares relacionados, alguns expressando altos níveis de moléculas DC-SING (LASKARIN et al., 2007). Sugerindo que para o sucesso da gestação, o sistema imune materno atua com mecanismos protetores reduzindo a citotoxidade, uma vez que o aumento de células T citotóxicas (CD8+) vem sendo observado no tecido endometrial de mulheres com histórico de abortos recorrentes (VON RANGO, 2008). Este perfil imunossupressor, necessário para o desenvolvimento da gestação, pode ser mantido no recém-nascido (TAYLOR; BRYSON, 1985; TASKER; MARSHALL-CLARKE, 1997).

Também tem sido demonstrado que processos infecciosos, exposição a alérgenos ou citocinas nas mães podem alterar o grau de competência imune dos seus descendentes. Dados epidemiológicos indicam uma maior susceptibilidade à malária em filhos de mães infectadas pelo *Plasmodium falciparum* (LE HESRAN et al., 1997). Apesar de haver um aumento no

número e ativação de macrófagos (FRIED et al., 1998; ROGERSON et al., 2003), a presença de IL-10 também ocorreu na placenta e em culturas de cordão umbilical durante a malária materna (BRUSTOSKI et al., 2005)**.** Com relação à infecção materna pelo *Wuchereria bancrofti*, estudo das células do cordão umbilical mostrou que os recém-nascidos que eram imunologicamente tolerantes (sem resposta antígeno-específica das células T do cordão umbilical) apresentaram aumento no risco de infecção durante a infância, quando comparados com recém-nascidos sensibilizados *in utero* (MALHOTRA et al., 2006).

A exposição materna experimental a alérgenos levou a uma diminuição do quadro alérgico de filhotes nascidos ou amamentados, com redução de anticorpos anti-alérgenos anafiláticos. Este fato sugere que a pré-imunização materna apresenta um notável efeito inibitório podendo ser considerada uma estratégia preventiva de respostas alérgicas nos filhotes destas mães (FUSARO et al., 2007). Lima et al. (2005) relataram que camundongos recém-nascidos de mães tratadas com IFN-γ durante o período gestacional apresentam na vida adulta uma proteção contra provocações alérgicas, com baixos níveis de IL-4 e alta produção de IFN-γ pelas células esplênicas, bem como baixa produção plasmática de IgE e IgG1 anafilática anti-OVA.

No que diz respeito à infecção crônica pelo *S. mansoni* em gestantes de áreas endêmicas, já é bem conhecida a transferência de anticorpos maternos parasita-específicos (LENZI et al., 1987) e antígenos de *S. mansoni* (HASSAN et al., 1997; ATTALLAH et al., 2003) através da placenta e pelo leite. Tem sido demonstrado que a exposição aos anticorpos anti-*Schistosoma* e antígenos do parasita, durante o período pré-natal ou a amamentação, está associada com a modulação da resposta imune dos descendentes para antígenos homólogos (HANG; NDHLOVU; DUNNE, 1974; MONTESANO et al., 1999). Tendo sido relatada uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni* em camundongos

nascidos de mães esquistossomóticas maciçamente infectadas (LENZI et al., 1987; ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010).

Lenzi et al. (1987) estudando camundongos recém-nascidos e lactentes de mães infectadas pelo *S. mansoni*, observaram transferência de anticorpos contra antígenos de cercárias, de ovos e de vermes adultos, através da placenta e pelo leite, além de uma diminuição da reação granulomatosa hepática quando comparados a camundongos nascidos de mães não-infectadas. Attallah et al. (2006) também demonstraram que a exposição pré-natal dos recém-nascidos aos antígenos ou anticorpos anti-*S. mansoni* pode atenuar a patogênese da esquistossomose numa infecção subsequente. Eles observaram, nos recém-nascidos de mães infectadas, altos níveis de anticorpos maternos (IgG) anti-*S. mansoni* na 1ª semana de nascimento, que foram decaindo gradualmente até a 8ª semana, assim como a presença de antígenos maternos nos tecidos hepático e renais dos filhos por até 6 semanas após o parto. Após 8 semanas, os filhotes foram infectados e foi observado que os níveis de IgG, tamanho e número de granulomas hepáticos, bem como recuperação de vermes foram significantemente reduzidos nos animais nascidos de mães infectadas quando comparados aos nascidos de mães não-infectadas. Trabalho mais recente de Othman et al. (2010), corrobora esses achados mostrando que a exposição pré-natal à infecção pelo *S. mansoni* diminui a intensidade da doença e as alterações histopatológicas em infecções pós-natais. Eles também observaram que os níveis de expressão dos genes de IL-12 e de TGF-β, citocinas regulatórias, são significativamente maiores nos animais expostos à infecção pré-natal.

2.4 ESQUISTOSSOMOSE MATERNA E A IMUNIDADE DOS DESCENDENTES A ANTÍGENOS HETERÓLOGOS

Com relação à imunomodulação da resposta dos descendentes aos antígenos heterólogos, ainda são poucos os estudos realizados. Estudo desenvolvido com a espécie *Schistosoma haematobium* demonstra que a infecção materna por este trematódeo durante a gravidez sensibiliza aproximadamente 50% dos recém-nascidos *in utero*, e que esta imunidade pré-natal persiste na criança influenciando sua resposta imune celular ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin) e diminuindo a eficácia da vacinação. Eles observaram que as células T das crianças nascidas de mães não-infectadas durante a gestação produzem muito mais IFN-γ em resposta a proteínas purificadas da micobactéria do que as crianças nascidas de mães infectadas (MALHOTRA et al., 1999).

Recentemente, nós demonstramos experimentalmente que mães infectadas pelo *S. mansoni* podem alterar, durante a gravidez ou amamentação, a resposta imune dos seus filhos contra o antígeno heterólogo ovalbumina (OVA), na vida adulta. Os descendentes adultos nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas foram imunizados com OVA em CFA e apresentaram variação quanto ao tipo de resposta imune OVA-específica produzida. Camundongos nascidos de mães esquistossomóticas adquiriram um potencial supressivo através da gestação, apresentando alta produção de IL-10 e supressão parcial na resposta humoral anti-OVA, com baixos níveis de IgG2a. Em contraste, camundongos amamentados em mães infectadas tiveram uma potencialização da imunidade anti-OVA, observada pelo aumento na produção de anticorpos IgG1 e IgG2a, com ausência de produção de IL-10 e altos níveis de IL-2 (SANTOS et al., 2010).

Devido aos altos níveis de IL-10 produzidos pelas células esplênicas dos animais nascidos de mães esquistossomóticas, seria esperado uma maior supressão dos parâmetros por nós analisados. Contudo, estudo de Taylor, Mohrs e Pearce (2006) demonstrou que apesar da capacidade das células Tregs de produzir IL-10 a participação desta citocina no processo de imunomodulação das respostas Th1 e Th2 da esquistossomose não foi evidenciada. Quando

analisada experimentalmente, a associação entre a infecção esquistossomótica e a diminuição dos sintomas da asma alérgica, também observou-se a atuação pelas células T regulatórias CD4+CD25+FoxP3+ neste processo regulatório de uma maneira IL-10 independente (PACÍFICO et al., 2009). Sugerindo outros mecanismos, independentes da produção de IL-10, para participação das células Tregs, por exemplo, dependente da sinalização via molécula CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), bem como da secreção da citocina imunossupressora TGF-β pelas células Tregs ativadas (READ; MALMSTRÖM; POWRIE, 2000; FALLARINO et al., 2003). Ou ainda as células Tregs poderiam estar agindo por contato célula-célula (COLLISON et al., 2009).

Trabalho de Sakaguchi (2003) sugere que as células Tregs só desempenhariam suas funções imunomodulatórias, ou seja, estariam ativas, em presença do antígeno parasitário. Em nosso modelo experimental estes antígenos estão ausentes nos descendentes na vida adulta, uma vez que nos animais nascidos de mães infectadas a presença do antígeno só se mantém até a sexta semana de vida, período no qual começa a diminuir a presença do antígeno no fígado e aumentar a quantidade renal indicando sua eliminação (ATTALLAH et al., 2006). Então, nos perguntamos se a supressão parcial observada nos animais nascidos de mães infectadas, apesar da alta produção de IL-10, estaria relacionada com a presença de células Tregs quiescentes devido à ausência do antígeno parasitário nos descendentes adultos.

O desenvolvimento de uma resposta imune específica a antígenos protéicos é desencadeado por interações dos linfócitos T auxiliares (helper - Th) com as APCs e requer estimulação através de moléculas co-estimulatórias nas APCs que interagem com ligantes correspondentes nas células Th (CORTHAY, 2006). As células dendríticas são APCs que eficientemente induzem ativação das células T "naïve" nos órgãos linfóides e são cruciais para direcionar a diferenciação das células T CD4+ em um dos seus subtipos como Th1, Th2, Th17 e Tregs (MOSER; MURPHY, 2000; LECHLER; NG; STEINMAN, 2001;

PULENDRAN; TANG; MANICASSAMY, 2010). Linfócitos B e macrófagos quando atuam como APCs são ajudados via comunicação intercelular com células T, etapa necessária para a completa ativação das células B e fagocitose, respectivamente (GREWAL; FLAVELL, 1996).

Logo após o reconhecimento do antígeno apresentado por moléculas do MHC aos receptores de células T "naïve" (T Cell Receptors - TCR) (primeiro sinal de ativação), a proliferação e diferenciação em células Th efetoras requer um segundo sinal induzido pelo envolvimento da molécula CD28, nas células T, com as moléculas co-estimulatórias CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) nas DCs (SHARPE; FREEMAN, 2002; RIHA; RUDD, 2010). No entanto, as moléculas CD80 e CD86 também são ligantes do CTLA-4, uma molécula que induz sinais inibitórios intracelulares que impedem a ativação de células T (WALUNAS; BAKKER; BLUESTONE, 1996; GREENWALD et al., 2001; WING; YAMAGUCHI; SAKAGUCHI, 2011). Portanto, níveis relativos de CD80 e CD86, expressos em APCs podem afetar o equilíbrio entre a sinalização de CD28 e CTLA-4 e a resposta imune resultante. Estudos utilizando modelos de rejeição a enxertos mostraram que o CD86 é o ligante preferencial para CD28, enquanto o CD80 foi considerando ligante preferencial para a molécula inibitória CTLA-4 (JUDGE et al., 1999).

Uma outra interação molecular importante é a do CD40 ligante (CD40L/CD154) em linfócitos T ativados com a molécula CD40, em APCs. Esta interação CD40:CD40L está envolvida na função efetora das células T sob as diferentes APCs induzindo um aumento da captura e capacidade de apresentação do antígeno (manutenção da ativação) e produção de anticorpos e fagocitose (GREWAL; FLAVELL, 1996; MA; CLARK, 2009). Assim, o status de ativação das APCs (medido pelos níveis de moléculas co-estimulatórias) pode afetar profundamente o equilíbrio e/ou tipo de respostas imunes desencadeadas para um antígeno protéico.

Devido ao fato de Pernambuco apresentar uma vasta área endêmica para a esquistossomose, com mulheres cronicamente infectadas em idade fértil, e a maioria das vacinas atuar na estimulação da produção de anticorpos (SIEGRIST, 2001), tornou-se importante avaliar os seguintes aspectos: a real participação da IL-10 no perfil supressor observado, determinar a capacidade de ativação das APCs (DCs e linfócitos B) e confirmar a atividade das células Tregs na resposta imune anti-OVA na presença do antígeno de ovos de *S. mansoni*, seja por infecção pós-natal seja por administração do SEA, nos descendentes de mães esquistossomóticas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar nos descendentes adultos de mães infectadas pelo *S. mansoni* a associação entre o processo de imunossupressão anti-OVA, os níveis de IL-10 e alterações nas APCs. Além de analisar a presença de células Tregs e se esta imunossupressão anti-OVA é modificada pela presença dos antígenos parasitários.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Verificar o efeito do bloqueio da IL-10, a partir do tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais anti-IL-10, sobre a supressão da imunidade humoral anti-OVA previamente observada em camundongos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni*, imunizados com OVA em adjuvante.

3.2.2 Avaliar a capacidade de apresentação antigênica de células dendríticas (CD11c+) e linfócitos B (CD45R/B220+) através da expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e CD40 em células esplênicas de filhotes nascidos ou amamentados em mães infectadas com *S. mansoni*, na vida adulta após imunização com OVA em adjuvante.

3.2.3 Estudar a intensidade de supressão da resposta anti-OVA nos descendentes adultos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas através da imunização com OVA em adjuvante, 48 horas após a administração de SEA ou 60 dias após a infecção natural com cercárias da cepa SLM de *S. mansoni*.

3.2.4 Analisar a presença de células Tregs pela expressão de marcadores CD4+/ FoxP3+ em células esplênicas de filhotes nascidos e/ou amamentados em mães infectadas pelo *S.*

mansoni, na vida adulta após exposição aos antígenos parasitários e imunização com OVA em adjuvante.

3.2.5 Realizar a análise histopatológica dos fígados para quantificação e determinação do tamanho dos granulomas e avaliação da deposição de colágeno nos animais infectados com cercárias da cepa SLM de *S. mansoni* e posteriormente imunizados com OVA em adjuvante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental, com características de intervenção, onde um grupo de camundongos fêmeas sofreu a intervenção (infecção com cercárias de *Schistosoma mansoni*) e o outro serviu para comparação dos resultados. Os filhotes machos nascidos de ambos os grupos foram escolhidos de forma não aleatória, uma vez que a randomização não foi necessária já que as características dos mesmos são semelhantes, apresentaram o mesmo tempo de vida, fizeram parte da mesma linhagem e foram criados nas mesmas condições alimentares. Devido ao processo utilizado, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção avaliada. Como vantagens do estudo, além das condições controladas de observação, temos a facilidade do modelo experimental apresentar respostas semelhantes aos humanos em relação à esquistossomose, amenizando dificuldades por questões éticas. Contudo, não se pode afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis no homem.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

A primeira etapa do estudo relacionada à obtenção dos animais bem como toda parte de infecção, acasalamento, manutenção dos filhotes, neutralização da IL-10 e imunização dos mesmos, foi realizada no Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Após imunização, os animais foram transferidos para o setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE) onde foram realizados os testes das reações de hipersensibilidade (RH), a coleta do sangue, a eutanásia e todos os procedimentos laboratoriais (cultura das células esplênicas, dosagens de imunoglobulinas e citocinas, análise histopatológica e marcação celular para citometria de

fluxo). A aquisição e análise das células marcadas foram realizadas no Citômetro de Fluxo BD FACSCalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) do CPqAM/FIOCRUZ.

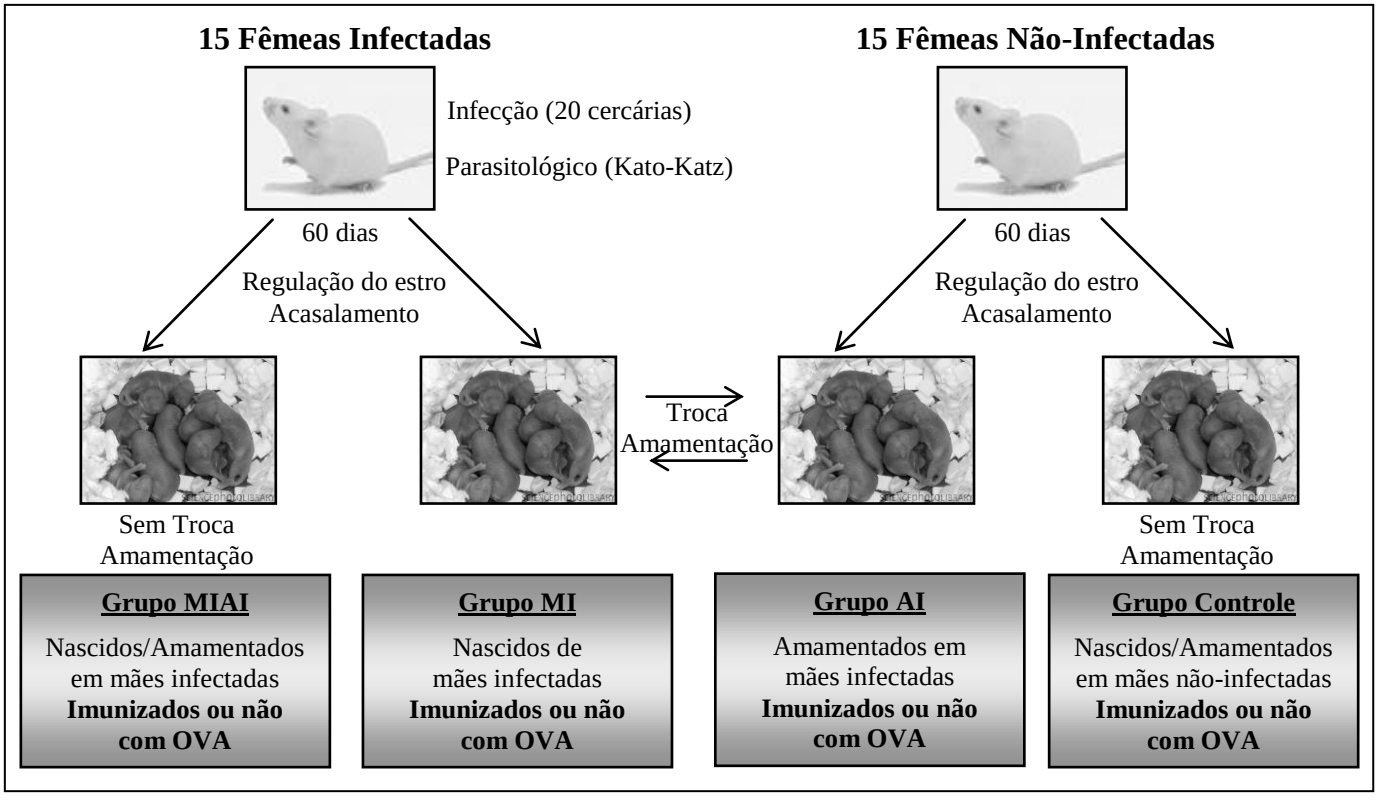
4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss webster*, fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). A espécie mimetiza o desenvolvimento patológico da esquistossomose em humanos, além de ser bem susceptível à infecção e boa respondedora ao antígeno heterólogo (OVA) escolhido para o estudo. A estimativa do tamanho amostral foi estabelecida com base em dados da literatura e na experiência dos coordenadores do projeto. Para a infecção dos camundongos foram utilizadas cercárias de *S. mansoni*, da cepa São Lourenço da Mata (SLM), obtidas de caramujos infectados pela espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário do Departamento de Parasitologia (UFPE) pela equipe do Setor de Imunologia do LIKA/UFPE.

4.4 OPERACIONALIZAÇÃO E GRUPOS DE ESTUDO

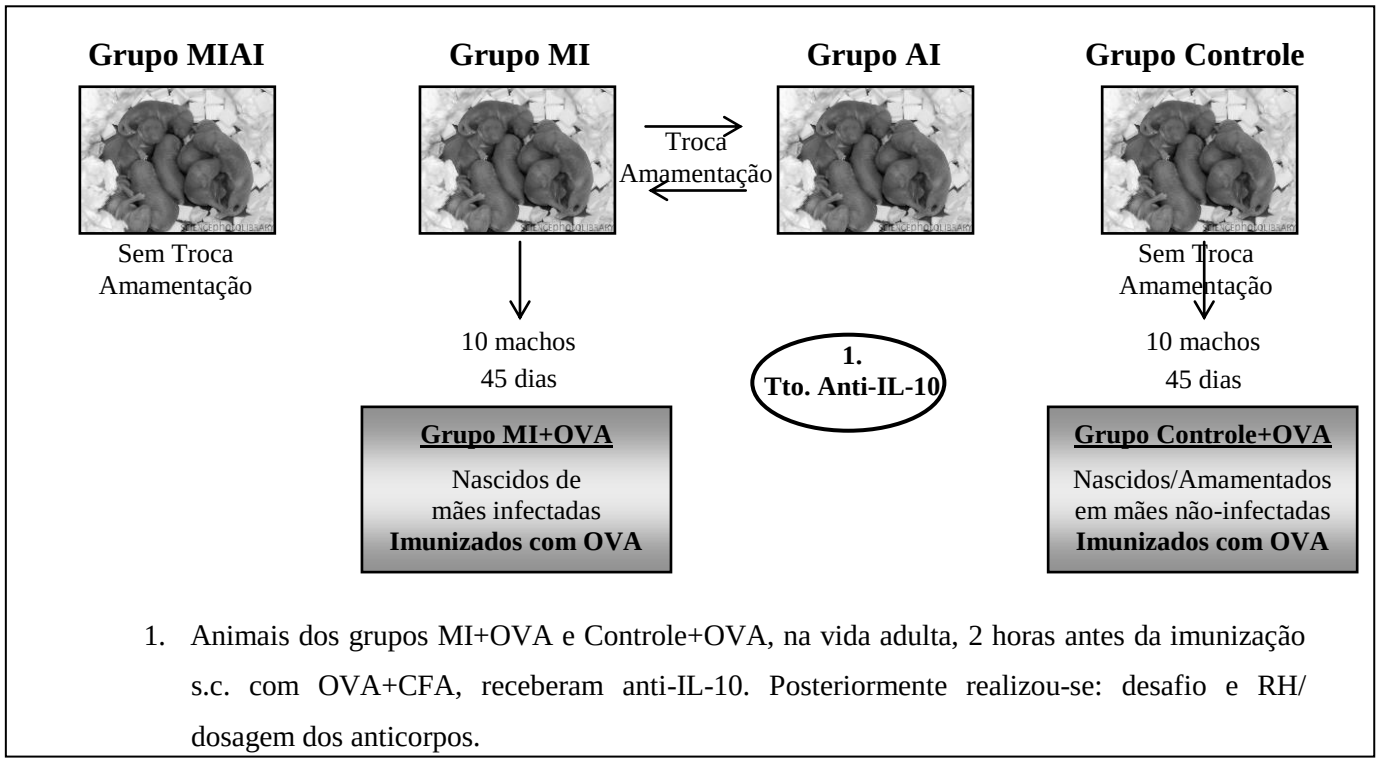
Como demonstrado no esquema 1, foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss webster* com 4 semanas de idade. Destes, 10 fêmeas foram infectadas por via cutânea com 20 cercárias da cepa SLM de *Schistosoma mansoni* e monitoradas a partir do 45º dia para confirmação da infecção, através de exames parasitológicos de fezes. No 60º dia, ocorreu sincronização dos estros e acasalamento. Paralelamente, outras 10 fêmeas não-infectadas também tiveram seus estros regulados e acasalaram. Os filhotes destes dois grupos de fêmeas tiveram suas mães trocadas. Assim, filhotes de mães infectadas foram amamentados pelas mães não-infectadas (MI) e filhotes de mães não-infectadas mamaram nas

mães infectadas (AI). Os filhotes machos, após 45 dias, foram selecionados para formação dos grupos de estudo: Grupo MI+OVA - animais nascidos de mães infectadas (MI) e imunizados com OVA + adjuvante completo de Freund (CFA); Grupo MI - animais MI e não-imunizados; Grupo AI+OVA - animais apenas amamentados em mães infectadas (AI) e imunizados com OVA+CFA; Grupo AI - animais AI e não-imunizados. Para controle positivo e com o objetivo de mimetizar uma real situação de área endêmica também utilizamos filhotes nascidos e amamentados em 5 fêmeas infectadas pelo *S. mansoni*, com formação de mais dois grupos: Grupo MIAI+OVA - animais nascidos/amamentados em mães infectadas (MIAI) e imunizados com OVA+CFA; Grupo MIAI - animais MIAI e não-imunizados. Como grupo controle, utilizamos filhotes nascidos e amamentados em 5 fêmeas não-infectadas, resultando na formação dos seguintes grupos: Grupo Controle+OVA - animais nascidos/ amamentados em mães não-infectadas e imunizados com OVA+CFA; Grupo Controle - animais nascidos/amamentados em mães não-infectadas e não-imunizados.



Esquema 1. Formação dos grupos de estudo e operacionalização.

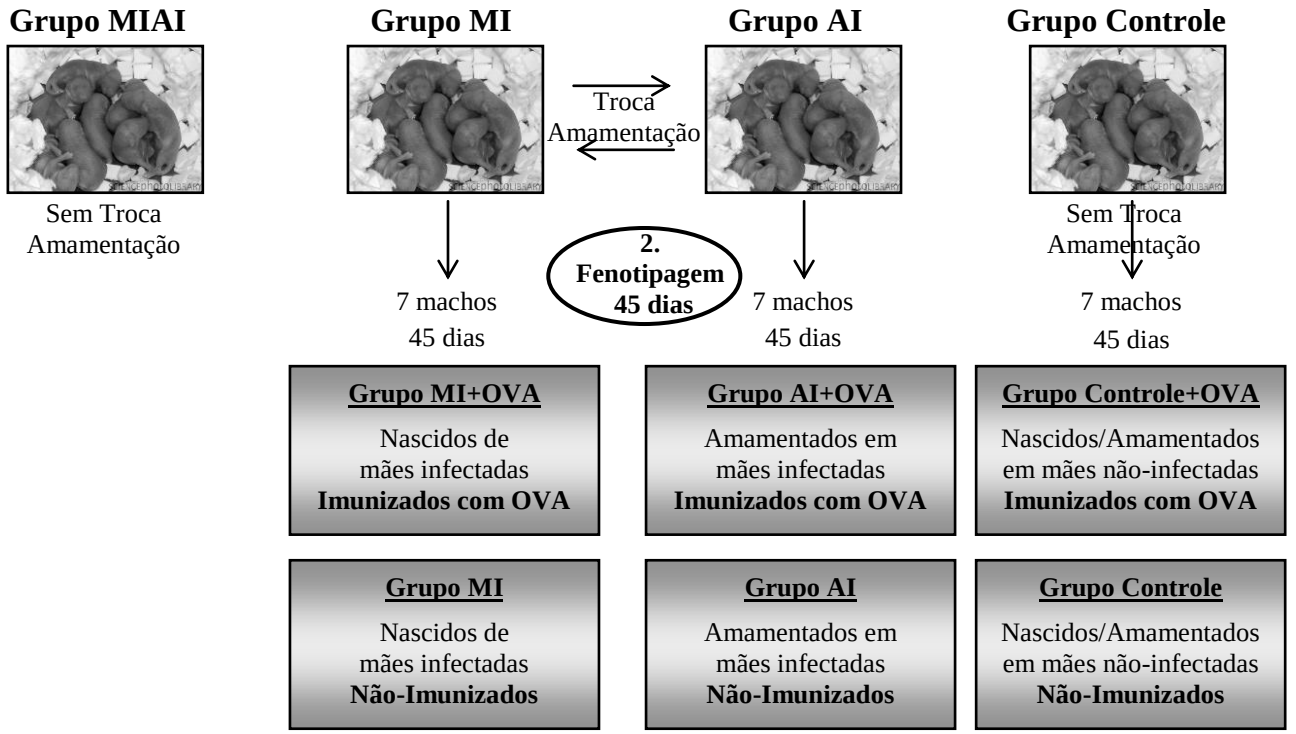
Em alguns experimentos (esquema 2), animais do grupo MI+OVA e Controle+OVA receberam anticorpo monoclonal neutralizante da ação de IL-10 duas horas antes da imunização e no 8º dia após a imunização, foram desafiados no coxim plantar, com a OVA agregada, para indução de reações de hipersensibilidade (RH) imediata e tardia e realização dos testes de RH, com medição da espessura da pata nos intervalos de 3, 6, 9 e 24 horas. Após esse período, foi realizada sangria total por punção cardíaca e o plasma coletado foi utilizado para posterior dosagem de imunoglobulinas - IgG1 e IgG2a.



1. Animais dos grupos MI+OVA e Controle+OVA, na vida adulta, 2 horas antes da imunização s.c. com OVA+CFA, receberam anti-IL-10. Posteriormente realizou-se: desafio e RH/ dosagem dos anticorpos.

Esquema 2. Experimentos com bloqueio *in vivo* da IL-10.

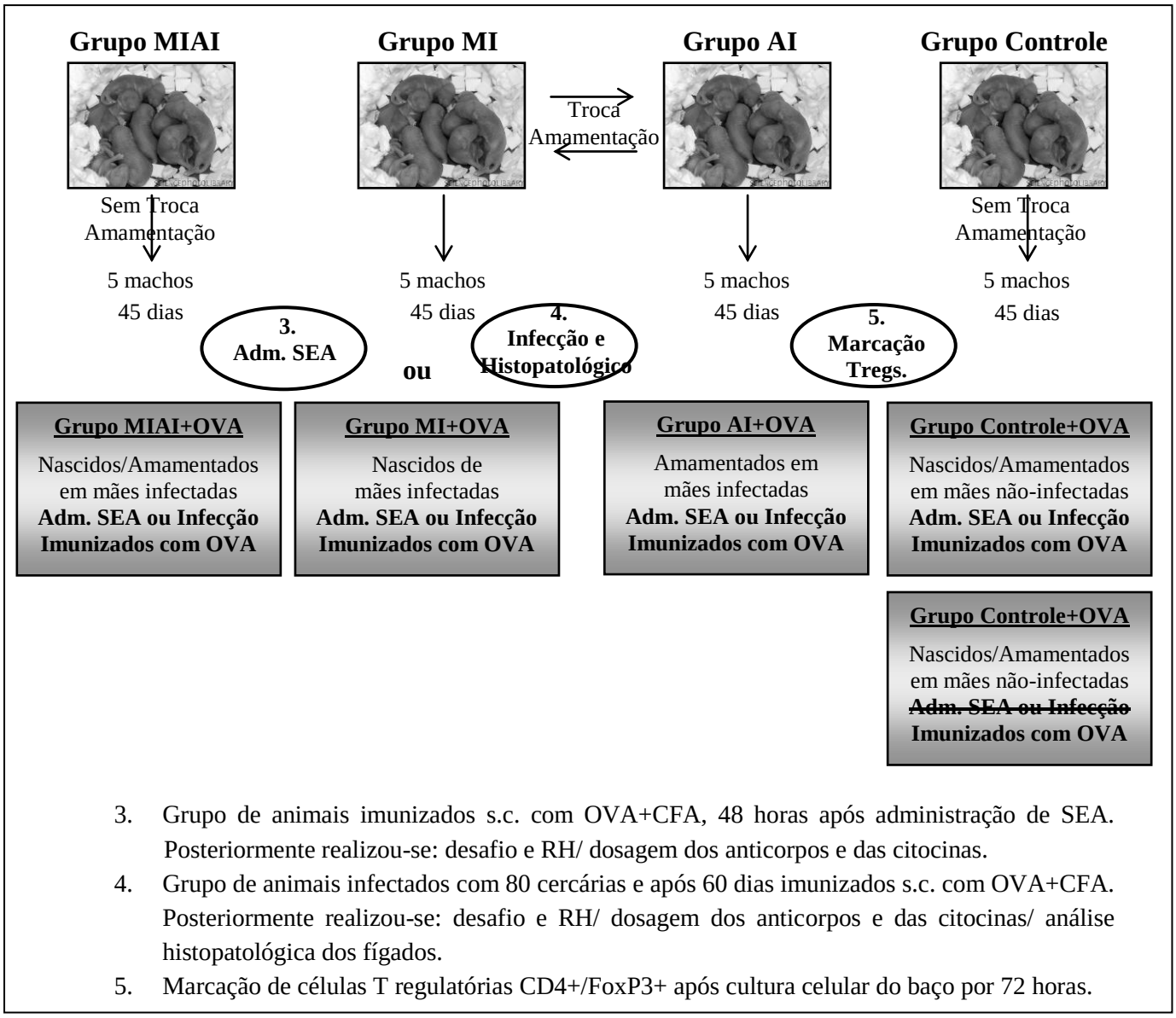
Nos experimentos para análise da expressão de moléculas co-estimulatórias pelas APCs (esquema 3), os camundongos foram eutanasiados no 3°, 5° e 8° dia pós-imunização e o baço foi retirado para obtenção de células. As células esplênicas foram marcadas com anticorpos monoclonais (ligados a fluorocromos) específicos para moléculas de ativação nas APCs. O mesmo procedimento foi realizado em animais não-imunizados.



2. Células esplênicas de todos os grupos foram analisadas fenotipicamente na vida adulta, sem imunização ou 3, 5 e 8 dias após imunização com OVA. Realizou-se marcação de células dendríticas (CD11c+) e linfócitos B (CD45R/B220+) *plus* CD80, CD86 e CD40.

Esquema 3. Experimentos para marcação das APCs.

Para avaliar se a exposição aos antígenos parasitários na vida adulta altera a intensidade da resposta anti-OVA, os grupos MI, AI, MIAI e Controle foram infectados por via cutânea com 80 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni* e, 60 dias após a infecção, foram imunizados com OVA+CFA ou receberam SEA e após 48 horas foram imunizados com OVA+CFA (esquema 4). Nestes animais, 8 dias após a imunização, realizamos os testes de RH, dosagem de IgG1 e IgG2a e o baço foi retirado para obtenção de células. As células esplênicas foram cultivadas frente a estímulos, para posterior marcação de células T regulatórias e dosagem das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes. Nos animais infectados, também foi realizada a análise histopatológica dos fígados para quantificação e determinação do tamanho dos granulomas, bem como a deposição de colágeno.



Esquema 4. Experimentos para exposição aos antígenos parasitários e marcação das Tregs.

Todos os procedimentos foram realizados três vezes, para avaliação da reprodutibilidade dos resultados.

4.5 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

4.5.1 Variável Independente: foi considerada variável independente a infecção pelo *S. mansoni*. Um grupo de camundongos sofreu a intervenção e o outro grupo foi usado como

controle. Os camundongos estudados foram os filhotes machos nascidos, amamentados ou nascidos/amamentados em mães infectadas com cercárias da cepa SLM de *S. mansoni*, além dos animais de mães não-infectadas. Em uma segunda etapa, descendentes adultos foram infectados ou imunizados com antígeno de ovos de *S. mansoni* (SEA) e estudados. A infecção foi determina pela presença de ovos de *S. mansoni* nos exames parasitológicos de fezes.

4.5.2 Variável Dependente: A variável dependente foi o perfil de resposta imunológica OVA-específica produzido pelos grupos estudados após estimulação com OVA. O perfil produzido pelos filhotes nascidos, amamentados ou nascidos/amamentados em mães infectadas foi comparado ao perfil produzido pelos filhotes nascidos/amamentados em mães não-infectadas, e foi considerado alterado se este perfil apresentou uma resposta imunológica significativamente diferente. Para comparação, utilizamos os seguintes parâmetros: testes de RH, dosagem dos isótipos IgG1 e IgG2a, produção de citocinas (IFN-γ, IL-4 e IL-10), análise histopatológica, marcadores de atividade celular e presença de células Tregs.

4.6 PARASITOLÓGICO DE FEZES

As fêmeas foram infectadas por via cutânea com 20 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni.* Após 45 dias de infecção, os camundongos fêmeas foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram confeccionadas 3 lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) para determinação da infecção e quantificação do número de ovos por grama de fezes. As fêmeas submetidas ao procedimento de infecção que não apresentaram ovos nas fezes foram excluídas do estudo.

4.7 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTO

Após 60 dias de infecção, as 15 fêmeas infectadas tiveram seu estro sincronizado (FOWLER; EDWARDS, 1957; WANG et al., 2001) com a administração de hormônios. No primeiro dia foi administrado 5UI (100µL) de eCG (Gonadotrofina Coriônica Eqüina) e no terceiro dia 5UI (100µL) de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana), posteriormente as fêmeas foram acasaladas individualmente e foi observada a formação do *plug* vaginal para confirmação do acasalamento. O mesmo procedimento foi realizado nas 15 fêmeas não-infectadas.

4.8 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVOS DE *S. mansoni* (SEA)

Camundongos *Swiss webster* infectados por via cutânea com aproximadamente 150 cercárias de *S. mansoni*, foram perfundidos 60 dias após a infecção e tiveram seus fígados removidos. Os fígados foram cortados e embebidos em solução salina (NaCl) a 1,7% por 24 horas a 4°C. Após esse período, foram aquecidos a 37ºC sob agitação em banho-maria durante 2 horas. Posteriormente, os fígados foram triturados (em liquidificador comum) por 5 minutos e a suspensão foi filtrada em malha de 180µm e uma segunda vez em malha de 130µm. O material filtrado foi distribuído em cálices de sedimentação por 2 horas, para decantação. O sedimento foi depositado em tubos Falcon de 50mL siliconizados e submetido a cinco centrifugações a 200 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, desprezado e o precipitado ressuspendido em 10mL de solução salina 1,7%. Seguiu-se maceração manual com bastão de vidro na presença de inibidor de protease [EDTA (Ethylenediaminetetracetic acid, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) 1 mM em metanol, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) 1 mM] resfriado.

Após a maceração, todo o material foi ultrassonicado em três ciclos de 20 pulsos, sendo cada pulso de 60 segundos a uma potência de 25W (Processador Ultrassônico 500 Watts, Cole Parmer: modelo 501). O material foi ultracentrifugado a 10^4 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante submetido à nova ultracentrifugação a 10^5 x g por 1 hora a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi dialisado contra água deionizada, utilizando-se membrana de celulose para diálise, com capacidade de reter proteínas de peso molecular a partir de 12 kDa, para completa retirada dos sais presentes no antígeno. As proteínas do antígeno foram dosadas através do método de Bradford (1976) e seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% na presença de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) e corados pelo Coomassie Brilliant Blue (LAEMMLI, 1970).

4.9 IMUNIZAÇÕES E INFECÇÃO

Os filhotes machos nascidos (MI), amamentados (AI), nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas ou nascidos/amamentados em fêmeas não-infectadas (Controle) foram imunizados no 45° dia de nascimento. Para a imunização foi injetado na base da cauda (via sub-cutânea) 100μg/camundongo de ovalbumina (OVA) 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) emulsificado na proporção 1:1 (vol/vol) em adjuvante completo de Freund - CFA (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), volume total de 0,1mL. Nos experimentos onde ocorreu administração dos antígenos parasitários, os animais foram infectados por via cutânea com 80 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni* e 60 dias após infecção foram imunizados com OVA em CFA ou receberam intraperitonealmente 200μg/camundongo de SEA e após 48 horas foram imunizados com OVA em CFA.

4.10 DEPLEÇÃO *IN VIVO* DA CITOCINA IL-10

Grupos com 5 filhotes machos nascidos das fêmeas infectadas (MI) ou nascidos/amamentados em fêmeas não-infectadas (Controle), duas horas antes da imunização com OVA em CFA, receberam intraperitonealmente 2mg/camundongo de anticorpo monoclonal anti-IL-10 (C252-2A5), em tampão salina fosfato (PBS 0,01M/ pH 7,2) estéril. O mesmo protocolo foi utilizado para outros 5 animais de cada grupo que receberam o anticorpo controle GL113 (IgG1 anti-β-galactosidase) (MACEDO et al., 1998).

4.11 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE

Para o desafio antigênico nas reações de hipersensibilidade foi utilizada ovalbumina (OVA) 2 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA). A OVA foi diluída em 2,5mL de solução salina e incubada por 1 hora em banho-maria a 80°C, com agitação de 15 em 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 7mL de solução salina e a suspensão homogeneizada cuidadosamente com uma pipeta Pasteur. Foi realizada centrifugação a 1.600 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e a OVA agregada ressuspendida em 2mL de solução salina.

Para o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade à OVA, os animais de todos os grupos foram desafiados no 8° dia após a imunização, no coxim plantar, com 30μL de OVA agregada (600μg/animal). Foram inoculados também 30μL da salina na pata contralateral. Um grupo de animais não-imunizados foi injetado da mesma forma, para controle da reação inflamatória inespecífica. A espessura da pata foi medida com paquímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan), entre 0,5 - 24 horas e os resultados foram expressos pela diferença entre as medidas das duas patas.

4.12 SANGRIA TOTAL PARA OBTENÇÃO DE PLASMA

Os animais de todos os grupos foram sangrados no 9° dia após a imunização, por punção cardíaca, após anestesia. O sangue foi coletado com seringa de 1mL heparinizada. O volume de 0,5mL de sangue, colhido de cada animal, foi diluído em 1mL de PBS 0,01M/ pH 7,2 e centrifugado a 400 x g por 3 minutos. Os plasmas (diluição final 1:5) foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem dos isótipos dos anticorpos (IgG1 e IgG2a).

4.13 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS

Os animais acima foram anestesiados e sangrados por punção cardíaca no 9° dia após a imunização. Os plasmas dos animais foram analisados individualmente por ELISA específico para IgG1 e IgG2a de camundongos. Placas de 96 poços "high binding" (Costar Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas "overnight" a 4ºC com 20μg/mL de OVA, diluídos em PBS 0,01M/ pH 7,2 (100μL/poço). As placas foram lavadas três vezes com PBS-T (tampão salina fosfato com 0,05% de Tween-20) e os poços foram então bloqueados com 200μL/poço de PBS-T contendo 3% de leite por 3 horas a 37°C. As placas foram lavadas com PBS-T e 200μL dos plasmas diluídos na razão 1:256 (IgG1) e 1:8 (IgG2a), em PBS-T com 0,5% de leite, foram adicionados aos poços para realização de uma diluição seriada, onde as amostras foram sequencialmente diluídas na razão de dois até atingir a diluição de 1:32.768 (IgG1) e 1:1.024 (IgG2a). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, após esse período foram novamente lavadas (3x), e 100μL de anticorpos de cabra específicos para IgG1 (1/2.000) ou anti-mouse IgG2a (1/500) conjugadas à peroxidase (Southern Biotechinology Associates, Inc, AL, USA) foram adicionados a cada poço, com posterior incubação de 1 hora

a 37°C. As placas passaram por um novo ciclo de lavagens com PBS-T e 100μL/poço do substrato contendo 10mg de cromógeno OPD (Ortho-phenyldiamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA), 10mL de tampão citrato 0,1M / pH 5,5 e 10μL de água oxigenada 30% foi adicionado a cada poço. Dez minutos depois, a reação foi parada pela adição de 100μL de ácido cítrico 0,2M e as placas foram lidas no leitor de ELISA (OD_{450}). Para análise dos resultados, foi escolhida uma diluição referente à parte linear da curva de titulação: para o isótipo IgG1 1:2.048 (experimentos pós-infecção e administração de SEA) ou 1:8.192 (experimento anti-IL-10) e para o isótipo IgG2a 1:16 (em todos os experimentos).

4.14 CULTURA CELULAR PARA DOSAGEM DE CITOCINAS

Os baços dos filhotes foram retirados após 9 dias de imunização. Suspensões de células esplênicas dos animais nos diferentes grupos foram obtidas assepticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) complementado com HEPES (10mM), 2-mercaptoetanol (0,05mM), 216mg de L-glutamina e antibiótico gentamicina 50mg/L. Após centrifugação de 400 x g por 10minutos a 4°C, as hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 18 segundos (1mL/baço). As células foram ressuspendidas em meio RPMI complementado e mantidas no gelo por 5 minutos para deposição dos grumos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, foi realizada uma nova centrifugação de 400 x g por 10 minutos a 4ºC e o precipitado foi ressuspendido em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Cutilab Mat. Cult. Cel. Ltda,. Campinas, SP). A contagem das células e o teste de viabilidade foram realizados com o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%. As células ressuspendidas foram cultivadas numa concentração de 10^7 (24 horas) e 6 x 10^6 células viáveis/poço (72 horas), em duplicata, em placas de 24 poços (Costar Cambridge,

MA, USA) e estimuladas com OVA (500μg/mL), SEA (20μg/mL) ou Con-A (5μg/mL). As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO_2 5%, e após 24 e 72 horas os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção das citocinas IL-4 (24 horas), IFN-γ e IL-10 (72 horas).

4.15 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas IL-4, IFN-γ e IL-10 no sobrenadante das células esplênicas foram determinados por ELISA sanduíche. Placas de ELISA (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com os primeiros anticorpos de captura [anti-IL-4 (11B11 a 4μg/mL), diluído em PBS (0,01M/ pH 7,2), anti-IFN-γ (AN18 a 4μg/mL) e anti-IL-10 (JES5-2A5 a 8μg/mL), diluídos em tampão carbonato (pH 9,6)], sendo distribuídos 50μL em cada poço da placa e incubadas "overnight" a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (tampão de lavagem) e bloqueadas por 30 minutos à temperatura ambiente com 150μL de PBS-T com 10% de SBF. Após esse período, as placas foram novamente lavadas 3x com PBS-T e, em seguida, adicionados 50μL dos respectivos padrões recombinantes de camundongos: rIL-4, rIFN-γ e rIL-10 ou das amostras, em duplicata, nas diluições adequadas em meio RPMI 1640 com 5% de SBF. As placas foram incubadas "overnight" a 4°C, posteriormente foram lavadas com PBS-T e 50μL dos segundos anticorpos biotinilados [anti-IL-4 (BVD6-24G2 a 1μg/mL), anti-IFN-γ (XGM1.2 a 2μg/mL) e anti-IL-10 (SXC-1 a 2μg/mL)], diluídos em PBS-T + 0,1% de BSA, foram adicionados, seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T e o conjugado enzimático diluído 1/6000 (estreptoavidina marcada com peroxidase - Invitrogen Brasil Ltda.) em PBS-T com BSA 0,1% foi adicionado às placas (75μL/poço) e estas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram

lavadas mais três vezes e reveladas pela adição do substrato contendo H_2O_2 30% e o cromógeno ABTS [2,2`-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA] dissolvidos em tampão citrato fosfato de sódio (pH 5,5). A reação foi parada com ácido cítrico 0,2M (50μL/poço) e a leitura realizada em leitor de ELISA (OD_{405}). As quantidades de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas com base nas curvas-padrão, obtidas com concentrações de 0,3125 a 10ng/mL (rIL-4 ou rIL-10) ou de 2,5 a 80ng/mL (rIFN-γ).

4.16 MARCAÇÃO PARA ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Suspensões de células esplênicas dos diferentes grupos foram submetidas à dupla-marcação com anticorpos monoclonais conjugados a substâncias fluorescentes. Marcadores específicos para as moléculas de membrana de linfócitos B CD45R/B220 (PE-Cy5), células dendríticas CD11c (PE-Cy5) e co-estimulatórias [CD80, CD86, CD40 (PE)] foram utilizados. Para presença de Tregs as células foram marcadas com Foxp3 (PE) e CD4 (PE-Cy5). A aquisição das células duplamente marcadas e a análise dos dados foram realizadas no Citômetro de Fluxo BD FACSCalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) do CPqAM/FIOCRUZ.

4.17 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

Nos experimentos onde ocorreu infecção com 80 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni*, os fígados dos animais nos diferentes grupos foram analisados histopatologicamente para quantificação e determinação do tamanho dos granulomas. Para tanto, os fígados foram fixados em formol tamponado 10% e, em seguida, colocados em álcool 70%. O material foi

seccionado transversalmente e longitudinalmente, obtendo-se fragmentos, que foram desidratados em álcool etílico, diafanizados pelo xilol e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 5μm. Foram montadas as lâminas com os cortes obtidos, e em sequência, foi realizada à técnica de rotina com hematoxilina-eosina (H.E.) e tricrômico de Masson (T.M.) com posterior análise em microscópio óptico, com câmara digital acoplada a um computador com programa específico para análise de imagem.

4.18 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os animais utilizados neste estudo são heterogêneos. Deste modo, para os resultados dos testes de RH, imunoglobulinas e análise histopatológica os grupos foram comparados utilizando-se testes não-paramétricos, como o teste de Wilcoxon dupla-entrada (tratamento x tempo) para as RH e Kruskal-Wallis para estas últimas análises. Nos casos em que a análise se mostrou significantemente diferente, procedeu-se a comparação utilizando-se o teste de Mann-Whitney, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para os resultados das dosagens de citocinas e citometria de fluxo (Tregs), a comparação entre os diferentes grupos de animais foi feita utilizando-se uma análise de variância para dados paramétricos (ANOVA), uma vez que para a realização da cultura celular, com posterior dosagem de citocinas e marcações, foram formados subgrupos em cada grupo de estudo. Nos casos em que esta análise se mostrou significativamente diferente, procedeu-se a comparação múltipla segundo o método de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para os resultados da citometria de fluxo (APCs) utilizou-se o ANOVA dupla-entrada devido às observações em diferentes tempos, seguida pelo método de Tukey. Nos testes estatísticos foram considerados significativos valores de $\rho < 0.05$. O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 3.02.

4.19 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-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-FIOCRUZ (**ANEXO A**).

5 RESULTADOS

5.1 TRATAMENTO ANTI-IL-10

O estudo da participação da IL-10 no processo de imunossupressão anti-OVA observado nos animais nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* foi publicado na revista Parasitology Research (Santos et al., 2010; **ANEXO B - Table 1**) complementando os resultados anteriormente obtidos no Mestrado (SANTOS, 2008). A IL-10 esteve comprometida com a supressão de anticorpos IgG1 e IgG2a nos camundongos adultos nascidos de mães esquistossomóticas (grupo MI+OVA), uma vez que após tratamento destes animais com o anticorpo monoclonal anti-IL-10 houve restauração dos níveis de IgG1 e IgG2a, bem como das reações de hipersensibilidade (6 e 9 horas) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tratamento *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-IL-10 na produção de IgG1 e IgG2a OVA-específicas e nas reações de hipersensibilidade (RH) em camundongos nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni*

Grupos[a]	IgG1[b]	IgG2a	RH (6h)[c]	RH (9h)
Controle+OVA GL113	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,08	45 ± 3,5	75 ± 5,0
Controle+OVA 2A5	0,25 ± 0,07	0,6 ± 0,3	75 ± 5,0	90 ± 12,0
MI+OVA GL113	0,10 ± 0,05*	0,04 ± 0,02*	30 ± 4,1*	45 ± 9,6*
MI+OVA 2A5	0,30 ± 0,05**	0,6 ± 0,3**	65 ± 5,8**	80 ± 5,1**

*$\rho < 0,05$, MI+OVA GL113 comparado ao Controle+OVA GL113; **$\rho < 0,05$, MI+OVA 2A5 comparado ao MI+OVA GL113.

[a] Camundongos nascidos de mães infectadas (MI) e não-infectadas (Controle) submetidos à injeção i.p. de 2mg/animal do anticorpo monoclonal anti-IL-10 (2A5) ou do anticorpo controle GL113 (IgG1 anti-β-galactosidase), 2 horas antes da imunização com OVA.

[b] Níveis dos anticorpos OVA-específicos IgG1 e IgG2a produzidos pelos grupos MI+OVA ou Controle+ OVA, previamente injetados com 2A5 ou GL113, 9 dias após a imunização com OVA. Dosagem dos plasmas por ELISA. Os resultados representam a mediana das D.O. ± erro padrão de 5-7 animais na diluição de 1:8.192 (IgG1) e 1:16 (IgG2a).

[c] Aumento da espessura da pata, nas 6 e 9 horas, em resposta à OVA ± erro padrão de 5-7 animais dos grupos MI+OVA ou Controle+OVA, previamente injetados com 2A5 ou GL113. Os camundongos foram desafiados na pata com OVA agregada 8 dias após a imunização com OVA.

5.2 ARTIGO 1

Artigo submetido ao Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (**APÊNDICE A/ ANEXOS C e D**)

ESQUISTOSSOMOSE MATERNA ALTERA A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS EM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS DOS SEUS DESCENDENTES NA VIDA ADULTA

Patrícia d`Emery Alves Santos[1], Virgínia Maria Barros de Lorena[2], Érica de Souza Fernandes[1], Iana Rafaela Fernandes Sales[1], Yara de Miranda Gomes[2], Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque[1,3], Vlaudia Maria Assis Costa[1,3], Valdênia Maria Oliveira de Souza[1,4]

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

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

[3]Departamente de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

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

[*]Endereço para correspondência: valdenia.souza@ufpe.br

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

Apoio Financeiro: FACEPE, CNPq.

Resumo

Camundongos descendentes de mães esquistossomóticas apresentam, na vida adulta, alterações na resposta imune para o antígeno heterólogo, ovalbumina (OVA). A prévia amamentação em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* induz aumento na produção de anticorpos anti-ovalbumina, enquanto na gestação essa produção é prejudicada. Neste trabalho, investigamos a expressão de moléculas co-estimulatórias em resposta à OVA nas células apresentadoras de antígenos (APCs) de camundongos descendentes de mães esquistossomóticas. Camundongos machos recém-nascidos foram divididos em três grupos: animais nascidos de mães infectadas (MI) e amamentados por mães não-infectadas, animais de mães não-infectadas e amamentados em mães infectadas (AI), e animais nascidos e amamentados em mães não-infectadas (Controle). Os descendentes adultos foram imunizados com OVA+adjuvante, e 3-8 dias após a imunização, realizou-se a dupla marcação (CD45R/B220 ou CD11c e CD80, CD86, CD40 ou HLA-DR) nas células esplênicas. Em comparação ao grupo Controle, foi observado um aumento precoce na frequência de células B CD40+/CD80+ em camundongos do grupo AI, sem nenhuma alteração nas células CD11c+. Por outro lado, nos animais do grupo MI, a frequência de células CD11c+/CD86+ e células B CD40+/CD80+/CD86+ foi drasticamente reduzida. Em conclusão, a prévia amamentação em mães esquistossomóticas resulta em uma melhor apresentação de antígenos pelas células B nos descendentes adultos, enquanto que a gestação nessas mães predispõe seus descendentes a uma fraca apresentação antigênica pelas APCs durante a resposta imune a um antígeno heterólogo.

Palavras-chave: Esquistossomose Maternal; Amamentação; Gestação; Moléculas Co-estimulatórias; Descendente Adulto.

Introdução

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* é altamente prevalente em regiões tropicais incluindo o Nordeste e Sudeste do Brasil (Barbosa et al. 2006). A esquistossomose é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tardia com conseqüente inflamação granulomatosa acompanhada de fibrose em torno dos ovos do parasita presentes, principalmente, no fígado e intestino (Wynn et al. 2004). Os antígenos dos ovos de *S. mansoni* induzem uma resposta imunológica de perfil predominantemente Th2 (interleucina (IL)-4, IL-13, IL-10, infiltrado eosinofílico e fibrose) (Pearce et al. 1991, Wynn et al. 2004), além de geração de células T regulatórias (Taylor et al. 2006, Wilson et al. 2007). Em áreas onde a esquistossomose é endêmica, é comum observar gestantes cronicamente infectadas pelo *S. mansoni* (Barbosa et al. 2006). Sendo relatada uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni* em camundongos nascidos de mães esquistossomóticas maciçamente infectadas (Lenzi et al. 1987, Attallah et al. 2006, Caldas et al. 2008).

No entanto, em relação à resposta dos descendentes aos antígenos heterólogos após exposição *in utero* às infecções esquistossomóticas materna, ainda são poucos os estudos realizados (Noureldin & Shaltout 1998). Recentemente, em um estudo experimental, foi demonstrado o efeito da gestação e da amamentação em mães infectadas pelo *S. mansoni* na resposta imune anti-ovalbumina (OVA) nos descendentes na vida adulta. Animais adultos previamente amamentados em mães infectadas apresentaram a resposta humoral OVA-específica potencializada. Por outro lado, a gestação em mães esquistossomóticas comprometeu a resposta imune OVA-específica dos descendentes de maneira IL-10-dependente (Santos et al. 2010).

O desenvolvimento das respostas imunológicas celular e humoral contra antígenos protéicos é desencadeado pela interação entre os linfócitos T CD4+ e as células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo células dendríticas (DCs), linfócitos B e macrófagos. Após o reconhecimento dos antígenos apresentados pelas DCs aos linfócitos T virgens, a proliferação e diferenciação das células T em células T efetoras, bem como a completa ativação dos linfócitos B requer a ligação da molécula CD28 presente nas células T com as moléculas co-estimulatórias CD80 (B7.1) e o CD86 (B7.2) constituintes das APCs (Kearney et al. 1995, Bluestone 1995). No entanto, as moléculas CD80 e CD86 também podem se ligar ao antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) das células T, uma molécula que induz sinais intracelulares que inibem a ativação dos linfócitos T (Tivol et al. 1995, Waterhouse et al. 1995). Os níveis de CD80 e CD86 expressos pelas APCs podem interferir na resposta imunológica resultante dependente de CD28 ou de CTLA-4. Além disso, o CD40 ligante (CD40L) presente nos linfócitos T interagem com as moléculas de CD40 das APCs. Essa interação CD40-CD40L é necessária para diferentes funções efetoras: além de participar da ativação dos linfócitos T, melhoram a capacidade de captura e apresentação de antígenos pelas APCs e auxiliam na troca isotípica dos linfócitos B (van Kooten & Banchereau 1997).

Neste estudo, analisamos a expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs de camundongos adultos descendentes de mães esquistossomóticos para tentar explicar o potencial imunossupressor induzido pela gestação, bem como a potencialização na produção de anticorpos devido à amamentação prévia nessas mães. Para isto, linfócitos B e células esplênicas CD11c+ de camundongos adultos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* foram analisadas quanto à expressão das

moléculas CD40, CD80 e CD86 após imunização com OVA. Nossos resultados demonstram que a gestação em mães infectadas prejudica a expressão das moléculas co-estimulatórias nos linfócitos B (CD45R/B220+) e APCs mielóides (CD11c+), ao passo que a amamentação em mães esquistossomóticas favorece a expressão de CD40 e CD80 pelos linfócitos B em resposta a OVA. Assim, a esquistossomose materna pode imprimir nos descendentes adultos uma resposta imune alterada a antígenos protéicos não-parasitários.

Materiais e Métodos

Infecção pelo *S. mansoni* e amamentação adotiva

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss webster* com 4 semanas de idade foram infectados, subcutaneamente, com 20 cercárias da cepa São Lourenço da Mata (SLM) de *S. mansoni*. No 60° dia pós-infecção, ocorreu sincronização dos estros com a administração de 5UI (100µl) do hormônio eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) e, após 48 horas, mais 5UI (100µl) do hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) (Fowler & Edwards 1957). As fêmeas foram acasaladas individualmente com um único macho e foi observada a formação do "plug" vaginal para confirmação do acasalamento. Os mesmos procedimentos foram realizados nas fêmeas não-infectadas.

Imediatamente após o nascimento, filhotes de mães infectadas e de mães não-infectadas tiveram suas mães trocadas para a amamentação adotiva. Assim filhotes de mães infectadas foram amamentados por mães não-infectadas (MI) e filhotes de mães não-infectadas foram amamentados por mães infectadas (AI). Alguns animais nascidos de mães não-infectadas permaneceram amamentando nas próprias mães (Controle). Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação

Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil. Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco.

Imunização e grupos de estudo

Os filhotes machos, com 6 semanas de idade, foram selecionados para a formação dos grupos experimentais e controle. Os animais foram imunizados, subcutaneamente, com 100μg de ovalbumina (OVA) 5 vezes cristalizada (Sigma-Aldrich) emulsificada em Adjuvante Completo de Freund (CFA) (Sigma-Aldrich), na base da cauda (0,1 ml/animal). Ocorreu a formação de 6 grupos (n=10): (1) animais MI+OVA; (2) animais MI não-imunizados; (3) animais AI+OVA; (4) animais AI não-imunizados; (5) animais Controle+OVA e (6) animais Controle não-imunizados.

Marcações *ex vivo*

Animais dos grupos experimentais e controle tiveram seu baço coletado 3, 5 e 8 dias após a imunização com OVA. Os baços foram cortados e deixados por 1 hora a 37°C em placas de petri estéreis na presença de colagenase (1mg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A suspensão celular obtida foi lavada com meio RPMI 1640 (Sigma Chemical) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich), 0,1mM de L-glutamina, 0,5mM 2-mercaptoetanol e 1% de penicilina e estreptomicina. Ocorreu dupla-marcação das células esplênicas após incubação (4^oC por 30 min.) com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos na concentração de 0,5 mg/10^6 células: CD45R/B220 (PE-Cy5 anti-mouse) ou CD11c (PE-Cy5 anti-mouse) *versus* CD80 (PE anti-mouse), CD86 (PE anti-mouse), CD40 (PE anti-mouse) ou HLA-DR

(PE anti-mouse) (todos da BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Controles isotípicos conjugados a PE-Cy5 ou PE também foram utilizados. Após a marcação, as células foram lavadas com PBS contendo azida sódica (0,1%) e soro bovino fetal (3%) e centrifugadas. O "pellet" celular foi ressuspendido em PBS com paraformaldeído (0,5%) e mantido a 4°C até o momento da aquisição.

Análise por Citometria de Fluxo

A aquisição das células duplamente marcadas foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) com obtenção de no mínimo 10.000 eventos por amostra. A frequência de células positivas foi determinada através do programa Cell Quest Pro em duas regiões. A região dos linfócitos que foi determinada usando os parâmetros de granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). E a região das células apresentadoras de antígenos que foi selecionada com base na granulosidade e na expressão do CD11c+ (Fig. 1a) ou B220+ (Fig. 1b). Os limites dos quadrantes marcados foram sempre definidos com base nas populações negativas e na marcação dos controles isotípicos. Foi realizada a análise da frequência das células duplo-marcadas (quadrante superior direito). Para análise estatística das frequências das células duplo-marcadas, foram consideradas diferenças significativas entre os grupos valores de $\rho<0.05$ após realização da comparação através da análise de variância (ANOVA) seguida da comparação múltipla usando o teste de Mann-Whitney. Todas as etapas foram realizadas em triplicata, para confirmação dos resultados.

Resultados

Expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 nas APCs mielóides (CD11c+) de descendentes adultos de mães esquistossomóticas

A frequência de células CD11c+ expressando CD80 e CD86 foi analisada em células esplênicas de camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni* nos dias 3, 5 e 8 após a imunização com OVA. A frequência desse subtipo celular também foi obtida em camundongos não-imunizados (Fig. 2a). A frequência das células CD11c+/CD86+ é similar entre os grupos experimentais e controle nos dias 3 e 5 pós-imunização (Fig. 2b e 2c). Por outro lado, no 8° dia pós-imunização (Fig. 2d), nos animais nascidos de mães infectadas (MI+OVA), a frequência de células CD11c+ expressando a molécula CD86 foi reduzida em comparação ao grupo Controle+OVA e aos animais amamentados em mães infectadas (AI+OVA) (Controle+OVA=0,3%; MI+OVA=0,1%; AI+OVA =0,27%).

Não houve diferença entre os grupos na frequência das células CD11c+ expressando a molécula CD80 em nenhum dos tempos analisados após imunização com OVA. Também não observamos diferenças entre os grupos experimentais e controle quando analisada a expressão da molécula CD40 nas células CD11c+ nos dias 3, 5 e 8 pós-imunização.

A gestação ou a amamentação em mães infectadas pelo *S. mansoni* não altera a intensidade da expressão da molécula HLA-DR na superfície das células CD11c+ (dados não mostrados).

Gestação e amamentação em mães esquistossomóticas alteram a expressão de CD80, CD86 e CD40, em resposta a ovalbumina, nos linfócitos B de descendentes adultos

A frequência dos linfócitos B expressando CD80 e CD86 está representada na figura 3. Os grupos experimentais e controle apresentam uma alta quantidade de células B220+/CD86+ no 3° dia pós-imunização com OVA (Fig. 3a e 3b). O percentual de células expressando B220 e CD86 é drasticamente diminuído no 8° dia pós-imunização (Fig. 3d), mas neste último tempo de observação os níveis são reduzidos de forma mais intensa no grupo MI+OVA em comparação ao grupos Controle+OVA e AI+OVA (Controle+OVA=1,2%; MI+OVA =0,2%; AI+OVA=1,2%).

Com relação às células B220+/CD80+, no 3° dia pós-imunização, animais previamente amamentados em mães infectadas apresentaram um aumento na frequência das células duplo-positivas (Controle=1,4%; MI=1,8%; AI=3,5%) (Fig. 3b). Houve uma alta frequência destas células no 5° dia pós-imunização (Controle=12,2%; MI=16,1%; AI=13,7%) tanto nos grupos experimentais como no grupo controle (Fig. 3c). No 8° dia, a frequência de células B expressando a molécula CD80 decaiu para níveis similares nos grupos Controle+OVA e AI+OVA. Já nos animais nascidos de mães infectadas, neste tempo de observação, a queda na frequência das células B220+/CD80+ foi muito mais brusca em comparação aos animais dos grupos Controle+OVA e AI+OVA (Controle=4,2%; MI=0,9%; AI=2,9%) (Fig. 3d).

Em resposta a imunização com OVA, animais do grupo AI+OVA apresentaram um aumento de seis vezes na frequência de células B220+ expressando a molécula co-estimulatória CD40 logo no 3° dia pós-imunização (Fig. 3b). Esse comportamento também foi observado no grupo MI+OVA, mas em menor intensidade (quatro vezes; Controle+OVA=2,5%, MI+OVA=10,2%, AI+OVA=15,3%; Fig. 3b). Em todos os grupos, foi observada uma alta frequência de células B220+/CD40+ no 5° dia (Fig. 3c), seguida por uma queda nesta frequência no 8° dia (Fig. 3d). No entanto, no ultimo dia

de observação, animais do grupo MI+OVA apresentaram muito menos células duplo-positivas (0,7%) do que os descendentes adultos dos grupos Controle (2,7%) e AI (1,6%) imunizados.

Nem a gestação nem a amamentação em mães infectadas altera a intensidade da expressão da molécula HLA-DR na superfície dos linfócitos B (dados não mostrados).

Discussão

Nós demonstramos que a gestação em mães infectadas pelo *S. mansoni* influenciou a imunidade dos seus descendentes a longo prazo por suprimir a resposta imune humoral contra o antígeno heterólogo, ovalbumina. Em contraste, a amamentação em mães infectadas melhorou a resposta imune humoral para este antígeno na vida adulta (Santos et al. 2010). Neste trabalho, demonstramos que, nos descendentes adultos nascidos de mães esquistossomóticas, a capacidade de apresentação antigênica das APCs após ativação da resposta imune por antígeno protéico foi enfraquecida. Por outro lado, o contato prévio com leite de mães infectadas aumentou a capacidade das células B para apresentar antígeno após estímulo OVA-específico.

Para dar continuidade ao desenho do estudo anterior (Santos et al. 2010), todos os descendentes foram submetidos à imunização com OVA, emulsificada em adjuvante, para ótimas condições de ativação das células Th contra um antígeno proteíco solúvel. De forma geral, são necessários cerca de 1-7 dias para que uma resposta imune eficaz ocorra nos órgãos linfóides secundários, com o contacto inicial das DCs com células Th virgens (1-3 dias) e depois o contato dos linfócitos B com células Th ativadas (3-7 dias). A dinâmica da expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs pode diferir

dependendo do estímulo antigênico (vírus, bactérias, infecções parasitárias ou imunizações protéicas), e levar a diferentes respostas imunes. A imunização com OVA em adjuvante induz uma resposta imune efetiva, com troca isotípica de anticorpos e presença de citocinas no oitavo dia pós-imunização (Ferreira et al. 1995, Souza et al. 2002). Aqui, a análise das APCs de descendentes adultos de mães não-infectadas imunizados com OVA demostrou que as moléculas CD80 e CD40 nas APCs poderiam ser melhor detectadas no dia 5, e o CD86 pode ser melhor detectado no dia 3 pós-imunização. Esta última molécula é expressa constitutivamente e sua regulação ocorre rapidamente logo após o reconhecimento do antígeno (Hathcock et al. 1994).

Analisando os descendentes adultos de mães infectadas pelo *S. mansoni* (grupo MI) imunizados com OVA, a gestação induz freqüências semelhantes de células CD11c+/CD80+ e CD40+ como as observadas nos filhotes nascidos de mães não-infectadas. No entanto, houve uma notável deficiência de células CD11c+/CD86+ 8 dias após a imunização com OVA. Straw et al. (2003) demonstraram que a infecção murina pelo *S. mansoni* induz elevada expressão de CD80 e CD40, mas não de CD86, em DCs purificadas. Sendo assim, é possível que devido ao efeito da prévia infecção materna, tenha havido uma maior facilitação em diminuir a expressão da molécula CD86 e menor capacidade em alterar a expressão de moléculas de CD80 e CD40 nos animais MI.

Sabe-se que a interação preferencial entre CD86:CD28 durante o contato inicial das DCs com as células T é necessária para estímulo da resposta imune, enquanto que a interação do CD80:CTLA-4 induz à não responsividade das células T (Judge et al. 1999). Nos descendentes do grupo MI, as APCs podem favorecer uma sinalização através do CD80 em suas interações com as células T, ao invés da sinalização via

molécula co-estimulatória CD86, resultando em comprometimento da resposta humoral dependente das células T nestes animais (Santos et al. 2010).

Com relação aos linfócitos B, animais do grupo MI apresentam uma frequência muito baixa de células B CD86+ ou CD80+ 8 dias após a imunização com OVA. Observamos um aumento no percentual de linfócitos B CD40+ logo no terceiro dia pós-imunização, mas este aumento foi acompanhado por uma drástica diminuição no oitavo dia, em comparação com o grupo Controle. Estes achados sugerem que, no grupo MI, a adequada ativação inicial das células B não se mantem. Anteriormente, nós demonstramos o efeito da IL-10 no microambiente como necessária para uma produção ineficaz de anticorpos nesses descendentes (Santos et al. 2010). Esta citocina pode modular a expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs (Moore et al. 2001) e as interações entre as células T específicas e as DCs, bem como entre as células T e B. Em conjunto, é possível que o perfil de expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs (células CD11c+ e B) dos animais do grupo MI podem não favorever a interação com as células T CD4+.

Descendentes amamentados em mães infectadas não apresentaram alterações significativas na quantidade de células CD11c+ expressando marcadores co-estimulatórios durante todo o período de análise da imunização com OVA. Em contraste, os linfócitos B dos descendentes adultos imunizados com OVA que tiveram contato prévio com o leite de mães infectadas apresentaram uma regulação positiva destes marcadores. Estes animais demonstraram um rápido aumento na frequência de células B expressando CD40 e CD80 (terceiro dia), seguido por um decréscimo para níveis semelhantes aos dos filhotes amamentados em mães não-infectadas (Controle+OVA). Embora a expressão do CD86 não tenha sido regulada positivamente

nos linfócitos B em resposta a OVA, o perfil de expressão para esta molécula foi semelhante ao do grupo Controle. Nossos dados indicam que estas células B melhoram a via de comunicação intercelular através da ligação do CD28 nas células T com o CD80/CD86 nas células B (Lumsden et al. 2003). Além disso, a interação do CD40/CD40L promove a manutenção da ativação das células T, e este é o principal mecanismo para as células T auxiliarem os linfócitos B na produção de anticorpos e na troca isotípica (van Kooten & Banchereau 1997, Lumsden et al. 2003).

Anticorpos anti-parasita e açucares oriundos do parasita estão presentes no leite de mães esquistossomótica (Lenzi et al. 1987, Attallah et al. 2003). Montesano et al. (1999) demonstraram a necessidade de anticorpos anti-SEA durante a amamentação para o aprimoramento da imunidade humoral anti-SEA nas infecções murinas pós-natais. Ovos e vermes de *S. mansoni* compartilham com o leite materno o açúcar imunomodulador, Lacto-N-Fucopentose III (LFNP-III) que induz a proliferação de linfócitos B (Thomas & Harn 2004). É possível que os anticorpos e os açúcares imunomoduladores presentes no leite de mães infectadas estimulem um estado de pré-ativação nas células B dos descendentes, aumentando assim a produção de anticorpos nos animais do grupo AI na vida adulta (Santos et al. 2010).

Em conclusão, é provável que mecanismos moduladores da produção de anticorpos após a imunização com OVA nos descendentes adultos de mães esquistossomóticas envolvam a expressão diferencial de moléculas co-estimulatórias nas células CD11c+ (baixo CD86) previamente "programado" durante a gestação, bem como nos linfócitos B (alto CD40/CD80) devido à amamentação nestas mães. Embora outras moléculas imunomoduladoras não tenham sido investigadas ainda, esse estudo destaca que a sensibilização no início da vida pode ter efeitos imunomoduladores, a

longo prazo, sobre a resposta a proteínas heterólogas (alérgenos, antígenos próprios ou vacinas), em indivíduos provenientes de áreas endêmicas para esquistossomose.

Agradecimentos

Agradecemos à Maria da Conceição Batista pela competente assistência técnica. Os autores também agradecem ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde - PDTIS/FIOCRUZ pelo uso de suas instalações. Este trabalho foi realizado em conformidade com as leis brasileiras.

Referências

Attallah AM, Ghanem GE, Ismail H, El Waseef AM 2003. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *Am J Trop Med Hyg 68*: 647-651.

Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-emshaty HM, Elsheikha HM 2006. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitol Res 99*: 137-145.

Barbosa CS, Favre TC, Wanderley TN, Callou AC, Pieri OS 2006. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101* (suppl.I): 55-62.

Bluestone JA 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity 2*: 555-559.

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMD, Oliveira RC, Gazzinelli G 2008. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop 108*: 109-117.

Ferreira AP, Faquim ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS 1995. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. *Cell Immunol 162*: 202-210.

Fowler RE, Edwards RG 1957. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrinol 15*: 374-384.

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med 180*: 631-640.

Judge TA, Wu Z, Zheng XG, Sharpe AH, Sayegh MH, Turka LA 1999. The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. *J Immunol 162*: 1947-1951.

Kearney ER, Walunas TL, Karr RW, Morton PA, Loh DY, Bluestone JA, Jenkins MK 1995. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J Immunol 155*: 1032-1036.

Lenzi JA, Sobral AC, Araripe Jr, Grimaldi Filho G, Lenzi HL 1987. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz 82*: 257-267.

Lumsden JM, Williams JA, Hodes RJ 2003. Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo. *J Immunol 170*: 781-787.

Montesano MA, Colley DG, Freeman GL, Secor WE 1999. Neonatal exposure to idiotype induces Schistosoma mansoni egg antigen-specific cellular and humoral immune responses. *J Immunol 163*: 898-905.

Moore KW, de Wall Malefyt R, Coffman RL, O`Garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol 19*: 683-765.

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

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med 173*: 159-166.

Santos PA, Sales IR, Schirato GV, Costa VM, Albuquerque MC, Souza VM, Malagueño E 2010. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res 107*: 95-102.

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS 2002. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res 35*: 81-89.

Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ 2003. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J Immunol 170*: 727-734.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol 176*: 5839-5847.

Thomas PG, Harn DAJ 2004. Immune biasing by helminth glycans. *Cell Microbiol 6*: 13-22.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity 3*: 541-547.

van Kooten C, Banchereau J 1997. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol 9*: 330-337.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science 270*: 985-988.

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol 85*: 148-154.

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev 201*: 156-167.

Figuras e Legendas

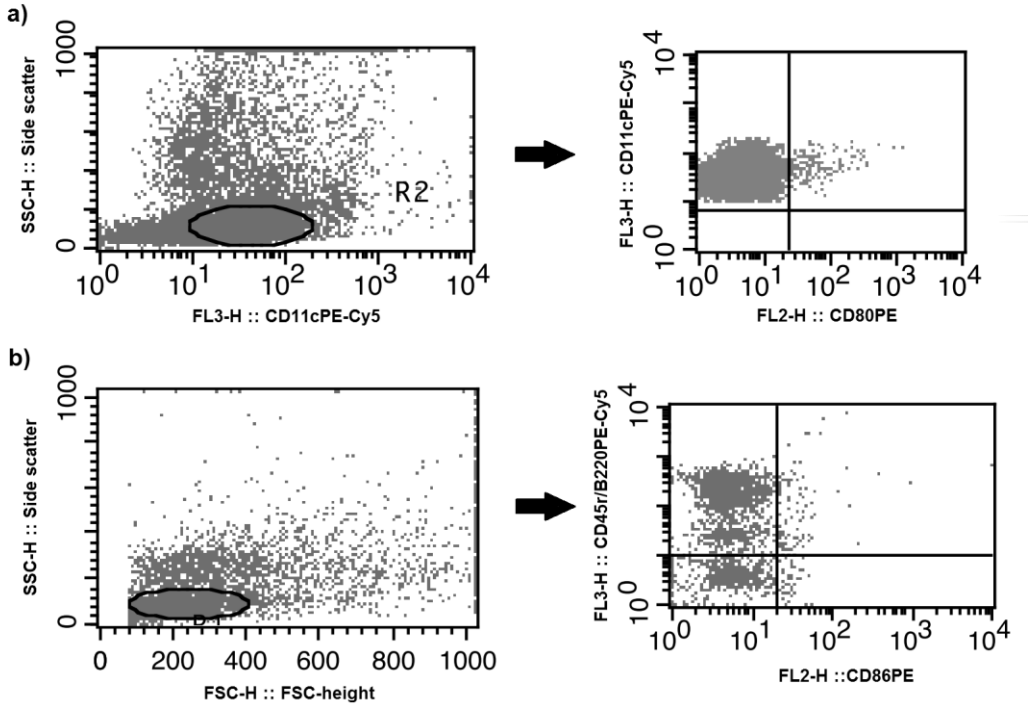


Figura 1. Seleção da janela de interesse para análise da expressão de moléculas co-estimulatórias nas APCs mielóides (CD11c+) (a) e nos linfócitos B (CD45/B220+) (b). A região celular foi determinada com base nos parâmetros de tamanho (Forward Scatter-FSC) e granulosidade (Side Scatter-SSC), posteriormente o dot-plot FSC *versus* SSC foi utilizado para determinar a frequência de células duplo-marcadas.

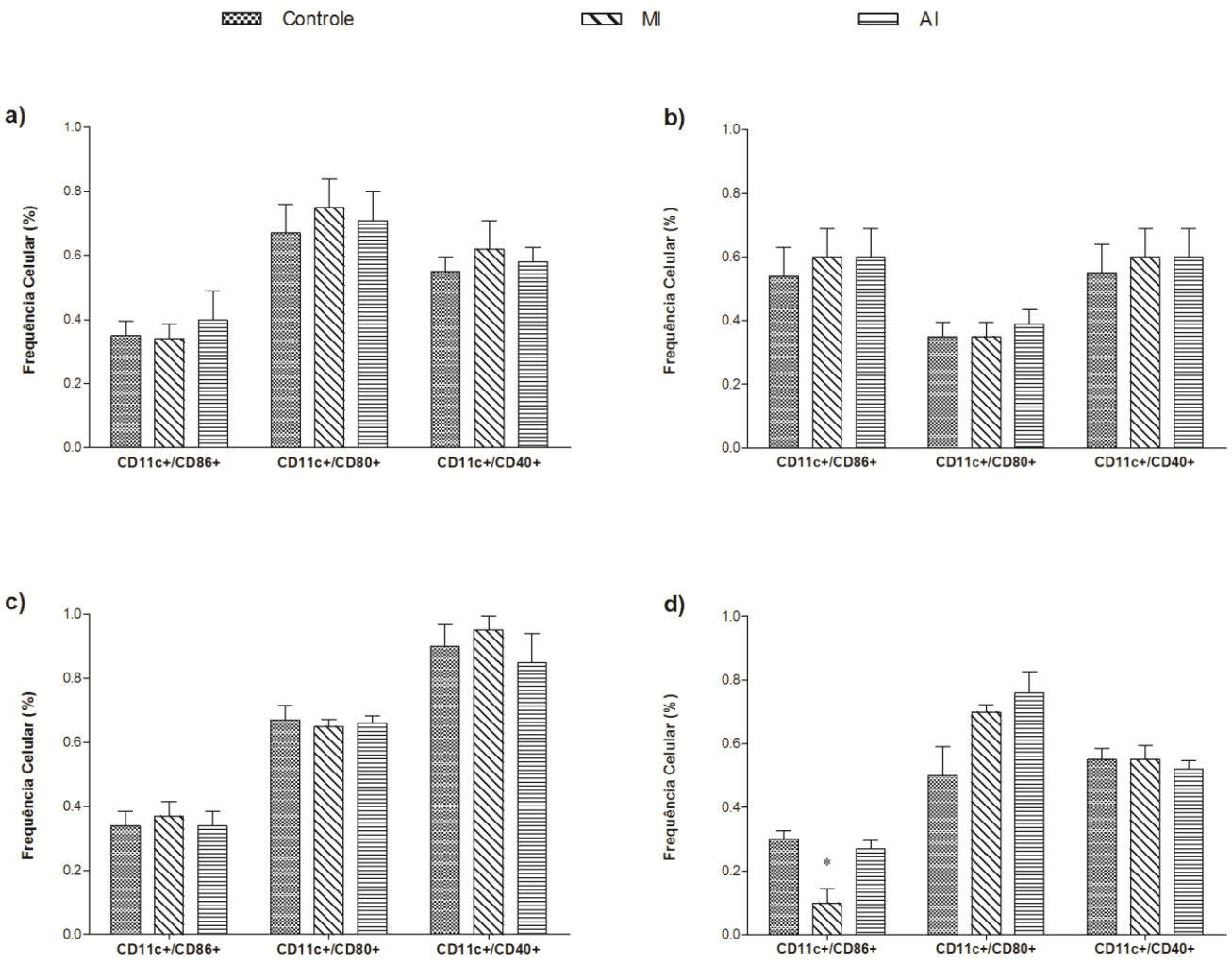


Figura 2. Expressão das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 nas APCs mielóides (CD11c+) em descendentes adultos de mães esquistossomóticas. A dupla-marcação foi realizada com anticorpos monoclonais anti-mouse conjugados a substâncias fluorescentes CD11c (PE-Cy5) *plus* CD80, CD86 ou CD40 (PE) em células de animais não-imunizados (a) ou no terceiro (b), quinto (c) e oitavo (d) dias pós-imunização com OVA em CFA. No oitavo dia pós-imunização (d), a frequência de células CD11c+ expressando CD86 foi reduzida nos animais nascidos de mães infectadas (MI+OVA) em comparação ao grupo Controle+OVA e aos animais amamentados em fêmeas infectadas (AI+OVA). Os resultados representam a mediana das frequências celulares de 7 animais/grupo ± erro padrão. *$p<0.05$ comparado ao grupo Controle+OVA.

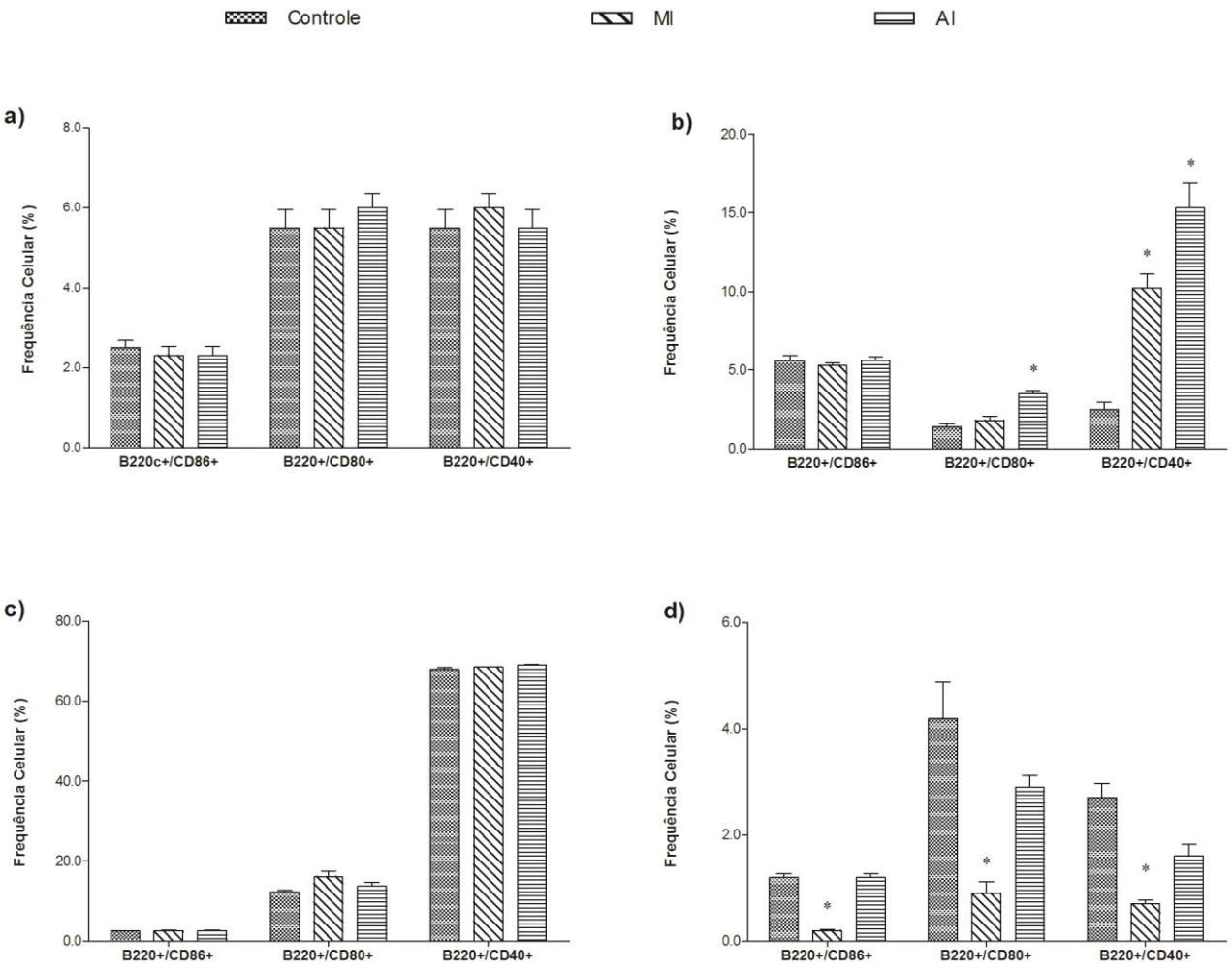


Figura 3. Frequência de células CD45/B220+ expressando CD80, CD86 e CD40 nas células esplênicas de camundongos nascidos (MI+OVA) ou amamentados (AI+OVA) em mães infectadas pelo *S. mansoni*. A dupla-marcação foi realizada com anticorpos monoclonais anti-mouse conjugados a substâncias fluorescentes CD45/B220+ (PE-Cy5) *plus* CD80, CD86 ou CD40 (PE) em células de animais não-imunizados (a) ou no terceiro (b), quinto (c) e oitavo (d) dias pós-imunização com OVA em CFA. Animais previamente amamentados em fêmeas infectadas apresentaram um aumento na frequência de células CD45/B220+ expressando CD40+ e CD80+ no terceiro dia (b) e declínio no oitavo dia (d) enquanto nos animais nascidos de mães infectadas a frequência destas células decresce em comparação aos animais dos grupos Controle+OVA e AI+OVA (d). Os resultados representam a mediana das frequências celulares de 7 animais/grupo ± erro padrão. *$p<0.05$ comparado ao grupo Controle+OVA.

5.3 ARTIGO 2

Artigo submetido ao International Journal for Parasitology (**APÊNDICE B/ ANEXOS E e F**)

A INFECÇÃO PÓS-NATAL INTENSIFICA A IMUNOMODULAÇÃO NEGATIVA PARA ANTÍGENO NÃO-RELACIONADO EM DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS

Patrícia d`Emery Alves Santos[1], Virgínia Maria Barros de Lorena[2], Érica de Souza Fernandes[1], Iana Rafaela Fernandes Sales[1], Yara de Miranda Gomes[2], Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque[1,3], Vlaudia Maria Assis Costa[1,3], Valdênia Maria Oliveira de Souza[1,4]

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

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

[3]Departamente de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

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

[*] Endereço para correspondência: V. M. O. Souza, Laboratório de Imunologia do LIKA/UFPE, Av. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil. E-mail: valdenia.souza@ufpe.br.
Tel.: + 55 81 2126 8484; Fax: + 55 81 2126 8485.

Apoio Financeiro: FACEPE, CNPq.

Resumo

Exposições prévias aos antígenos parasitários, durante infecções helmínticas maternas, podem alterar a imunidade para antígenos homólogos dos descendentes adultos em infecções pós-natais, porém pouco é sabido sobre a imunidade para antígenos heterólogos. Aqui, foi analisada a imunidade à ovalbumina (OVA), em descendentes adultos de mães esquistossomóticas, quando submetidos à infecção ou contato com antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma mansoni* (SEA). Camundongos machos, logo após amamentação adotiva, foram divididos em quatro grupos: animais nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados em mães esquistossomóticas (MIAI) e animais nascidos/amamentados em mães não-esquistossomóticas (CONTROLE). No 45º dia, foi conduzida a infecção (80 cercárias) ou administração i.p. de SEA, em parte dos animais CONTROLE essa etapa não foi realizada (NÃO-INFECTADOS/SEM SEA). Todos foram imunizados com OVA+adjuvante. Comparamos com animais CONTROLE as reações de hipersensibilidade *in vivo* (RH), os níveis de IgG1 e IgG2a, a produção de citocinas e a frequência de células T regulatórias (Tregs) em cultura de esplenócitos. A infecção em todos os grupos de descendentes favoreceu a produção de IL-4 e IL-10, bem como o aumento da frequência de Tregs, principalmente no grupo AI. Houve supressão da resposta de hipersensibilidade imediata anti-OVA e baixos níveis de IFN-γ, porém de forma mais intensa naqueles previamente amamentados e gerados em mães esquistossomóticas, respectivamente. Nos animais MI e AI, houve um favorecimento da supressão da imunidade anti-OVA, frente à sensibilização com SEA, sendo notados maiores níveis de IL-10 e maior frequência de células Tregs. Não houve alteração na produção de anticorpos anti-OVA para os grupos estudados. A infecção pós-natal nos descendentes MI e AI também proporcionou menores níveis de IL-4 e IFN-γ em comparação aos animais CONTROLE. Então, infecções pós-natais em descendentes de mães esquistossomóticas favorecem um forte potencial imunossupressor, principalmente naqueles que tiveram contato prévio com o leite destas mães.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Imunomodulação; Ovalbumina; Gestação; Amamentação; Descendentes.

1. Introdução

A esquistossomose é endêmica em 76 países, com estimativas de até 207 milhões de pessoas infectadas no mundo (Lustigman et al., 2012). No Brasil, a única espécie de *Schistosoma* encontrada é a *S. mansoni* (Amaral et al., 2006), responsável por uma infecção de curso crônico devido aos ovos que ficam retidos nos tecidos hepático e intestinal, provocando uma típica inflamação eosinofílica e reação granulomatosa, progressivamente substituídas por depósitos fibróticos (Gryseels et al., 2006). Contudo, em áreas endêmicas, a maioria dos pacientes apresenta a fase crônica assintomática com apenas 4-12% desenvolvendo manifestações graves da doença (Caldas et al., 2008). Este fato está relacionado a um fenômeno imunomodulatório, no qual a resposta inicial Th1 desenvolvida contra os antígenos cercarianos é inibida por uma forte e predominante resposta imune tipo Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-10, induzida pelos antígenos dos ovos (Pearce et al., 1991; Finkelman et al., 1991; Moore et al., 2001). Associada à estimulação de linfócitos T regulatórios (Tregs), secretores de grande quantidade de IL-10, que controlam a reação granulomatosa ao redor dos ovos no hospedeiro (McKee and Pearce, 2004). Estudos em animais e humanos demonstram que este perfil imunossupressor gerado pelas infecções por *S. mansoni* se estende às respostas Th1 e Th17 específicas para antígenos heterólogos virais ou bacterianos (Actor et al., 1993; Sabin et al., 1996) e doenças auto-imunes (La Flamme et al., 2003; Osada et al., 2009; Ruyssers et al., 2010). Além de atenuação das respostas Th2 nos quadros de reações alérgicas (Medeiros et al., 2003; Smits et al., 2007).

Existem aproximadamente 10 milhões de gestantes e 40 milhões de mulheres em idade fértil, cronicamente infectadas pelo *Schistosoma*, em áreas endêmicas (Friedman et al., 2007; Hillier et al., 2008) e a consequência da infecção materna na imunidade dos descendentes vem sendo investigada. Com relação aos antígenos homólogos, diante de infecções pós-natais, o fenômeno de

imunomodulação parece ser preservado. A exposição aos antígenos do parasita, bem como aos anticorpos maternos anti-*Schistosoma*, durante o período pré-natal e amamentação, esteve associada com a modulação da resposta imune dos descendentes. Foi relatada uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni* em camundongos nascidos e amamentados em mães esquistossomóticas e os níveis de expressão dos genes IL-12 e TGF-β, citocinas regulatórias, são significativamente maiores nos animais expostos à infecção pré-natal (Lenzi et al., 1987; Attallah et al., 2006; Othman et al., 2010). Contudo, pouco tem sido descrito sobre a imunomodulação no descendente para os antígenos heterólogos.

Estudo em humanos, desenvolvido com a espécie *Schistosoma haematobium*, demonstrou que a infecção materna por este trematódeo durante a gravidez diminuiu a eficácia da vacinação ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin) (Malhotra et al., 1999). Para antígenos vacinais, tem sido proposto que o prévio contato com componentes parasitários maternos pode influenciar a reposta imune a esses antígenos, nos descendentes analisados durante a infância (LaBeaud et al., 2009). Uma correlação positiva foi observada entre os níveis de IgE específica para antígeno de *S. mansoni* e as manifestações de alergia gastrointestinais, em crianças que receberam leite de mães infectadas (Noureldin and Shaltout, 1998). Em um estudo experimental, foi demonstrado o efeito da gestação e da amamentação, separadamente, em mães infectadas pelo *S. mansoni* na resposta imune anti-ovalbumina (OVA). Animais adultos previamente amamentados em mães infectadas apresentaram a resposta humoral OVA-específica potencializada e maior produção de IL-2. Por outro lado, a gestação em mães esquistossomóticas suprimiu a resposta imune OVA-específica dos descendentes de maneira IL-10-dependente (Santos et al., 2010).

Sabendo do risco dos descendentes adultos de mães esquistossomóticas, vivendo em área endêmica se infectarem com o parasita, nós analisamos a intensidade da resposta imune anti-OVA sob condições de contato pós-natal com antígenos do *S. mansoni*. Para isto, camundongos após amamentação adotiva, foram divididos em quatro grupos: animais nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães esquistossomóticas e animais

nascidos/amamentados em mães não-esquistossomóticas (CONTROLE). Quando adultos, os animais foram submetidos à infecção ou administração de SEA, seguida de imunização com OVA em adjuvante. Observamos que a infecção em todos os grupos de descendentes levou à supressão dos níveis de IFN-γ e da resposta de hipersensibilidade imediata anti-OVA, principalmente nos animais MI e AI, respectivamente. Ocorreu alta produção de IL-4 e IL-10, bem como aumento na frequência de células Tregs, principalmente naqueles previamente amamentados em mães esquistossomóticas. Na presença de SEA, ocorreu favorecimento da supressão da imunidade anti-OVA nos animais nascidos ou amamentados em mães infectadas, bem como, foram notados maiores níveis de IL-10 e maior frequência de Tregs. Não houve alteração na produção de anticorpos anti-OVA nos grupos de descendentes infectados ou que receberam SEA. Em conclusão, infecções pós-natais em descendentes nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas podem gerar um potencial imunossupressor para antígenos heterólogos, embora não alterem a produção de anticorpos. Este efeito parece ser mais evidente na presença de leite de mães esquistossomóticas.

2. Materiais e Métodos

Animais e Infecção pelo Schistosoma mansoni

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss webster* com 4 semanas de idade foram infectados por via subcutânea (s.c.) com 20 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni*. No 45º dia, a infecção foi confirmada pelo método de Kato-Katz (Katz et al., 1972). No 60º dia pós-infecção, ocorreu sincronização dos estros com administração de 5UI (100μL) do hormônio eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) e, após 48 horas, injeção de 5UI (100μL) de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) (Fowler and Edwards, 1957). As fêmeas foram acasaladas individualmente e foi observada a formação do "plug" vaginal para confirmação do acasalamento. O mesmo procedimento foi realizado com fêmeas não-infectadas. Filhotes machos com 6 semanas de idade foram utilizados para formação dos grupos experimentais e controles. Os camundongos foram

fornecidos e mantidos no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil. Os protocolos do estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos de Estudo e Protocolos de Imunização/Infecção

Imediatamente após o nascimento, os filhotes de mães infectadas pelo *S. mansoni* ou não-infectadas tiveram suas mães trocadas para amamentação adotiva. Assim, filhotes de mães infectadas mamaram nas mães não-infectadas (MI) e filhotes de mães não-infectadas foram amamentados pelas mães infectadas (AI). Outro grupo de animais nascidos de mães esquistossomóticas permaneceu amamentando nas próprias mães (filhotes nascidos/amamentados em fêmeas infectadas (MIAI)). Para o grupo controle foram utilizados animais nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE). Os filhotes machos, com 6 semanas de idade, foram infectados com 80 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni* (infecção confirmada pelo método de Kato-Katz) e, 60 dias após a infecção, foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com 100μg de ovalbumina (OVA; 5 vezes cristalizada; Sigma-Aldrich), emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich), na base da cauda (0,1mL/camundongo). A imunização também foi realizada em filhotes controle não-infectados. Ocorreu a formação de 5 grupos de estudo (n=5): (1) animais MI; (2) animais AI; (3) animais MIAI e (4) animais CONTROLE posteriormente infectados pelo *S. mansoni* e imunizados com OVA+CFA; e (5) animais CONTROLE NÃO-INFECTADOS e imunizados com OVA+CFA. Outros grupos de filhotes machos, com 6 semanas de idade, ao invés de serem infectados por cercárias de *S. mansoni*, receberam administração intraperitoneal (i.p.) de antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma mansoni* (SEA) e, após 48 horas, foram imunizados s.c. com OVA em CFA. A imunização também foi realizada em filhotes controle que não receberam SEA i.p. Ocorrendo a formação de mais 5 grupos

de estudo (n=5): (6) animais MI; (7) animais AI; (8) animais MIAI e (9) animais CONTROLE posteriormente administrados com SEA e imunizados com OVA+CFA; e (10) animais CONTROLE SEM SEA e imunizados com OVA+CFA.

Reações de Hipersensibilidade

As reações de hipersensibilidade (RH) imediata e tardia, nos diferentes grupos, foram mensuradas no 8º dia após a imunização com OVA. Resumidamente, os animais foram desafiados, no coxim plantar, com 30μL de OVA agregada 2%. Foram inoculados também 30μL da salina na pata contralateral. A espessura da pata foi medida com espessímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan), entre 0,5 - 24 horas e os resultados foram expressos pela diferença entre as medidas das duas patas. Os resultados representam a mediana ± erro padrão de todos os animais de cada grupo.

Dosagem de Anticorpos OVA-Específicos por ELISA

Os animais de todos os grupos foram sangrados no 9° dia após a imunização, por punção cardíaca, após anestesia intramuscular com Xilazina HCl/ Ketamina HCl. Os plasmas foram testados individualmente para dosagem dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA usando placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Roskilde, Denmark) sensibilizadas com OVA (20 μg/mL) e anticorpos de cabra específicos para IgG1 ou anti-mouse IgG2a conjugados à peroxidase (Southern Biotechinology Associates, Inc, AL, USA). As reações foram reveladas com solução de OPD (Ortho-phenyldiamine; Sigma) em tampão citrato 0,1M com H_2O_2. As placas foram lidas (450nm) no leitor de ELISA. Curvas de titulação foram realizadas para todas as amostras. Os resultados foram expressos pela mediana das densidades óticas (D.O.) dos plasmas de cada grupo numa diluição apropriada (dentro da parte linear na curva de titulação) para cada isótipo ± erro padrão (1:2.048 para IgG1 e 1:16 para IgG2a).

Cultura Celular

Após 9 dias de imunização, foram retirados os baços dos filhotes, nos diferentes grupos, após eutanásia por deslocamento cervical. Suspensões de células esplênicas foram obtidas assepticamente em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com HEPES (10mM), 2-mercaptoetanol (0,05mM), 216mg de L-glutamina, gentamicina (50mg/L) e 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas numa concentração final de 10^7 (24h) e 6 x 10^6 (72h) células/mL em placas de 24 poços (Costar Cambridge, MA, USA) e estimuladas com OVA (500μg/mL), SEA (20μg/mL) ou Con-A (5μg/mL). As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO_2 5%, e após 24h e 72h os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção das citocinas IL-4 (24h), IL-10 e IFN-γ (72h). As células cultivadas por 72h foram recuperadas e marcadas para detecção de células T regulatórias.

Dosagem de Citocinas

Os níveis das citocinas foram determinados por ELISA sanduíche utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: para IL-4, 11B11 e BVD6-24G2 biotinilado; para IL-10, C252-2A5 e SXC-1 biotinilado; e para IFN-γ, AN18 e XGM1.2 biotinilado. Ocorreu adição de estreptoavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich) e as reações foram reveladas com solução ABTS (2-2'-azinobis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulfonic acid); Sigma) em tampão citrato 0,1M com H_2O_2. As placas foram lidas (405nm) no leitor de ELISA. As quantidades de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas com base nas curvas-padrões dos recombinantes purificados das citocinas, obtidas com concentrações de 0,3125 a 10ng/mL (rIL-4 ou rIL-10) ou de 2,5 a 80ng/mL (rIFN-γ).

Marcações das Células T Regulatórias

As células esplênicas dos descendentes machos de todos os grupos foram submetidas à dupla-marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, específicos para presença

de células Tregs. As células foram ajustadas para uma concentração de $1x10^6$ células/mL com PBS+SBF 5% estéril e as marcações foram realizadas aos pares com adição de 1μL dos anticorpos de marcação: FoxP3 (PE) e CD4 (PE-Cy-5). A aquisição das células duplamente marcadas e a análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) do CPqAM/FIOCRUZ. Os resultados foram expressos pela média dos percentuais de células duplo-marcadas obtidos no "pool" dos baços de todos os animais em cada grupo ± desvio padrão.

Análises Estatísticas

Para a análise das reações de hipersensibilidade (RH) e produção de anticorpos diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas utilizando-se o teste de Wilcoxon (tratamento x tempo) e Kruskal-Wallis, respectivamente, seguido pela comparação múltipla usando o teste de Mann-Whitney. Para a análise das citocinas e citometria de fluxo, a comparação entre os diferentes grupos foi feita utilizando-se uma análise de variância para dados paramétricos (ANOVA), seguida pela comparação múltipla segundo o método de Tukey. O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e foram considerados significativos valores de $\rho<0.05$. Todas as etapas foram realizadas em triplicata, para confirmação dos resultados.

3. Resultados

3.1. As reações de hipersensibilidade imediatas anti-OVA são suprimidas após o contato com antígenos de *S. mansoni* e em maior intensidade em descendentes previamente amamentados em mães esquistossomóticas.

Os animais nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães esquistossomóticas, bem como animais nascidos/amamentados em fêmeas não-esquistossomóticas (CONTROLE) foram submetidos à infecção pós-natal e 60 dias depois imunizados com OVA em

adjuvante. Para avaliar *in vivo* as RH anti-OVA, todos os grupos foram desafiados com OVA agregada no coxim plantar e o edema foi medido. Esta mesma análise foi realizada em filhotes nascidos/amamentados em mães não-infectadas que não foram infectados pelo *S. mansoni* (CONTROLE NÃO-INFECTADOS).

Como ilustrado na figura 1A, todos os grupos infectados tiveram a reação de hipersensibilidade imediata (0,5 horas) estatisticamente menor quando comparados ao grupo que não foi infectado (CONTROLE NÃO-INFECTADOS). Esta supressão se mantém nas respostas imediatas medidas as 3 e 6 horas, sendo observada nas 9 horas apenas para o grupo AI. Este último grupo, nas 6 e 9 horas, também apresentou RH estatisticamente menor que a do grupo de descendentes de mães não-esquistossomóticas infectados (CONTROLE).

Com relação à resposta de hipersensibilidade tardia anti-OVA (24 horas), não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de animais descendentes de mães esquistossomóticas ou não-esquistossomóticas, submetidos à infecção pós-natal, e os animais do grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS.

A fim de avaliar a ação apenas dos antígenos dos ovos de *S. mansoni* nas RH anti-OVA dos descendentes de mães esquistossomóticas, todos os grupos receberam SEA (ao invés da infecção) e após 48 horas foram imunizados com OVA+CFA (Figura 1B). Em comparação ao grupo CONTROLE SEM SEA, observou-se que não houve diferença significante entre filhotes nascidos/amamentados em mães não-infectadas que receberam SEA (CONTROLE). Diferentemente, o grupo de animais nascidos de mães esquistossomóticas, MI, apresentou as reações de hipersensibilidades imediata da 0,5 e 3 horas estatisticamente menor. Nos grupos que receberam leite de mães infectadas, AI e MIAI, a diminuição das RH anti-OVA ocorreu nas 3 e 6 horas.

Com relação à resposta de hipersensibilidade tardia anti-OVA (24 horas), não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de animais descendentes de mães

esquistossomóticas ou não-esquistossomóticas, que receberam SEA, e animais do grupo CONTROLE SEM SEA.

3.2. A infecção pelo *S. mansoni* ou administração de SEA não alteram a produção de IgG1 e IgG2a anti-OVA específicas nos descendentes de mães esquistossomóticas na vida adulta.

Nove dias após a imunização, todos os grupos foram sangrados e os níveis de anticorpos no plasma foram medidos por ELISA. A produção de anticorpos IgG1 (Fig. 2A) e IgG2a (Fig. 2C) anti-OVA apresentou níveis similares entre os grupos de mães esquistossomóticas ou não, posteriormente infectados na vida adulta, sem diferenças significativas em relação ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS. O mesmo resultado foi observado quando os diferentes grupos receberam SEA quando adultos, sem diferenças significativas em relação ao grupo CONTROLE SEM SEA (Fig. 2B e 2D).

3.3. O contato com antígenos do *S. mansoni* favoreceu a produção de IL-4, porém em menor intensidade nos descendentes adultos de mães esquistossomóticas diante da infecção pós-natal.

Células esplênicas dos animais dos grupos estudados foram cultivadas na presença de OVA ou Con-A, por 24 ou 72 horas, e os sobrenadantes coletados para quantificação das citocinas secretadas. A figura 3A mostra que frente ao estímulo mitogênico houve produção de IL-4, significativamente maior, para todos os grupos de animais infectados, quando comparados ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS. Contudo, nos grupos de animais descendentes de mães esquistossomóticas a produção de IL-4 foi menor em comparação ao grupo de animais descendentes de mães não-esquistossomóticas infectado (CONTROLE). Além disso, apenas no sobrenadante deste último grupo foi detectado IL-4 sob o estímulo antigênico *in vitro* com OVA.

A figura 3B mostra os níveis de IL-4 nos diferentes grupos que receberam SEA na vida adulta. Foram detectados níveis desta citocina apenas sob estímulo com mitógeno. Nesta condição,

foram observados menores níveis de IL-4 para o grupo MIAI e maiores níveis de IL-4 nos grupos de animais amamentados (AI) ou gerados (MI) em mães esquistossomóticas, em comparação aos grupos CONTROLE e CONTROLE SEM SEA.

3.4. A infecção pós-natal levou a melhor produção de IL-10, principalmente nos descendentes amamentados em mães esquistossomóticas, enquanto a sensibilização com SEA favoreceu a produção de IL-10 nos descendentes gerados nestas mães.

Em relação à produção de IL-10, sob estímulo com Con-A, os animais quando infectados (MI, AI, MIAI e CONTROLE) produziram níveis significativamente maiores desta citocina do que os animais não-infectados (CONTROLE NÃO-INFECTADOS) (Fig. 4A). Quando observados apenas os grupos infectados, os níveis de IL-10 não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre todos os grupos e o grupo CONTROLE. Em resposta a OVA, a produção de IL-10 foi estatisticamente menor nos animais infectados (CONTROLE), nos animais gerados (MI) ou apenas amamentados (AI) em mães esquistossomóticas em comparação ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS imunizado com OVA. Enquanto houve produção maior desta citocina nos animais MIAI e imunizados com OVA, em relação ao CONTROLE.

Para os descendentes que receberam SEA, frente ao estímulo com Con-A, houve menor produção de IL-10 no grupo AI e no CONTROLE em relação ao grupo CONTROLE SEM SEA (Fig. 4B). Observando apenas os grupos que receberam SEA, os níveis de IL-10 são maiores nos animais do grupo MI em comparação ao CONTROLE. Sob estímulo de OVA, no grupo MI houve uma produção significativamente maior de IL-10, enquanto que no grupo CONTROLE a produção foi menor, em comparação ao grupo CONTROLE SEM SEA. Não houve diferença significativa para os animais que recebem leite de mães esquistossomóticas. Comparando apenas os grupos que receberam SEA, os níveis de IL-10 são maiores nos animais dos grupos MI, AI e MIAI em comparação ao CONTROLE.

3.5. Nos descendentes adultos o contato com antígenos do *S. mansoni* suprimiu a produção de IFN-γ, principalmente nos descendentes gerados em mães esquistossomóticas quando infectados.

Com relação ao IFN-γ (Fig. 5A), quando comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS, observamos diminuição significativa na síntese desta citocina sob o estímulo de OVA e Con-A em todos os grupos de animais infectados. Em comparação ao grupo CONTROLE e sob o estímulo com mitógeno, houve menor produção de IFN-γ nos grupos MI e AI, sem alteração para o grupo MIAI. Para o estímulo antigênico, OVA, a diminuição nos níveis de produção ocorreu no grupo MI e houve maior produção grupo nascidos/amamentados em mães esquistossomóticas (MIAI). Não houve diferença estatística para o grupo AI.

A figura 5B mostra a análise da produção de IFN-γ para descendentes adultos sensibilizados com SEA. Sob estímulo com Con-A, os grupos que receberam SEA, AI, MIAI e CONTROLE produziram menores níveis de IFN-γ em comparação ao grupo CONTROLE SEM SEA. Não houve diferença nos níveis desta citocina no grupo MI. Analisando apenas os grupos que receberam SEA, os grupos MI, AI e MIAI produzem mais IFN-γ do que o grupo CONTROLE. Após estímulo com OVA, ocorre diminuição significativa na síntese desta citocina em todos os grupos que receberam SEA em relação ao grupo CONTROLE SEM SEA. O grupo AI produziu níveis significativamente maiores de IFN-γ em comparação ao grupo CONTROLE que recebeu SEA.

3.6. A infecção pós-natal levou ao aumento da frequência de células Tregs nos descendentes adultos, principalmente naqueles amamentados em mães esquistossomóticas, enquanto a sensibilização com SEA favoreceu a presença de Tregs nos descendentes gerados nestas mães.

A frequência de células T regulatórias foi avaliada em células esplênicas dos animais estudados por citometria de fluxo. As células foram obtidas das culturas celulares após estímulos

com OVA, Con-A ou SEA (72 horas) e duplo-marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-FoxP3.

A figura 6A mostra o percentual de células Tregs nos grupos estudados. Nas culturas sem estímulo (basal), os grupos infectados apresentam maior frequência de Tregs em comparação ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS. O grupo AI apresentou a maior frequência (MI=0,65%; AI=1,63%; MIAI=0,50%; CONTROLE=0,80%; CONTROLE NÃO-INFECTADOS=0,24%) em relação aos outros grupos quando infectados. Para o estímulo com Con-A, as células esplênicas de todos grupos apresentaram frequências semelhantes de células T regulatórias (MI=0,14%; AI=0,39%; MIAI=0,15%; CONTROLE=0,29%; CONTROLE NÃO-INFECTADOS=0,35%).

Nas culturas estimuladas com OVA, os grupos infectados AI e CONTROLE possuem um aumento na frequência de Tregs em comparação ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (MI=0,77%; AI=1,0%; MIAI=0,47%; CONTROLE=1,07%; CONTROLE NÃO-INFECTADOS=0,49%). O mesmo foi observado frente ao estímulo *in vitro* com SEA (MI=0,50%; AI=0,80%; MIAI=0,47%; CONTROLE=0,95%; CONTROLE NÃO-INFECTADOS=0,33%). Enquanto que nas células estimuladas com OVA do grupo MIAI, observa-se uma baixa frequência de Tregs em comparação ao grupo CONTROLE.

Nos animais que receberam SEA (Fig. 6B), a frequência basal de Tregs foi maior nos descendentes MI e AI em comparação aos grupos CONTROLE com e sem administração de SEA (MI=0,73%; AI=0,74%; MIAI=0,33%; CONTROLE=0,32%; CONTROLE SEM SEA=0,18%). Para o estímulo com SEA, as células esplênicas dos grupos MI e AI apresentaram frequências maiores de Tregs quando comparadas à frequência observada no grupo CONTROLE SEM SEA (MI=0,73%; AI=0,50%; MIAI=0,32%; CONTROLE=0,34%; CONTROLE SEM SEA=0,21%). Com o grupo MI apresentando maior frequência também em relação ao CONTROLE.

Não observamos diferenças nas frequências das células Tregs após estímulo com OVA para todos os grupos estudados (MI=0,52%; AI=0,40%; MIAI=0,45%; CONTROLE=0,38%; CONTROLE SEM SEA=0,47%).

Nas culturas estimuladas com Con-A, os grupos que receberam SEA não apresentam diferenças em comparação ao grupo CONTROLE SEM SEA. No entanto, no grupo MIAI, observa-se uma alta frequência de Tregs. em comparação ao grupo CONTROLE (MI=0,04%; AI=0,05%; MIAI=0,21%; CONTROLE=0,05%; CONTROLE SEM SEA=0,13%).

4. Discussão

É sabido que a infecção pelo *S. mansoni,* bem como antígenos solúveis dos ovos, modulam negativamente a resposta imune do hospedeiro para antígenos homólogos e heterólogos (Lenzi et al., 1987; Sabin et al., 1996; Sewell et al., 2003; La Flamme et al., 2003; Attallah et al., 2006; Smits et al., 2007; Osada et al., 2009; Othman et al., 2010; Cardoso et al., 2012). Em nosso modelo experimental de imunização com OVA em adjuvante (Souza et al., 2002), a infecção por este trematódeo também desviou a resposta imune anti-ovalbumina para um perfil supressor Th2/Tregs: com maior produção de IL-4/IL-10, ótima frequência de células Tregs, diminuição das RH imediatas e da produção de IFN-γ. Aqui, o contato com os antígenos solúveis dos ovos foi menos potente na indução da supressão anti-OVA, com menor produção de IFN-γ. Como objetivo principal do nosso estudo, nos perguntamos sobre a intensidade da resposta imune anti-OVA nos descendentes adultos que foram gerados ou amamentados em mães esquistossomóticas, após contato pós-natal com antígenos do *S. mansoni.*

Neste contexto, observamos que a gestação em mães esquistossomóticas manteve a imunidade supressora anti-OVA frente à infecção pós-natal, com supressão da RHI, presença de células Tregs e IL-10. Contudo, nestes animais houve uma considerável menor produção de IFN-γ em relação aos descendentes gerados em mães não-esquistossomóticas e posteriormente infectados (CONTROLE-INFECTADOS). Foi também comparada a imunidade anti-OVA nos animais infectados quando adultos, os quais receberam previamente leite materno com ou sem antígenos do *S. mansoni.* Em ambos os grupos, a infecção na vida adulta proporcionou aumento da frequência de Tregs, quando na presença de OVA *in vitro*, junto com IL-10. Entretanto, no grupo AI-

INFECTADOS, houve um aprimoramento da supressão da RHI anti-OVA e um favorecimento marcante de um microambiente rico em células Tregs (basal), além de células Tregs sob estímulo *in vitro* com SEA, havendo supressão da síntese de IFN-γ. De modo interessante, nos animais nascidos e amamentados em mães esquistossomóticas a intensidade de supressão da RHI anti-OVA e a frequência de células Tregs basal refletiu o efeito da gestação, sendo menor em relação aos que receberam apenas leite. Contudo, a supressão dos níveis de IFN-γ foi mais amena em relação aos animais apenas gerados em mães esquistossomóticas.

Em conjunto, estes resultados demonstram que o contato com estes fatores imunológicos parasitários, na vida intrauterina, acentua a diminuição dos níveis de IFN-γ pela infecção pós-natal, nos descendentes quando adultos, que parece ser amenizada quando em conjunto com a amamentação. É esperado que o microambiente supressor gestacional (Heikkinen et al. 2003; Blois et al. 2004; Jin et al. 2011), adicionado à ação supressiva dos antígenos parasitários do *S. mansoni* sob as células dendríticas (Thomas and Harn, 2004), ressalte a menor capacidade de resposta anti-OVA nos animais MI. De fato, recentemente relatamos uma falha na expressão de moléculas co-estimulatórias CD86 nas DCs (Santos et al., *in press*), que foi associada a uma menor capacidade de ativação da resposta dependente de células T. Aqui, estes descendentes foram expostos ao processo de infecção pós-natal que poderia está aumentando esta ineficiência da resposta celular T efetora, via DCs alteradas.

É possível dizer que a infecção nos animais que tiveram contato prévio com leite materno, contendo anticorpos e antígenos parasitários, intensificou o "background" supressivo via Tregs, acompanhado de diminuída produção de IFN-γ e uma supressão ainda mais potente da RHI anti-OVA. De modo intrigante, nos animais AI, foi observada uma maior frequência de linfócitos B expressando CD80 e CD40, após estímulo com OVA (Santos et al., *in press*). Esta característica, foi relacionada com o incremento da produção de anticorpos anti-OVA (Santos et al., 2010). Entretanto, um perfil de LB CD40+/CD80+, IL-2-dependente, foi requerido para a geração de

células regulatórias CD25+CD4+ (Zheng et al., 2010). Células B regulatórias são geradas durante a infecção por *S. mansoni* e são requeridas para diminuição da atividade Th efetora, bem como, para a geração de células Tregs (Amu et al., 2010; Harris and Gause, 2011). Aqui, a possibilidade dos descendentes AI, que além do contato na tenra idade com leite de mães infectadas, também foram expostos ao processo de infecção pós-natal, favorecer a geração mais efetiva de linfócitos Bregs necessita ser investigada.

Nos animais AI-INFECTADOS, os níveis de IL-10 detectados em resposta à Con-A foram semelhantes aos CONTROLE-INFECTADOS, além disso, a produção desta citocina em resposta à OVA foi menor, quando comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS. É importante ressaltar que nos animais MIAI os níveis de IFN-γ, em resposta a OVA, foram parcialmente restaurados em comparação aos níveis do CONTROLE NÃO-INFECTADOS, embora se observe maior produção de IL-10. Estes resultados corroboram os estudos que mostraram um mecanismo imunossupressor via Tregs, agindo independente da IL-10 (Taylor et al., 2006; Pacífico et al., 2009; Cardoso et al., 2010) e, possivelmente, via contato célula-célula (Collison et al., 2009).

É possível notar que tanto nos descendentes gerados como nos amamentados, quando infectados, o desvio de resposta Th2/IL-4 é menos intensa do que nos animais CONTROLE-INFECTADOS. Acompanhado de maior intensidade de supressão Th1/IFN-γ. Então, ambos, o desvio da resposta Th2 anti-OVA devido à infecção pós-natal, bem como, a resposta Th1/IFN-γ estão sendo prejudicados. Estes achados sugerem um caráter de ampla supressão, em relação ao processo de infecção, nos descendentes aqui estudados.

Com relação à sensibilização com SEA, os animais MI e AI proporcionaram a supressão da imunidade RHI anti-OVA, bem como, a geração de células Tregs, IL-10 em resposta à OVA e IL-4, antes não observada nos descendentes de mães não-esquistossomóticas que também receberam SEA. Contudo, o contato *in utero* com os componentes imunológicos e parasitários favoreceu forte produção de IL-10, em resposta à OVA, em relação ao contato com o leite de mães infectadas (AI e MIAI). Apesar disso a supressão da produção de IFN-γ foi similar e menos evidente nestes

descendentes em comparação ao CONTROLE-INFECTADOS, corroborando a possível ação das Tregs, sem o comprometimento da IL-10 com a supressão da resposta anti-OVA (Taylor et al., 2006).

Com relação à produção de anticorpos, não foram observadas alterações dos níveis de IgG1 e IgG2a OVA-específicos, mostrando não ocorrer comprometimento na imunidade humoral nos animais infectados ou sensibilizados com o SEA. Da mesma forma, para os animais previamente gerados ou amamentados em mães esquistossomóticas. Estes últimos resultados foram para nós inesperados. Sabendo que nos animais MI houve uma diminuição na produção de anticorpos anti-OVA (Santos et al., 2010), o contato com infecção/SEA na vida adulta aboliu esta capacidade supressora, parecendo conter, em vez de acentuar, a supressão anti-OVA adquirida durante a gestação em mães infectadas. Em relação aos animais previamente amamentados em mães esquistossomóticas, os resultados aqui encontrados mostram que embora o contato pós-natal com antígenos parasitários predisponha a uma supressão da imunidade anti-OVA, também não foi observada para a imunidade humoral. A ação imunomodulatória da infecção/SEA na resposta imune humoral é contraditória (Kullberg et al., 1992; Curry et al., 1995; Montesano et al., 1999; Smits et al., 2007; Cardoso et al., 2010) e merece ser mais bem investigada nos descendentes aqui estudados.

Em conclusão, o contato com antígenos parasitários em descendentes de mães esquistossomóticas favoreceu uma imunomodulação negativa heteróloga, que foi mais potente frente ao processo de infecção (supressão mais ampla Th1/Th2) e naqueles que tiveram contato prévio com leite materno destas mães. Contudo, este fenômeno não pôde ser evidenciado pela mensuração de anticorpos, ressaltando a importância do contato prévio, seja *in utero* e/ou durante amamentação, com antígenos parasitários para uma adequada resposta imune humoral, em indivíduos de área endêmica e, portanto, passivos de infecção quando adultos. Estudos de base experimental e clínicos são requeridos para investigar os possíveis benefícios, ou não, da

esquistossomose materna na prevenção de alergia, auto-imunidade e infecção heteróloga em descendentes de área endêmica.

Agradecimentos

Agradecemos à Maria da Conceição Batista pela competente assistência técnica. Os autores também agradecem ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde - PDTIS/FIOCRUZ pelo uso de suas instalações. Este trabalho foi realizado em conformidade com as leis brasileiras.

Referências

Actor JK, Shirai M, Kullberg MC, Buller RM, Sher A, Berzofsky JA. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:948-952. [PubMed: 8094248]

Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101:79-85. [PubMed: 17308751]

Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. J Allergy Clin Immunol 2010; 125:1114-1124. [PubMed: 20304473]

Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-Emshaty HM, Elsheikha HM. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. Parasitol Res 2006; 99:137-145. [PubMed: 16521039]

Blois SM, Soto CDA, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. Biol Reprod 2004; 70:1018-1023. [PubMed: 14681197]

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Trop 2008; 108:109-117. [PubMed: 18577364]

Cardoso LS, Olivera SC, Góes AM, Oliveira RR, Pacífico LG, Marinho FV, Fonseca CT, Cardoso FC, Carvalho EM, AraújoMI. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. Clin Exp Immunol 2010; 160:266-274. [PubMed: 20132231]

Cardoso LS, Oliveira SC, Araujo MI. *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2012; 12:24-32. [PubMed: 22214332]

Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DAA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. J Immunol 2009; 182:6121-6128. [PubMed: 19414764]

Curry AJ, Else KL, Jones F, Bancroft A, Grencis RK, Dunne DW. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. J Exp Med 1995; 181:769-774. [PubMed: 7836929]

Finkelman FD, Pearce EJ, Urban Jr JF, Sher A. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. Immunol Today 1991; 12:A62-66. [PubMed: 1829892]

Fowler RE, Edwards RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. J Endocrinol 1957; 15:374-384. [PubMed: 13475597]

Friedman JF, Mital P, Kanzaria HK, Olds GR, Kurtis JD. Schistosomiasis and pregnancy. Trends Parasitol 2007; 23:159-164. [PubMed: 17336160]

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet 2006; 368: 1106-1118. [PubMed: 16997665]

Harris N, Gause WC. B cell function in the immune response to helminths. Trends Immunol 2011; 32:80-88. [PubMed: 3076625]

Heikkinen J, Möttönen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. Clin Exp Immunol 2003; 131:498-505. [PubMed: 12605704]

Hillier SD, Booth M, Muhangi L, Nkurunzuza P, Khihembo M, Kakande M, Sewankambo M, Kizindo R, Kizza M, Muwanga M, Elliot AM. *Plasmodium falciparum* and helminth co-infection in a semi-urban population of pregnant women in Uganda. J Infect Dis 2008; 198:920-927. [PubMed: 18721060]

Jin LP, Fan DX, Li DJ. Regulation of costimulatory signal in maternal-fetal immune tolerance. Am J Reprod Immunol 2011; 66:76-83. [PubMed: 21276120]

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1972; 14:397-400. [PubMed: 4675644]

Kullberg MC, Pearce EJ, Hieny SE, Sher A, Berzofsky JA. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. J Immunol 1992; 148:3264-3270. [PubMed: 1533656]

LaBeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, Hing CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? PLoS Negl Trop Dis 2009; 3:e442. [PubMed: 19478847]

La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Infect Immun 2003; 71:4996-5004. [PubMed: 12933842]

Lenzi JA, Sobral AC, Araripe JR, Grimaldi Filho G, Lenzi HL. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82:257-267. [PubMed: 3151101]

Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A, Grant WN, Boatin BA, McCarthy JS, Basáñez MG. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiases. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6:e1582. [PubMed: 22545164]

Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW, King CL. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. J Immunol 1999; 162:6843-6848. [PubMed: 10352306]

McKee AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. J Immunol 2004; 173:1224-1231. [PubMed: 15240714]

Medeiros MJr, Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araújo MI, Cruz AA, Atta AM, Rego MA, de Jesus AR, Taketomi EA, Carvalho EM. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111:947-951. [PubMed: 12743556]

Montesano MA, Colley DG, Freeman GL, Secor WE. Neonatal exposure to idiotype induces *Schistosoma mansoni* egg antigen-specific cellular and humoral immune responses. J Immunol 1999; 163:898-905. [PubMed: 10395685]

Moore KW, de Wall Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001; 19:683-765. [PubMed: 11244051]

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. [PubMed: 9707682]

Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. Int J Parasitol 2009; 39:457-464. [PubMed: 18835272]

Othman AA, Shoheib ZS, Saied EM, Soliman RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. Immunobiology 2010; 215:101-112. [PubMed: 19457572]

Pacífico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, Cardoso LS, Araújo MI, Carvalho EM, Cassali GD, Teixeira MM, Oliveira SC. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+CD25+FoxP3+ T cells independente of interleukin-10. Infect Immun 2009; 77:98-107. [PubMed: 18824533]

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med 1991; 173:159-166. [PubMed: 1824635]

Ruyssers NE, De Winter BY, De Man JG, Ruysser ND, Van Gils AJ, Loukas A, Pearson MS, Weinstock JV, Pelckmans PA, Moreels, TG. *Schistosoma mansoni* proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. World J Gastroenterol 2010; 16:703-712. [PubMed: 20135718]

Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis 1996; 173:269-272. [PubMed: 8537675]

Santos PEA, Sales IR, Schirato GV, Costa VM, Albuquerque MC, Souza VM, Malagueño E. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. Parasitol Res 2010; 107:95-102. [PubMed: 20372927]

Santos PEA, Lorena VMB, Fernandes ES, Sales IR, Gomes YM, Albuquerque MC, Costa VM, Souza VM. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013 (in press).

Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. Int Immunol 2003; 15:59-69. [PubMed: 12502726]

Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, Soullie T, Willart MA, Lievers E, Kadouch J, Kool M, Kos-van Oosterhoud J, Deelder AM, Lambrecht BN, Yazdanbakhsh M. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. J Allergy Clin Immunol 2007; 120:932-940. [PubMed: 17689595]

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. Braz J Med Biol Res 2002; 35:81-89. [PubMed: 11743619]

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. J Immunol 2006; 176:5839-5847. [PubMed: 16670290]

Thomas PG, Harn DA Jr. Immune biasing by helminth glycans. Cell Microbiol 2004; 6:13-22. [PubMed: 14678327]

Zheng J, Liu Y, Lau YL, TU W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4 regulatory T cells. Cell Mol Immunol 2010; 7:44-50. [PubMed: 20081875]

Legendas da Figuras

Figura 1 - Reações de hipersensibilidade à OVA. Camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B), imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA, 60 dias pós-infecção ou 48 horas após administração de SEA, e desafiados no 8° dia após a imunização, no coxim plantar, com OVA agregada (600μg/animal). Camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A) ou administrados com SEA e sem SEA (B) imunizados com OVA também foram desafiados nas mesmas condições. A espessura da pata foi medida entre 0,5-24 horas e os resultados representam a mediana dos valores da diferença entre as medidas das duas patas de 5 animais/grupo ± erro padrão. •$\rho<0,05$ comparado ao grupo CONTROLE, #$\rho<0,05$ comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (A) ou CONTROLE SEM SEA (B).

Figura 2 - Níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA nos plasmas. Camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A e C) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B e D), e camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A e C) ou administrados com SEA e sem SEA (B e D), foram imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA. Após 9 dias, tiveram seus níveis de anticorpos dosados por ELISA na diluição 1:2048 (IgG1) e 1:16 (IgG2a). Os resultados representam a mediana da D.O. de 5 animais/grupo ± erro padrão.

Figura 3 - Níveis de IL-4 secretados pelas células esplênicas. Camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B), e camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A) ou administrados com SEA e sem SEA (B), foram imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA. Após 9 dias, 10^7 células não-estimuladas ou estimuladas com OVA (500μg/mL) ou Con-A (5μg/mL) foram cultivadas por 24 horas. A citocina foi dosada nos sobrenadantes coletados por ELISA sanduíche. Os resultados representam a média das culturas em duplicata de 5 animais/grupo ± desvio padrão. Células não-estimuladas produziram <0,44ng/mL de

IL-4. •ρ<0,05 comparado ao grupo CONTROLE, #ρ<0,05 comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (A) ou CONTROLE SEM SEA (B).

Figura 4 - Níveis de IL-10 secretados pelas células esplênicas. Camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B), e camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A) ou administrados com SEA e sem SEA (B), foram imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA. Após 9 dias, 6 x 10^6 células não-estimuladas ou estimuladas com OVA (500μg/mL) ou Con-A (5μg/mL) foram cultivadas por 72 horas. A citocina foi dosada nos sobrenadantes coletados por ELISA sanduíche. Os resultados representam a média das culturas em duplicata de 5 animais/grupo ± desvio padrão. Células não-estimuladas produziram <0,625ng/mL de IL-10. •ρ<0,05 comparado ao grupo CONTROLE, #ρ<0,05 comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (A) ou CONTROLE SEM SEA (B).

Figura 5 - Níveis de IFN-γ secretados pelas células esplênicas. Camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B), e camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A) ou administrados com SEA e sem SEA (B), foram imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA. Após 9 dias, 6 x 10^6 células não-estimuladas ou estimuladas com OVA (500μg/mL) ou Con-A (5μg/mL) foram cultivadas por 72 horas. A citocina foi dosada nos sobrenadantes coletados por ELISA sanduíche. Os resultados representam a média das culturas em duplicata de 5 animais/grupo ± desvio padrão. Células não-estimuladas produziram <2,5ng/mL de IFN-γ. •ρ<0,05 comparado ao grupo CONTROLE, #ρ<0,05 comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (A) ou CONTROLE SEM SEA (B).

Figura 6 - Frequência de células esplênicas CD4+ expressando FoxP3+. Camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B), e camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A) ou administrados com SEA e sem SEA (B), foram imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA. Após 9 dias, tiveram suas células esplênicas não-estimuladas ou estimuladas com OVA (500μg/mL), Con-A (5μg/mL) ou SEA (20μg/mL) por 72

horas, marcadas e analisadas por Citometria de Fluxo. Os resultados representam a média das frequências celulares no "pool" dos baços de 5 animais/grupo ± desvio padrão. •$\rho<0,05$ comparado ao grupo CONTROLE, #$\rho<0,05$ comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (A) ou CONTROLE SEM SEA (B).

Figura 1

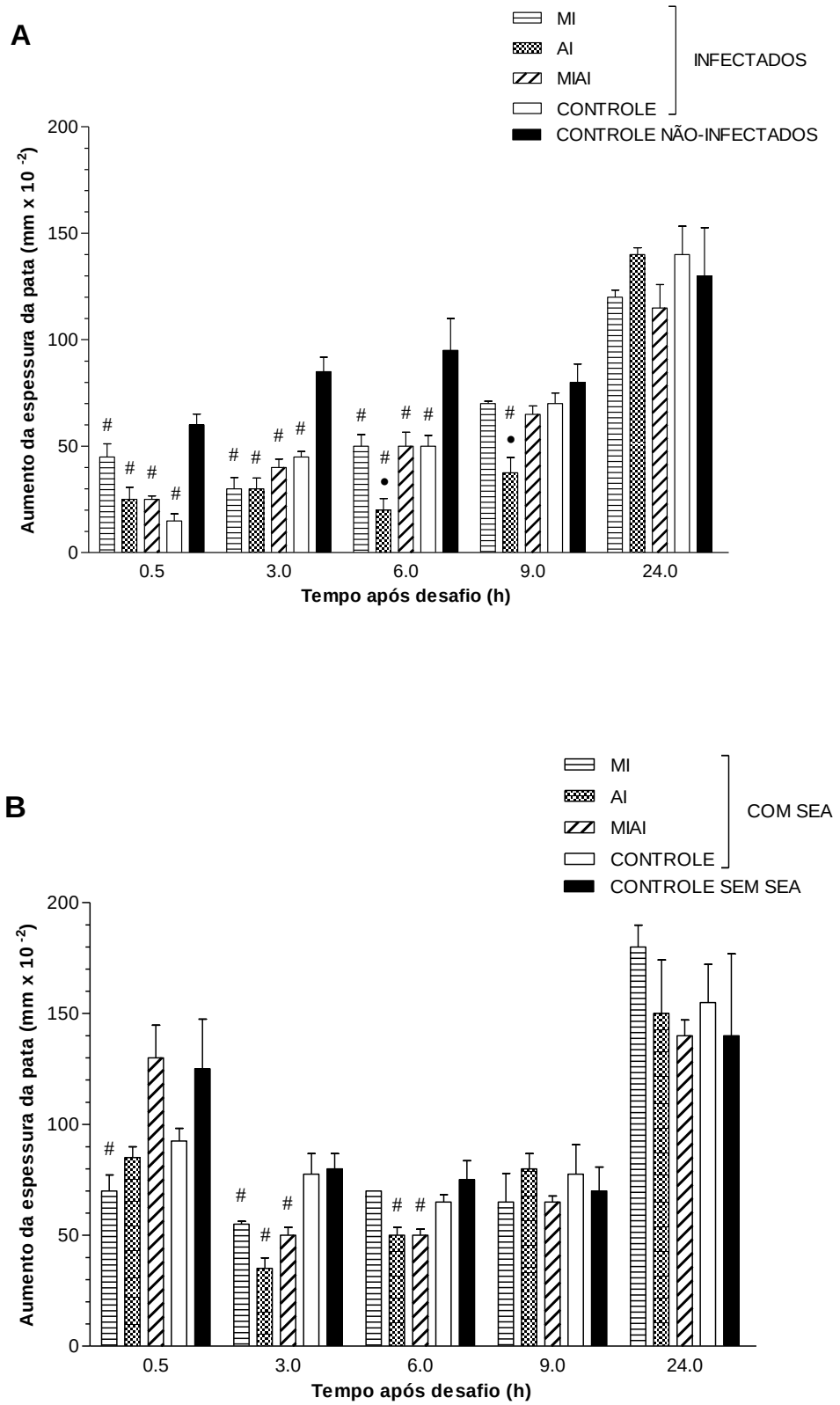

A
MI
AI
MIAI
CONTROLE
INFECTADOS
CONTROLE NÃO-INFECTADOS
Aumento da espessura da pata (mm x 10 -2)
Tempo após desafio (h)
0.5
3.0
6.0
9.0
24.0
B
MI
AI
MIAI
CONTROLE
COM SEA
CONTROLE SEM SEA
Aumento da espessura da pata (mm x 10 -2)
Tempo após desafio (h)

Figura 2

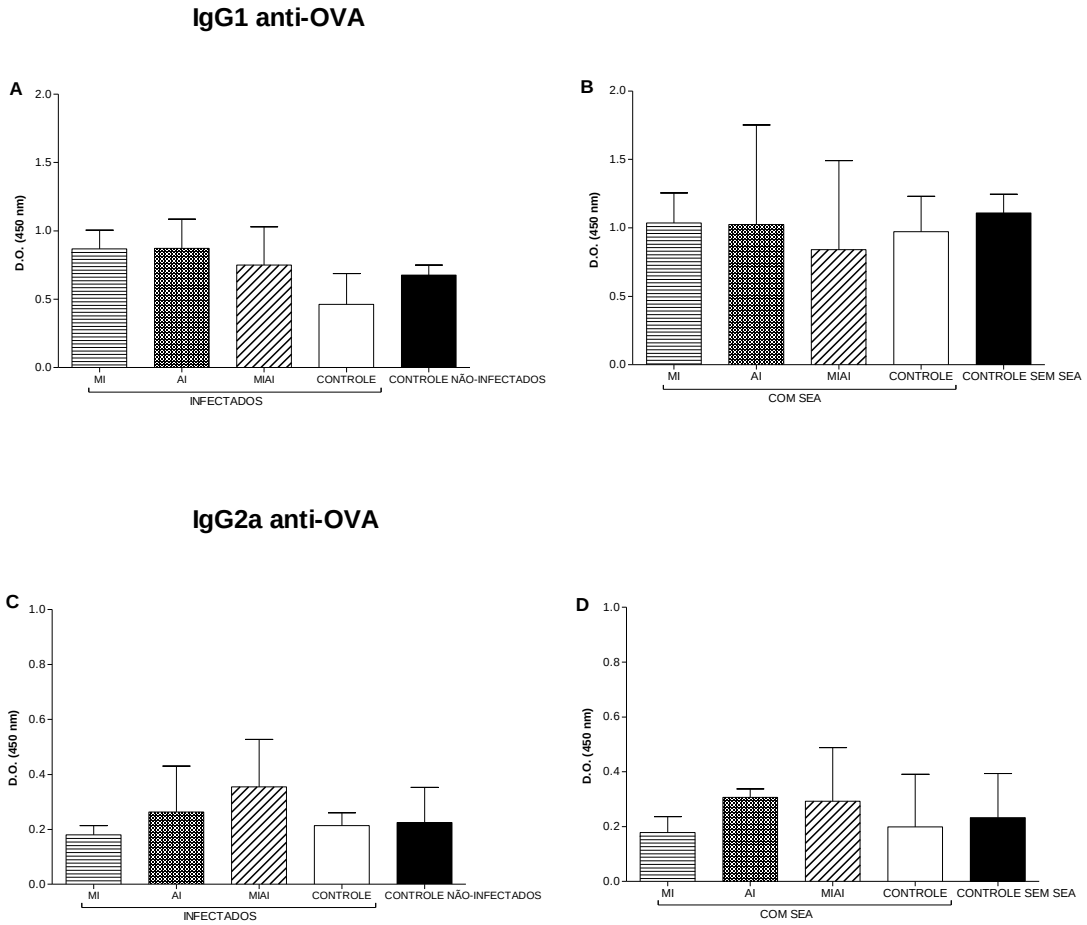

IgG1 anti-OVA
A
B
D.O. (450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE NÃO-INFECTADOS
INFECTADOS
CONTROLE SEM SEA
COM SEA
IgG2a anti-OVA
C
D
0.8
0.6
0.4
0.2

Figura 3

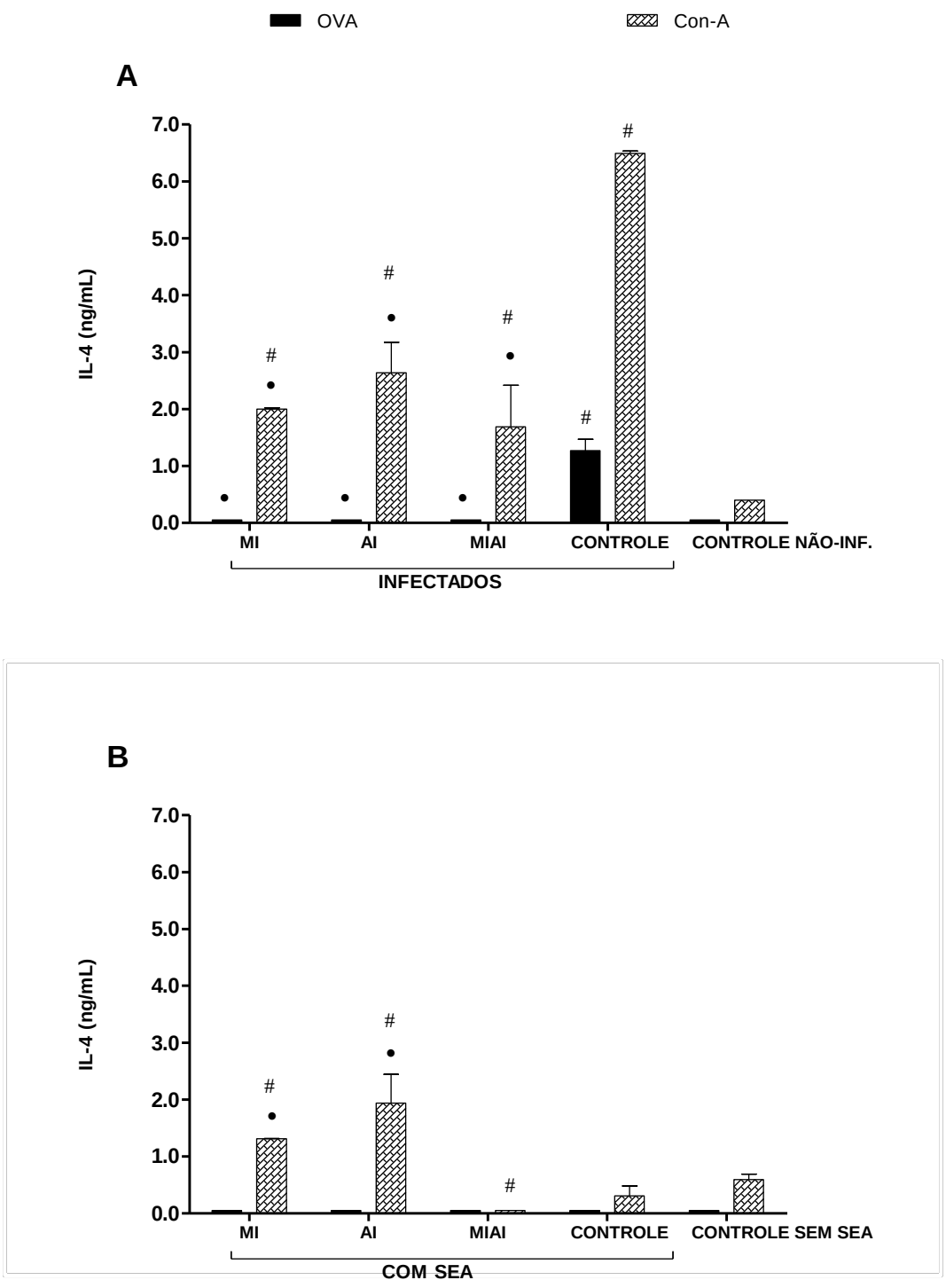

OVA
Con-A
A
IL-4 (ng/mL)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
#
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE NÃO-INF.
INFECTADOS
B
IL-4 (ng/mL)
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE SEM SEA
COM SEA

Figura 4

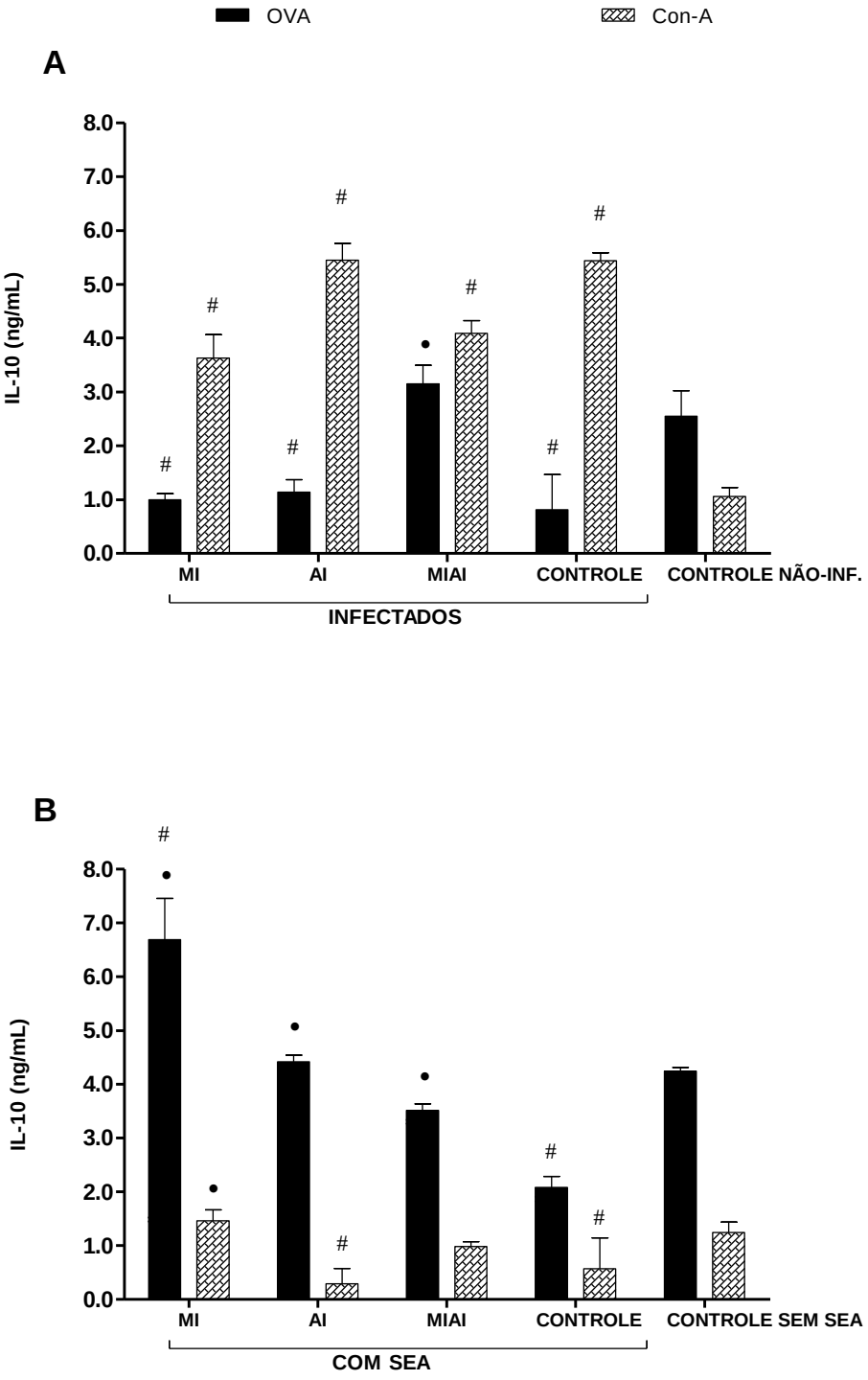

OVA
Con-A
A
IL-10 (ng/mL)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE NÃO-INF.
INFECTADOS
B
IL-10 (ng/mL)
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE SEM SEA
COM SEA

Figura 5

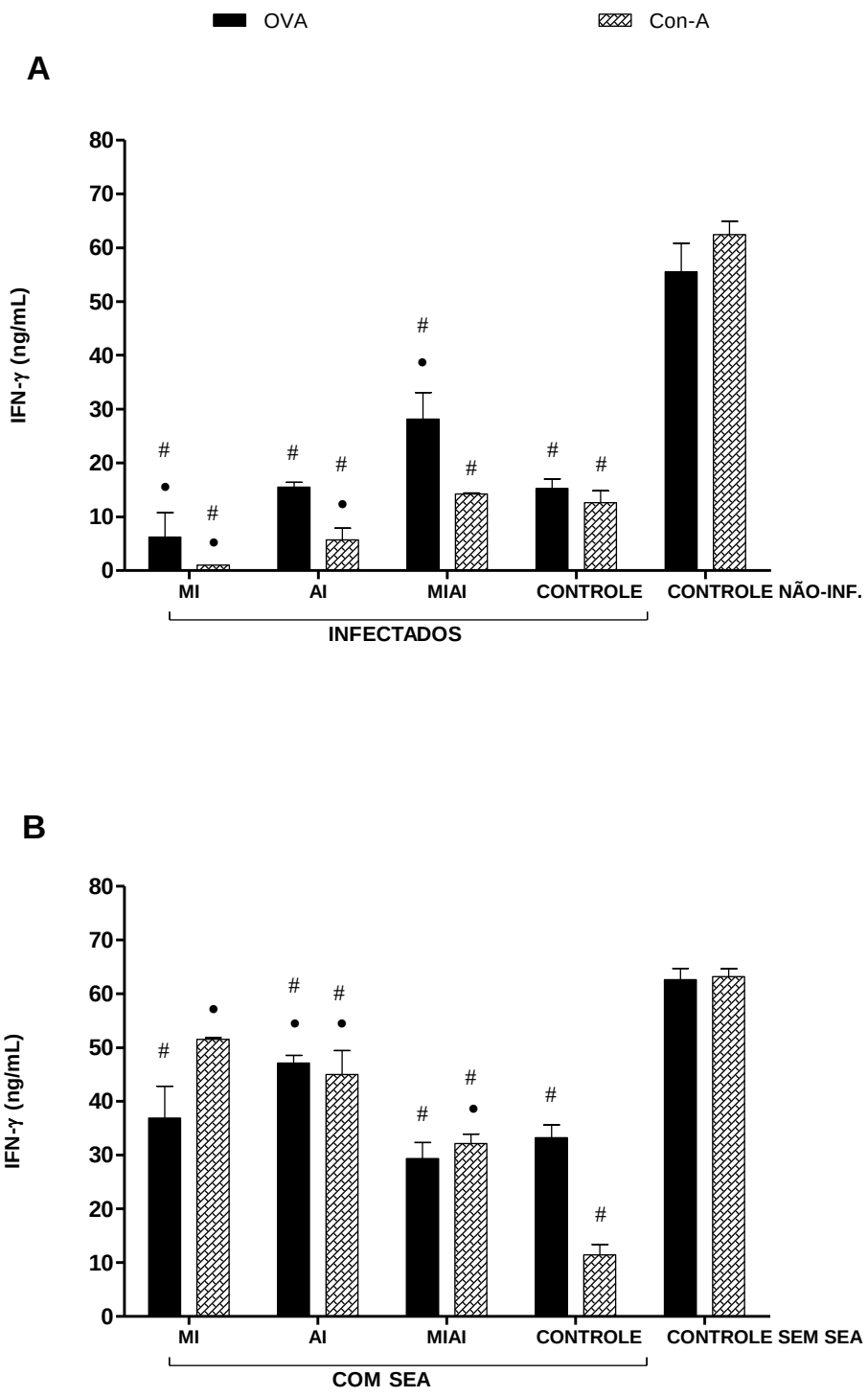
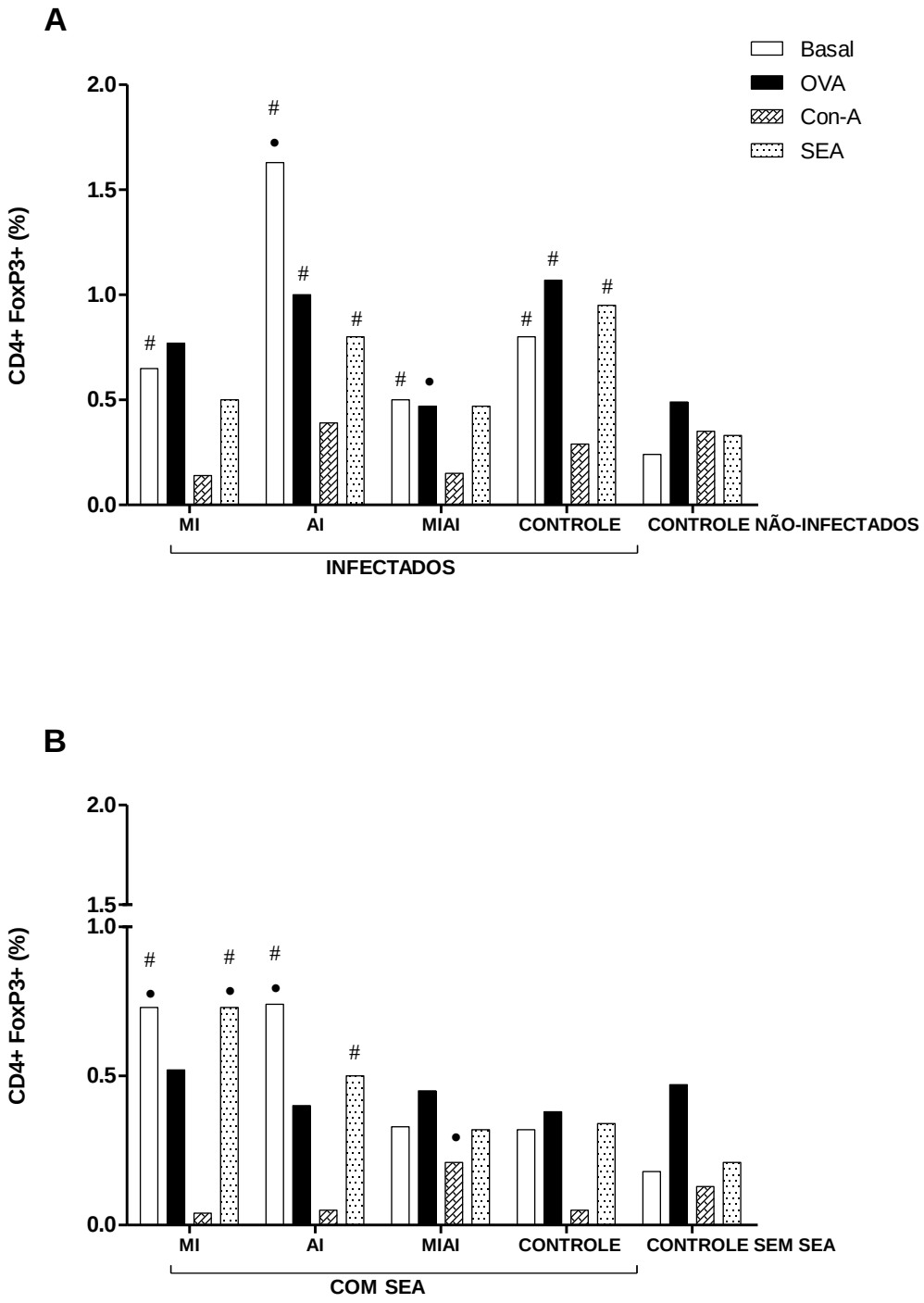

OVA
Con-A
A
IFN-γ (ng/mL)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE NÃO-INF.
INFECTADOS
B
IFN-γ (ng/mL)
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE SEM SEA
COM SEA

Figura 6


A
Basal
OVA
Con-A
SEA
CD4+ FoxP3+ (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE NÃO-INFECTADOS
INFECTADOS
B
CD4+ FoxP3+ (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MI
AI
MIAI
CONTROLE
CONTROLE SEM SEA
COM SEA

5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS FÍGADOS

Descendentes nascidos (MI) de mães esquistossomóticas, quando infectados pelo *S. mansoni*, na vida adulta apresentam maior quantidade de granulomas hepáticos e deposição de colágeno enquanto os descendentes amamentados (AI) e nascidos/amamentados (MIAI) possuem granulomas de tamanho reduzido

Realizou-se o método de Kato-Katz, 49 dias depois da infecção com 80 cercárias de *S. mansoni* nos animais nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães esquistossomóticas, bem como animais nascidos/amamentados em fêmeas não-infectadas (Controle) para confirmação e quantificação da infecção. Animais do grupo MIAI apresentaram diminuição na quantidade de ovos/g de fezes em comparação aos animais do grupo Controle (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de ovos/g de fezes, número e tamanho dos granulomas hepáticos e deposição de colágeno observados em camundongos nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*

Grupos[a]	Método Kato-Katz[b]	Número de Granulomas Hepáticos[c] (HE)	(TM)	Tamanho do Granuloma[d] (TM)	Colágeno[e] (TM)
MI	408.0 ± 159.2	1.88 ± 1.17	5.73 ± 2.25 *	21451 ± 9454	87.46 ± 10.46 *
AI	332.6 ± 202.7	1.44 ± 0.95	3.84 ± 2.21	18407 ± 6674 *	79.33 ± 7.98
MIAI	142.3 ± 103.7 *	1.46 ± 1.45	4.16 ± 2.10	20467 ± 8577 *	83.91 ± 9.01
Controle	509.1 ± 359.1	1.56 ± 1.15	3.13 ± 1.95	23237 ± 7934	78.67 ± 6.64

*$\rho < 0,05$, comparado ao grupo Controle.

[a] Camundongos *Swiss webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães esquistossomóticas tiveram seu fígado submetido ao estudo morfométrico no 69° dia após a infecção. Camundongos infectados nascidos/amamentados em mães não-infectadas (Controle) também foram analisados nas mesmas condições. Colorações Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

[b] Mediana ± erro padrão do número de ovos por grama de fezes. Análise realizada com 49 dias pós-infecção.

[c] Mediana ± erro padrão do número de granulomas hepáticos por campo observado.

[d] Mediana ± erro padrão do tamanho (área seccional) dos granulomas hepáticos em µm2.

[e] Mediana ± erro padrão da proporção de colágeno obtidos pelo software ImageJ®.

Sessenta e nove dias após a infecção, o fígado foi retirado para análise histomorfométrica. Ocorreu diminuição no tamanho médio dos granulomas hepáticos nos animais dos grupos AI e MIAI (Tabela 2/ Fig. 1B e 1C) em comparação ao grupo Controle (Tabela 2/Fig. 1D), enquanto os animais do grupo MI apresentaram maior número de granulomas por campo analisado bem como maior deposição de colágeno (fibrose hepática) nas lâminas coradas com o tricrômico de Masson (Tabela 2/Fig. 1A). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados na quantidade de granulomas por campo nas lâminas coradas com hematoxilina-eosina.

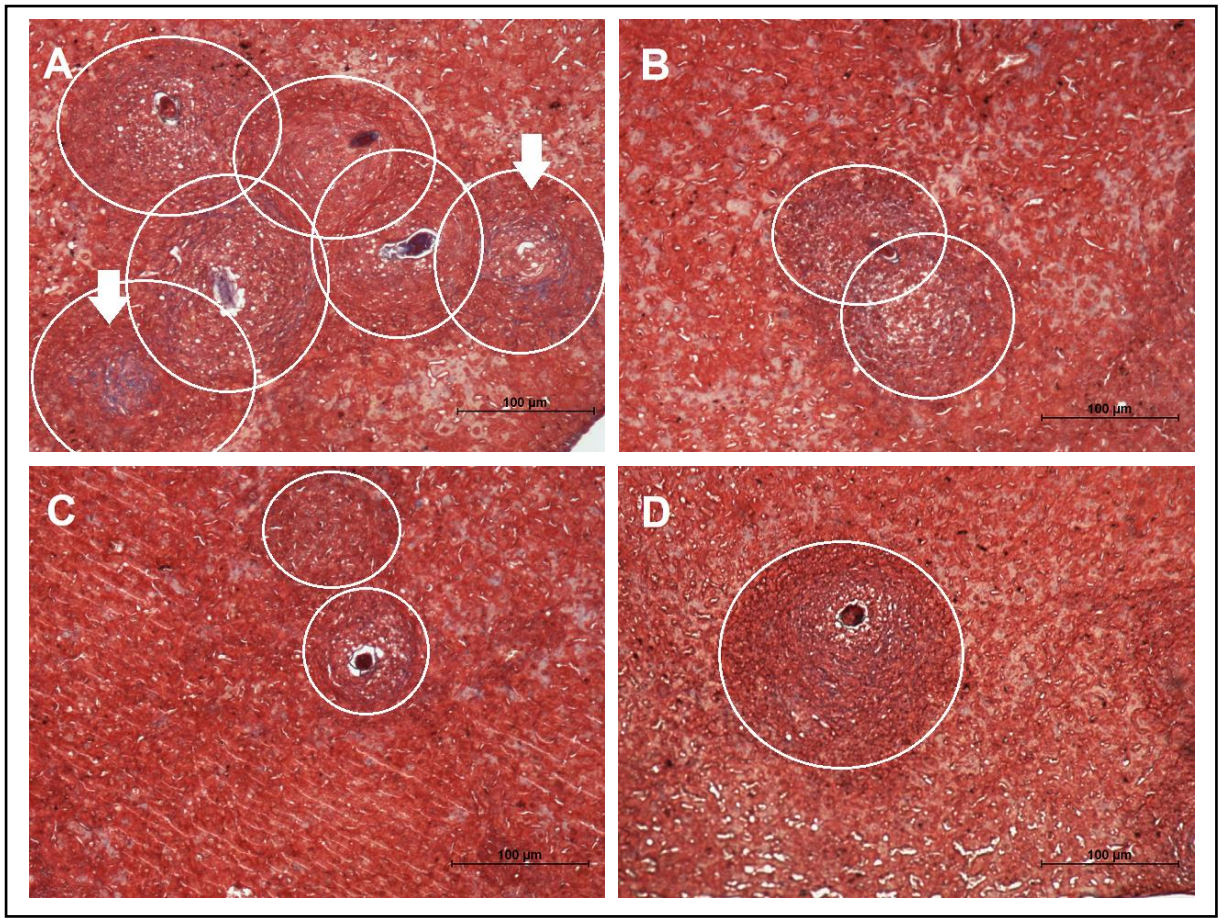


Figure 1. Análise histomorfométrica de granulomas hepáticos em animais nascidos-MI (A), amamentados-AI (B) ou nascidos/amamentados-MIAI (C) em mães esquistossomóticas, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni*, em comparação a camundongos infectados nascidos/amamentados em mães não-infectadas-Controle (D). Imagens representativas dos cortes hepáticos corados pelo tricrômico de Masson com aumento de 100x. Círculos delimitando o tamanho dos granulomas (A, B, C e D) e setas indicando áreas com maior deposição de colágeno (A).

Nossos resultados demonstram que os animais nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas quando submetidos, na vida adulta, à infecção pelo *S. mansoni*, controlam a imunopatogênese da esquistossomose, apresentando diminuição na carga parasitária observada pela quantidade de ovos/g de fezes (Método de Kato-Katz) e diminuição no tamanho médio dos granulomas. Achados que acompanham estudos anteriores que demonstram que camundongos recém-nascidos e lactentes de mães esquistossomóticas, desenvolvem uma reação granulomatosa hepática reduzida quando comparados a camundongos nascidos de mães não-infectadas (LENZI et al., 1987; ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010). Os animais amamentados (AI) acompanham o perfil observado nos animais MIAI só que de forma menos intensa, onde encontramos o mesmo número de granulomas e deposição de colágeno que o grupo CONTROLE, mas granulomas com área diminuída. Já os animais do grupo MI não conseguem controlar a resposta ao parasita, apresentando um maior número de granulomas no fígado além de um maior grau de fibrose (observado pela deposição do colágeno), sugerindo que o controle imunopatológico da esquistossomose nos descendentes ocorre por fatores relacionados ao contato com o leite de mães infectadas.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES DA TESE

- A IL-10 esteve comprometida com a supressão da imunidade humoral anti-OVA nos camundongos adultos nascidos de mães esquistossomóticas, uma vez que após tratamento destes animais com o anticorpo monoclonal anti-IL-10 houve restauração dos níveis de IgG1 e IgG2a, bem como das reações de hipersensibilidade (6 e 9 horas).

- A prévia amamentação em mães esquistossomóticas resulta em uma melhor apresentação de antígenos pelas células B nos descendentes adultos, com aumento na frequência de células B CD40+/CD80+ tão logo a imunização com OVA. Enquanto a gestação nessas mães predispõe seus descendentes a uma fraca apresentação antigênica pelas APCs durante a resposta imune anti-OVA, com drástica redução na frequência de células CD11c+/CD86+ e células B CD40+/CD80+/CD86+.

- Infecções pós-natais em descendentes de mães esquistossomóticas favorecem um forte potencial imunossupressor, principalmente naqueles que tiveram contato prévio com leite materno destas mães. Observamos em todos os grupos infectados alta produção de IL-4 e IL-10, aumento da frequência de células Tregs, supressão da resposta de hipersensibilidade imediata anti-OVA e baixos níveis de IFN-γ. Esta supressão também é favorecida em animais gerados ou amamentados frente à sensibilização com SEA, apesar de em menor intensidade, sendo notados maiores níveis de IL-10 e maior frequência de células Tregs. Não observamos alterações na produção de anticorpos anti-OVA nos grupos estudados.

- A prévia amamentação em mães esquistossomóticas favorece o aumento da frequência de células Tregs nos descendentes adultos frente à infecção pós-natal, enquanto a gestação nestas mães favorece a presença de Tregs em resposta à sensibilização com SEA.

- Animais gerados e amamentados em mães esquistossomóticas apresentam atenuação na patogênese da esquistossomose em uma infecção pós-natal, observada pela diminuição no número de ovos/g de fezes e pelos granulomas de tamanhos reduzidos. Só a prévia amamentação em mães infectadas resulta em atenuação leve com granulomas de tamanhos reduzidos. Enquanto, a gestação leva a uma maior quantidade de granulomas hepáticos e deposição de colágeno.

7 PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

Em nosso estudo experimental, observamos que a exposição *in utero* aos antígenos de *Schistosoma mansoni* ou anticorpos maternos suprimem a resposta imune humoral dos descendentes na vida adulta, além de comprometerem a fase de ativação da resposta imune a um antígeno heterólogo, devido alterações na expressão de moléculas de superfície celular nas APCs. O inverso ocorre nos animais apenas amamentados nestas mães, com melhora da resposta imune humoral e programação prévia para uma efetiva fase de ativação. O que torna interessante a observação destes parâmetros em humanos, uma vez que em nosso modelo a administração da OVA em adjuvante simula uma vacinação, e os filhos de mães infectadas que por algum motivo não amamentarem nas próprias mães podem apresentar modificações na resposta imune às vacinas que estimulem respostas Th1 e produção de anticorpos.

Por outro lado, é possível que descendentes de mães infectadas de região endêmica possam se infectar/imunizar pelo *S. mansoni*. Neste caso, diante do contato com antígenos parasitários, observamos experimentalmente uma supressão geral com presença de células T regulatórias tanto nos animais expostos *in utero* quanto nos animais em contato com leite materno, entretanto houve restauração da imunidade humoral ao antígeno heterólogo, com níveis normais dos anticorpos analisados. Em ambos os experimentos, animais nascidos/amamentados em mães infectadas apresentam um perfil misto tendendo a um comportamento similar ao grupo controle.

Sendo assim, devido à alta prevalência da esquistossomose na nossa região, compreender os mecanismos envolvidos na relação materno-fetal humana pode ter relevância não só diante das estratégias de vacinação, como também na investigação dos possíveis benefícios, ou não, da esquistossomose materna na prevenção de alergia, auto-imunidade e infecções heterólogas em descendentes de áreas endêmicas para *S. mansoni*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE

ABATH, F.G.C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.

AMARAL, R.S. et al. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, suppl. 1, p. 79-85, 2006.

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. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 170, n. 4, p. 1635-1639, 2003.

ARAUJO, M.I.A.S. et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, n. 10, p. 1797-1803, 2004.

ATTALLAH, A.M. et al. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, Baltimore, 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. **Parasitology Research**, Berlim, v. 99, n.2, p. 137-145, 2006.

BARBOSA, C.S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, suppl. 1, p. 55-62, 2006.

BASHIR, M.E.H. et al. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 6, p. 3284-3292, 2002.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, Nova York, v. 8, n. 4, p. 345-350, 2007.

BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Travel Medicine and Infectious Diseases**, Amsterdã, v. 2, n. 1, p. 5-11. 2004.

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

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUSTOSKI, K. et al. IFN-γ and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 3, p. 1738-1745, 2005.

CALDAS, I.R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, Amsterdã, v. 108, n. 2-3, p. 109-117, 2008.

CHAOUAT, G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v. 131, n. 3, p. 393-395, 2003.

COLLISON, L.W. et al. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 182, n. 10, p. 6121-6128, 2009.

CORTHAY, A. A three-cell model for activation of naïve T helper cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 64, n. 2, p. 93-96, 2006.

COTTREZ, F. et al. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response *in vivo*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 9, p. 4848-4853, 2000.

EVERTS, B. et al. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 206, n. 8, p. 1673-1680, 2009.

FALLARINO, F. et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nature Immunology**, Nova York, v. 4, n. 12, p. 1206-1212, 2003.

FINKELMAN, F.D. et al. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. **Immunology Today**, Londres, v. 12, n. 3, p. A62-A66, 1991.

FLORES-VILLANUEVA, P.O. et al. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, n. 6, p. 3192-3198, 1993.

FOWLER, R.E.; EDWARDS, R.G. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 15, n. 4, p. 374-384, 1957.

FRIED, M. et al. Malaria elicits type 1 cytokines in the human placenta: IFN-γ and TNF-α associated with pregnancy outcomes. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, n. 5, p. 2523-2530, 1998.

FUSARO, A.E. et al. Maternal-fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. **Immunology**, Londres, v. 122, n. 1, p. 107-115, 2007.

GEIJTENBEEK, T.B.H. et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York**,** v. 197, n. 1, p. 7-17, 2003.

GREENWALD, R.J. et al. CTLA-4 regulates induction of anergy *in vivo*. **Immunity**, Cambridge, v. 14, n. 2, p. 145-155, 2001.

GREWAL, I.S.; FLAVELL, R.A. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. **Immunology Today**, Londres, v. 17, n. 9, p. 410-414, 1996.

GROUX, H. et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, Londres, v. 389, n. 6652, p. 737-742, 1997.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, Londres, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HAGAN, P.; NDHLOVU, P.D.; DUNNE, D.W. Schistosome immunology: more questions than answers. **Parasitology Today**, Londres, v. 14, n. 10, p. 407-412, 1998.

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

HASSAN, M.M. et al. Transmission of circulating schistosomal antigens from infected mothers to their newborns. **Journal of the Egyptian Society Parasitology**, Cairo, v. 27, n. 3, p. 773-780, 1997.

HEIKKINEN, J. et al. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, v. 131, n. 3, p. 498-505, 2003.

HEIKKINEN, J. et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clinical & Experimental Immunology**, 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. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, n. 12, p. 6406-6416, 2000.

JANKOVIK, D.; LIU, Z.; GAUSE, W.C. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 450-457, 2001.

JUDGE, T.A. et al. The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162, n. 4, p. 1947-1951, 1999.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KLOOS, H. et al. Socioeconomic studies of schistosomiasis in Brazil: a review. **Acta Tropica**, Amsterdã, v. 108, n. 2-3, p. 194-201, 2008.

KOOL, M.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B.N. Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. **F1000 Biology Reports**, Londres, v. 4, n.6, 2012.

KRASNOW, J.S. et al. Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy. **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 8, p. 1747-1754, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v. 227, p. 680-685, 1970.

LA FLAMME, A.C.; RUDDENKLAU, K.; BACKSTROM, B.T. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 9, p. 4996-5004, 2003.

LAGADARI, M. et al. Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status. **American Journal of Reproduction Immunology**, Nova York, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2004.

LASKARIN, G. et al. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. **American Journal of Reproduction Immunology**, Nova York, v. 58, n. 3, p. 255-267, 2007.

LECHLER, R.; NG, W.F.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells in transplantation: friend or foe? **Immunity**, Cambridge, v. 14, n. 4, p. 357-368, 2001.

LE HESRAN, J.Y. et al. Maternal placental infection with *Plasmodium falciparum* and malaria morbidity during the first 2 years of life. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 146, n. 10, p. 826-831, 1997.

LENZI, J.A. et al. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, suppl. 4, p. 257-267, 1987.

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

MA, D.Y.; CLARK, E.A. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. **Seminars in Immunology**, Londres, v. 21, n. 5, p. 265-272, 2009.

MacDONALD, A.S. et al. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, n. 4, p. 1982-1988, 2001.

MACEDO, M.S. et al. Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extract in mice: effect of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10antibodies. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 47, n. 1, p. 10-18, 1998.

MAIZELS, R.M. et al. Helminth parasites - masters of regulation. **Immunological Reviews**, Oxford, v. 201, p. 89-116, 2004.

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

MALHOTRA, I. et al. Prenatal T cell immunity to *Wuchereria bancrofti* and its effect on filarial immunity and infection susceptibility during childhood. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 193, n. 7, p. 1005-1013, 2006**.**

McGUIRK, P.; MILLS, K.H.G. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, n. 9, p. 450-455, 2002.

McKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 1224-1231, 2004.

MEDEIROS, M.JR. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 111, n. 5, p. 947-951, 2003.

MONTESANO, M.A. et al. Neonatal idiotypic exposure alters subsequent cytokine, pathology, and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 189, n. 4, p. 637-645, 1999.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOSER, M.; MURPHY, K.M. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. **Nature Immunology**, Nova York, v. 1, n. 3, p. 199-205, 2000.

OSADA, Y. et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 457-464, 2009.

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

PACÍFICO, L.G.G. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+CD25+FoxP3+ T cells independente of interleukin-10. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n. 1, p. 98-107, 2009.

PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M.A.B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 123-135, 2001.

PEARCE, E.J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 173, n. 1, p. 159-166, 1991.

PEARCE, E.J.; MacDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PULENDRAN, B.; TANG., H.; MANICASSAMY, S. Programming dendritic cells to induce Th2 and tolerogenic responses. **Nature Immunology**, Nova York, v. 11, n. 8, p. 647-655, 2010.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Seminars in Immunology**, Londres, v. 13, n. 4, p. 219-227, 2001.

READ, S.; MALMSTRÖM, V.; POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York , v. 192, n. 2, p. 295-302, 2000.

REIS E SOUSA, C. et al. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York**,** v. 186, n. 11, p. 1819-1829, 1997.

REIS E SOUSA, C. Dendritic cells in a mature stage. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 6, n. 6, p. 476-483, 2006.

RIHA, P.; RUDD, C.E. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. **Self Nonself**, Austin, v. 1, n. 3, p. 231-240, 2010.

ROGERSON, S.J. et al. Placental tumor necrosis factor alpha but not gamma interferon is associated with placental malaria and low birth weight in Malawian women. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 1, p. 267-270, 2003.

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. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 175, n. 6, p. 3920-3926, 2005.

RUTITZKY, L.I.; STADECKER, M.J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, suppl. 1, p. 327-330, 2006.

RUYSSERS, N.E. et al. *Schistosoma mansoni* proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 16, n. 6, p. 703-712, 2010.

SABIN, E.A. et al. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, n. 1, p. 269-272, 1996.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. **Nature Immunology**, Nova York, v. 4, n. 1, p. 10-11, 2003.

SANTOS, Patrícia d`Emery Alves. Determinação do perfil de resposta imune de camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni*. Recife: 2008. 90 f. **Dissertação de Mestrado (Medicina Tropical)**, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

SANTOS, P.E.A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **Parasitology Research**, Berlim, v. 107, n.1, p. 95-102, 2010.

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

SHAINHEIT, M.G. et al. Disruption of interleukin-27 signaling results in impaired gamma interferon production but does not significantly affect immunopathology in murine schistosome infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 6, p. 3169-3177, 2007.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 2, n. 2, p. 116-126, 2002.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews Immunology**, Londres, v. 2, n. 3, p. 151-161, 2002.

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

SMITS, H.H. et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 120, n. 4, p. 932-940, 2007.

SOUZA, F.P.C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

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

STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M.; MARTIN, B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. **Seminars in Immunology**, Londres, v. 19, n. 6, p. 353-361, 2007.

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. **International Immunology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 475-484, 1997.

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

TAYLOR, J.J.; MOHRS, M.; PEARCE, E.J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, n. 10, p. 5839-5847, 2006.

VELLA, A.T.; PEARCE, E.J. CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148, n. 7, p. 2283-2290, 1992.

VON RANGO, U. Fetal tolerance in human pregnancy - a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters**, Amsterdã, v. 115, n. 1, p. 21-32, 2008.

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.

WALUNAS, T.L.; BAKKER, C.Y.; BLUESTONE, J.A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 183, n. 6, p. 2541-2550, 1996.

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

WILSON, M.S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, Londres, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007.

WING, K.; YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 32, n. 9, p. 428-433, 2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis - A major public health problem. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/en/index.html>. Acesso em: 03 dez. 2012.

WYNN, T.A. et al. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses *in vivo*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 159, n. 10, p. 5014-5023, 1997.

ZHOU, X. et al. Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms. **Current Drug Targets Immune, Endocrine and Metabolic Disorders**, Hilversum, v. 5, n. 4, p. 465-475, 2005.

ZUANY-AMORIM, C. et al. Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4+ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 1, p. 377-384, 1996.

APÊNDICES

APÊNDICE A - VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

MATERNAL SCHISTOSOMIASIS ALTERS COSTIMULATORY MOLECULES EXPRESSION IN ANTIGEN-PRESENTING CELLS FROM ADULT OFFSPRING MICE

Patrícia d`Emery Alves Santos[1], Virgínia Maria Barros de Lorena[2], Érica de Souza Fernandes[1], Iana Rafaela Fernandes Sales[1], Yara de Miranda Gomes[2], Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque[1,3], Vlaudia Maria Assis Costa[1,3], Valdênia Maria Oliveira de Souza[1,4]

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

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

[3]Departamente de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

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

[*]Corresponding author: valdenia.souza@ufpe.br

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

Financial support: FACEPE, CNPq.

Summary

Adult offspring of schistosomotic mice showed alterations in immunity to a heterologous antigen, ovalbumin (OA). Prior breastfeeding induced increased production of anti-OA antibodies, while pregnancy impaired it. Here, we investigated the expression of costimulatory molecules on antigen-presenting cells (APCs) of the adult offspring of schistosomotic mothers in response to OA. Newborn mice were divided into three groups: animals Born from Infected Mothers (BIM) suckled by non-infected mothers; animals from non-infected mothers Suckled by Infected Mothers (SIM); and another group of mice born from and suckled by non-infected mothers (CONTROL). The adult offspring were immunized with OA+adjuvant, and 3-8 days following immunization, double labeling was performed (CD45R/B220 or CD11c and CD80, CD86, CD40 or HLA-DR) on spleen cells. In comparison to the CONTROL group, an early increased frequency of CD40+/CD80+ B cells was observed in mice SIM, but no alteration of CD11c+ cells was observed. In contrast, in BIM mice, the frequency of CD86+/CD11c+ cells and CD40+/CD80+/CD86+ B cells was drastically reduced. In conclusion, previous suckling by schistosomotic mothers enabled improved antigen presentation by B cells in adult offspring, whereas gestation in these mothers imprinted offspring with weak antigen presentation by APCs during the immune response to a non-related antigen.

Key words: Maternal schistosomiasis; Breastfeeding; Gestation; Costimulatory molecules; Adult offspring**.**

Introduction

Schistosoma mansoni infection is highly prevalent in tropical regions that include Northeast and Southeast Brazil (Barbosa et al. 2006). Schistosomiasis is marked by a delayed-hypersensitivity reaction with consequent granulomatous inflammation and fibroses around the parasites' eggs in the liver and intestine (Wynn et al. 2004). *S. mansoni* egg antigens elicit a dominant Th2 response (interleukin (IL)-4, IL-13, IL-10, eosinophilic infiltrated and fibroses) (Pearce et al. 1991, Wynn et al. 2004), in addition to regulatory T cell environment (Taylor et al. 2006, Wilson et al. 2007). Infected pregnant women are commonly observed in endemic areas (Barbosa et al. 2006). Regarding the influence of maternal schistosomiasis on the immunity of offspring, an attenuation of schistosomiasis symptoms in postnatal infections has been observed (Lenzi et al. 1987, Attallah et al. 2006, Caldas et al. 2008).

However, very little is known about the effects of maternal *S. mansoni* infection on the immune response to a heterologous antigen in the adult offspring (Noureldin & Shaltout 1998). Recently, in an experimental model, we demonstrated the effect of pregnancy and nursing by a schistosomotic mother on the immune response to ovalbumin (OA) in adult offspring. Suckling by infected mothers enhanced the OA-specific humoral response in the adult offspring. In contrast, gestation in *S. mansoni*-infected mice impaired the OA-specific humoral immune response in an IL-10-dependent manner (Santos et al. 2010).

The development of a cellular and humoral immune response to protein antigens is triggered by interactions between CD4+ T lymphocytes and antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells (DCs), B lymphocytes and macrophages. Following recognition of the antigen on DCs by naïve T cells, the proliferation and differentiation

of the T cells into effector Th cells, as well as the full activation of B lymphocytes, requires the engagement of CD28 on the T cell and the CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) costimulatory molecules on the APCs (Kearney et al. 1995, Bluestone 1995). However, CD80 and CD86 molecules are also ligands of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) on T cells, a molecule that induces an intracellular signal that inhibits T cell activation (Tivol et al. 1995, Waterhouse et al. 1995). Therefore, the levels of CD80 and CD86 expressed on APCs could affect the balance between CD28- and CTLA-4-dependent immune outcomes. Additionally, CD40 Ligand (CD40L) on activated T lymphocytes interacts with CD40 molecules on APCs. This CD40:CD40L interaction is necessary for different effector functions; in addition to T cell activation, it improves antigen capture and presenting capacity by APCs and supports antibody isotype switching by B lymphocytes (van Kooten & Banchereau 1997).

In this study, we investigated the expression of costimulatory molecules on APCs from adult offspring of schistosomotic mothers to explain the immunosuppressive potential induced by pregnancy as well as the enhancement of antibody production due to previous suckling by these mothers. For this, spleen cells from adult offspring born from or suckled by infected mothers were analyzed for expression of CD40, CD80 and CD86 molecules on CD11C+ cells and B cells after OA immunization. Our results showed that gestation in infected mothers impaired costimulatory molecule expression on B lymphocytes (CD45R/B220+) and myeloid APCs (CD11c+), whereas suckling by infected mothers improved the CD40 and CD80 expression on B lymphocytes in response to OA. Thus, maternal schistosomiasis can imprint in the adult offspring an altered immune response to non-parasitic protein antigens.

Materials and Methods

S. mansoni infection and adoptive nursing

Swiss webster four-week-old female mice were infected, subcutaneously, with 20 *S. mansoni* cercariae, São Lourenço da Mata (SLM) strain. On the 60th day post-infection, estruses were synchronized by administration of 5 i.u. (100 μl) of eCG (equine chorionic gonadotrophin) hormone plus, after 48 h, injection of an additional 5 i.u. (100 μl) of hCG (human chorionic gonadotrophin) (Fowler & Edwards 1957). The females were caged with male mice at a 1:1 ratio and successful mating was checked by presence of a vaginal plug. The same procedure was performed in non-infected females.

Immediately after birth, the newborns from *S. mansoni*-infected or non-infected mothers were housed in cages with interchanged mothers. After adoptive nursing, offspring mice born from infected mothers (BIM) were suckled by non-infected mothers. The offspring of non-infected mothers were suckled by infected mothers (SIM). Animals born from non-infected females were also suckled by their own mothers (CONTROL). The mice were housed in the animal care facility at the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil. The animal protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Pernambuco.

Immunization protocol and study groups

Six-week-old male offspring were taken for the experimental and control groups. The mice were immunized, subcutaneously, with 100 μg of ovalbumin (OA) (grade V; Sigma-Aldrich) emulsified in complete Freund`s adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich), at the base of the tail (0.1 ml/animal). Mice were divided into six groups (n=10): (1) mice

BIM+OA; (2) non-immunized mice BIM; (3) mice SIM+OA; (4) non-immunized mice SIM; (5) CONTROL+OA and (6) non-immunized CONTROL.

Ex vivo staining

Spleens from experimental or control mice collected 3, 5 and 8 days after OA immunization were cut with scissors and left in a plate for 1 h at 37°C in the presence of collagenase (1 mg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The cell suspension obtained was washed in RPMI 1640 (Sigma Chemical) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich) 0.1 mM L-glutamine, 0.5 mM 2-mercaptoethanol and 1% penicillin and streptomycin. Double labeling was performed after incubation (4^{o}C for 30 min) with fluorochrome-labeled antibody solutions at a concentration of 0.5 mg/10^{6} cells: PE-Cy5 anti-mouse CD45R/B220 or PE-Cy5 anti-mouse CD11c plus PE anti-mouse CD80, PE anti-mouse CD86, PE anti-mouse CD40 or PE anti-mouse HLA-DR (all from BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Immunoglobulin isotype controls conjugated to PE-Cy5 or PE were also used. After staining, the preparations were washed with PBS containing azide (0.1%) and fetal bovine serum (3%). After centrifugation, the cell pellet was resuspended in PBS with paraformaldehyde (0.5%) and maintained at 4°C until the moment of data acquisition.

Flow cytometric analysis

Data acquisition was performed using a flow cytometer (FACSCalibur (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) by collecting a minimum of 10,000 events per sample. The frequency of positive cells was analyzed using the program Cell Quest Pro in two regions. The lymphocyte region was determined using granularity (SSC) and size

(FSC) plot. Antigen-presenting cells were selected based on granularity and expression of CD11c+ (Fig. 1a) or B220+ (Fig. 1b). Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls. A descriptive analysis of the frequency of cells in the upper right quadrant (double-positive cells) was performed. To analize the frequency of cell, statistical differences ($\rho<0.05$) between groups were assessed using the one-way analysis of variance followed by multiple comparison using the Mann–Whitney test. All procedures were repeated three times to evaluate the reproducibility of the results.

Results

CD80, CD86 and CD40 costimulatory expression on myeloid APCs (CD11c+) in adult offspring from schistosomotic mothers

The frequency of CD11c+ cells expressing CD80 and CD86 in spleen cell suspension from mice born from or suckled by *S. mansoni*-infected mothers was evaluated on days 3, 5 and 8 after immunization with OA. The frequency of these cell subsets was also obtained in non-immunized mice (Fig. 2a). There was a similar frequency of CD86+/CD11c+ cells in the experimental and control groups on days 3 and 5 post-immunization (Fig. 2b and 2c). In contrast, on the eighth day post-immunization (Fig. 2d), in the mice born from infected mothers (BIM+OA), the frequency of CD11c+ cells expressing CD86 was reduced compared to the CONTROL+OA group and mice suckled in infected-mothers (SIM+OA) (Control=0.3%; BIM+OA=0.1%; SIM+OA =0.27%). No difference in the frequency of CD11c+ cells expressing CD80 was observed among the groups following immunization with OA. There was no difference in CD40+/CD11c+ cells observed

among control and experimental groups during the time period following OA immunization.

We found that gestation in or suckling by infected mothers did not alter the intensity of surface HLA-DR on CD11C+ cells (data not shown).

Pregnancy and suckling in schistosomotic mothers alters the CD80, CD86 and CD40 expression on B cells from adult offspring in response to ovalbumin

The frequency of B cells expressing CD80 and CD86 is depicted in Figure 3. Control and experimental groups demonstrated a high quantity of CD86+/B220+ cells on the third day following OA immunization (Fig. 3a and 3b). The percentage of cells expressing B220 and CD86 was drastically decreased on the eight day after immunization (Fig. 3d), but the level was much more decreased in the BIM+OA group at the end of the time course in comparison to the CONTROL+OA and SIM+OA groups (CONTROL+OA=1.2%; BIM+OA =0.2%; SIM+OA=1.2%).

Regarding CD80+/B220+ cells, on the third day post-immunization, mice previously suckled in infected mothers showed an increased frequency of double-positive cells (Control=1.4%; BIM=1.8%; SIM=3.5%) (Fig. 3b). There was a high frequency of these cells on the fifth day post-immunization (Control=12.2%; BIM=16.1%; SIM=13.7%) in the control and experimental groups (Fig. 3c). On the eighth day, the frequency of B cells expressing CD80 declined to similar levels in the CONTROL+OA and SIM+OA groups. In contrast, at this time point, in animals born from infected mothers, the frequency of CD80+/B220+ cells was much decreased compared to CONTROL+OA and SIM+OA mice (Control=4.2%; BIM=0.9%; SIM=2.9%) (Fig. 3d).

In response to OA immunization, in the SIM+OA group there was a six-fold increase in the frequency of B220+ cells expressing the CD40 costimulatory molecule as soon as three days after OA immunization (Fig. 3b). This also occurred for BIM+OA group, but to a lesser extent (four-fold; CONTROL+OA=2.5%, BIM+OA=10.2%, SIM+OA=15.3%; Fig. 3b). For all the groups, a high frequency of CD40+/B220+ cells was observed on the fifth day (Fig. 3c), followed by a decrease on the eighth day (Fig. 3d). However, on the last day of the time course, in the BIM+OA group there were much less double-positive cells (0.7%) than in OA-immunized CONTROL (2.7%) and SIM (1.6%) mice.

Neither gestation in nor suckling by infected mothers changed the intensity of surface HLA-DR on B cells (data not shown).

Discussion

We have demonstrated that gestation in *S. mansoni*-infected mothers influenced the immunity of their offspring on a long-term basis by suppressing the humoral immune response to an unrelated antigen, ovalbumin. In contrast, suckling by infected mothers improved the humoral immune response to this antigen in adult life (Santos et al. 2010). Here, we demonstrate that in adult offspring born from schistosomotic mothers, the ability of APCs to present antigen after triggering the immune response to protein antigens was weakened. In contrast, previous contact with the milk of infected mothers enhanced the ability of B lymphocytes to present antigen following OA-specific stimulus.

To continue the previous study design (Santos et al. 2010), all offspring were submitted to immunization with OA emulsified in an adjuvant for optimal conditions of

Th-cell activation to a soluble protein antigen. In general, approximately 1-7 days are required for an effective immune response to occur in the secondary lymphoid organs, with initial DC contact with naïve Th cells (1-3 days) and later B cell contact with activated Th cells (3-7 days). The dynamics of expression of costimulatory molecules on APCs may differ depending on antigen stimulus (virus, bacteria, parasite infections or protein immunizations) and lead to different immune outcomes. Immunization with OA in adjuvant elicits an effective immune response, with isotype-switched antibodies and cytokines present on the eighth day post-immunization (Ferreira et al. 1995, Souza et al. 2002). Here, analysis of APCs from OA-immunized adult offspring of non-infected mothers showed that CD80 and CD40 molecules on APCs could be better detected on day 5, and CD86 could be best detected on day 3 post-immunization. This last molecule is constitutively expressed and its up-regulation is rapid after antigen recognition (Hathcock et al. 1994).

For adult offspring from *S. mansoni*-infected mothers (BIM group) immunized with OA, the gestation induced similar frequencies of CD80+ and CD40+/CD11c+ cells as those in offspring born from non-infected mothers. However, there was a striking impairment of CD86+/CD11c+ cells 8 days after OA immunization. Straw et al. (2003) demonstrated that murine *S. mansoni* infection induced high CD80 and CD40 expression, but not increased CD86, on purified DCs. The lower expression of only the CD86 marker in offspring born from infected mice suggests a decreased ability to down-modulate CD80 and CD40 expression due to the effect of the previous maternal infection.

It is known that the CD86:CD28 preferential interaction during the DC-T cell initial contact is required for stimulating the immune response, whereas CD80-CTLA-4

interactions induce non-responsiveness in T cells (Judge et al. 1999). In BIM offspring, the APCs may favor signaling by CD80, rather than co-stimulation by CD86, in their interactions with T cells, resulting in impairment in the T-dependent humoral response in these mice (Santos et al. 2010).

Regarding B lymphocytes, BIM offspring demonstrated a very low frequency of CD86+ or CD80+ B cells 8 days after OA immunization. We noticed an increase in the percentage of CD40+ B cells as soon as three days after OA immunization, but this increase was followed by a drastic decrease on the eighth day post-immunization compared to the control group. These findings suggest that the appropriate initial activation status of B cells was not maintained in the BIM group. We have demonstrated that the effect of IL-10 in this microenvironment is required for ineffective antibody production in these offspring (Santos et al. 2010). This cytokine can impair the expression of costimulatory molecules on APCs (Moore et al. 2001) and cognate interactions between specific T cells and DCs, as well as between T and B cells. Taken together, the expression profile of costimulatory molecules on APCs (CD11c+ and B cells) from BIM would not promote help from CD4+ T cells.

Offspring suckled by infected mothers had no significant alteration in the amount of CD11c+ cells expressing costimulatory markers throughout the OA immunization time course. In contrast, B cells from OA-immunized adult offspring that had previous contact with milk from infected mothers showed an upregulation in these markers. These mice demonstrated a rapid increase in the frequency of B cells expressing CD40 and CD80 (third day) followed by a decrease to levels similar to offspring suckled by non-infected mothers (CONTROL+OA). Although CD86 expression was not upregulated in B cells in response to OA, the expression profile for

this molecule was similar to that of the control group. Our data indicate that these B cells improve the intercellular communication pathway thorough of the ligation of CD28 on T cells and CD80/CD86 on B cells (Lumsden et al. 2003). Furthermore, the interaction of CD40/CD40L promotes the maintenance of T cell activation, and it is the main mechanism for T cells to help B cells in antibody production and isotype switching (van Kooten & Banchereau 1997, Lumsden et al. 2003).

Parasite carbohydrate antigens and antibodies are present in milk from schistosomotic mothers (Lenzi et al. 1987, Attallah et al. 2003). Montesano et al. (1999) demonstrated the requirement of anti-SEA antibody during suckling for enhancement of anti-SEA humoral immunity in postnatal murine infections. *S. mansoni* eggs and worms share with maternal milk the immunomodulatory sugar, Lacto-N-Fucopentose III (LFNP-III) that induces B lymphocyte proliferation (Thomas & Harn 2004). It is possible that antibodies and immunomodulatory sugars in milk from infected mice imprint a B cell pre-activation status in the descendants, thereby improving antibody production in SIM mice in adult life (Santos et al. 2010).

In conclusion, it is likely that the mechanisms modulating antibody production after OA immunization in adult offspring from schistosomotic mothers involve differential expression of costimulatory molecules on CD11c+ cells (low CD86) previously “programmed” during gestation, as well as on B cells (high CD40/CD80) due to suckling in their mother. Although other immunomodulatory molecules have not been investigated yet, this study highlights that sensitization in early life can have immunomodulatory effects on the response to heterologous proteins (allergens, self antigens or vaccines), on a long-term basis, in individuals from endemic areas for schistosomiasis.

Acknowledgements

We thank Maria da Conceição Batista for competent technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health - PDTIS/FIOCRUZ for the use of its facilities. This work was conducted in compliance with Brazilian laws.

References

Attallah AM, Ghanem GE, Ismail H, El Waseef AM 2003. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *Am J Trop Med Hyg 68*: 647-651.

Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-emshaty HM, Elsheikha HM 2006. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitol Res 99*: 137-145.

Barbosa CS, Favre TC, Wanderley TN, Callou AC, Pieri OS 2006. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101* (suppl.I): 55-62.

Bluestone JA 1995. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity 2*: 555-559.

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMD, Oliveira RC, Gazzinelli G 2008. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop 108*: 109-117.

Ferreira AP, Faquim ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS 1995. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. *Cell Immunol 162*: 202-210.

Fowler RE, Edwards RG 1957. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrinol 15*: 374-384.

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ 1994. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med 180*: 631-640.

Judge TA, Wu Z, Zheng XG, Sharpe AH, Sayegh MH, Turka LA 1999. The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. *J Immunol 162*: 1947-1951.

Kearney ER, Walunas TL, Karr RW, Morton PA, Loh DY, Bluestone JA, Jenkins MK 1995. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J Immunol 155*: 1032-1036.

Lenzi JA, Sobral AC, Araripe Jr, Grimaldi Filho G, Lenzi HL 1987. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz 82*: 257-267.

Lumsden JM, Williams JA, Hodes RJ 2003. Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo. *J Immunol 170*: 781-787.

Montesano MA, Colley DG, Freeman GL, Secor WE 1999. Neonatal exposure to idiotype induces Schistosoma mansoni egg antigen-specific cellular and humoral immune responses. *J Immunol 163*: 898-905.

Moore KW, de Wall Malefyt R, Coffman RL, O`Garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol 19*: 683-765.

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

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med 173*: 159-166.

Santos PA, Sales IR, Schirato GV, Costa VM, Albuquerque MC, Souza VM, Malagueño E 2010. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res 107*: 95-102.

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS 2002. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res 35*: 81-89.

Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ 2003. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J Immunol 170*: 727-734.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol 176*: 5839-5847.

Thomas PG, Harn DAJ 2004. Immune biasing by helminth glycans. *Cell Microbiol 6*: 13-22.

Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity 3*: 541-547.

van Kooten C, Banchereau J 1997. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol 9*: 330-337.

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science 270*: 985-988.

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol 85*: 148-154.

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev 201*: 156-167.

Figures and Legends

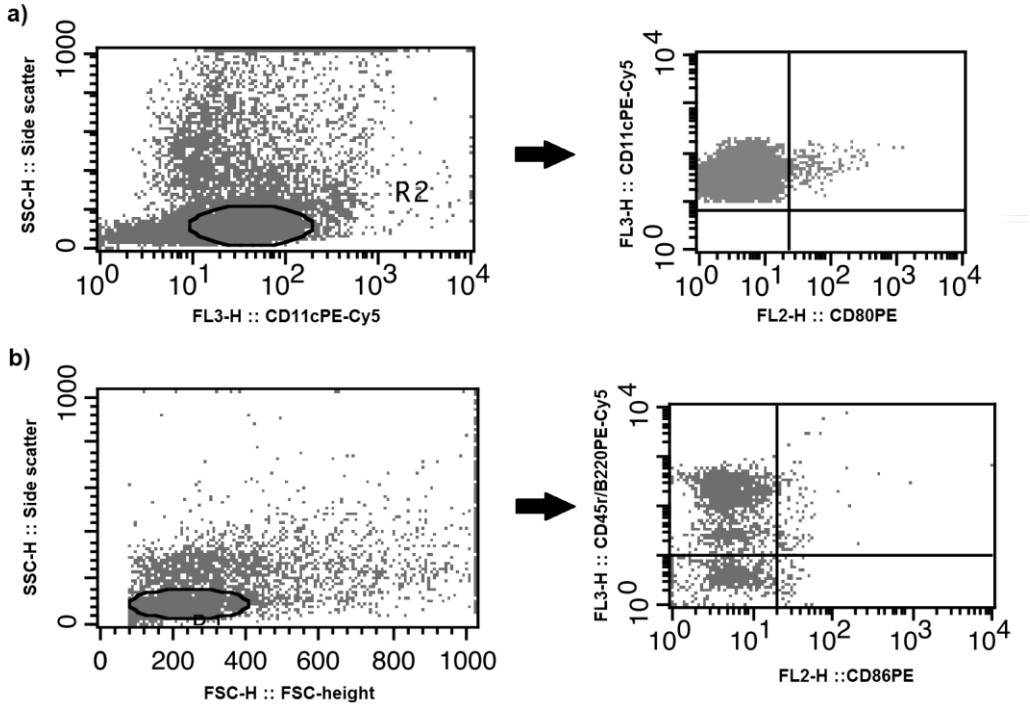


Figure 1. Gating strategy for the analysis of costimulatory expression on myeloid APCs (CD11c+) (a) and B lymphocyte (CD45/B220+) (b). The cell region was determined in the forward/side-scatter plot and then a dot-plot was accessed to determine doble labeling frequency.

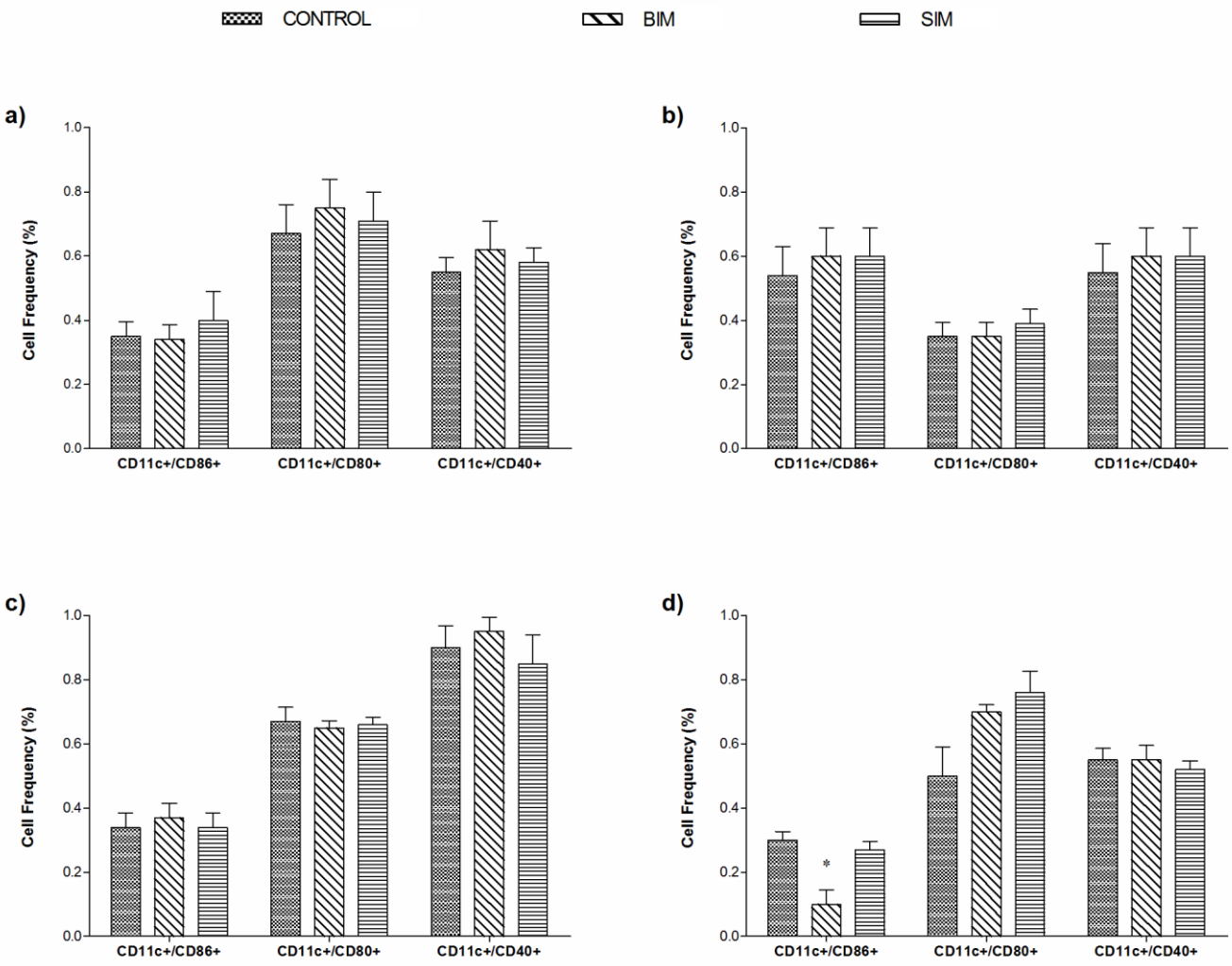


Figure 2. CD80, CD86 and CD40 costimulatory expression on myeloid APCs (CD11c+) in adult offspring from schistosomotic mothers. Double labeling was performed with fluorochrome-labeled antibody PE-Cy5 anti-mouse CD11c plus PE anti-mouse CD80, CD86 or CD40 in cells from non-immunized mice (a) or on the third (b) fifth (c) and eighth (d) day post-immunization with OA in CFA. Eighth day post-immunization (d), in the mice born from infected mothers (BIM+OA), the frequency of CD11c+ cells expressing CD86 was reduced compared to the CONTROL+OA group and mice suckled in infected-mothers (SIM+OA). The results represent the median of frequency of cell for seven mice/group ± standard error. *$p<0.05$ compared with the Control+OA group.

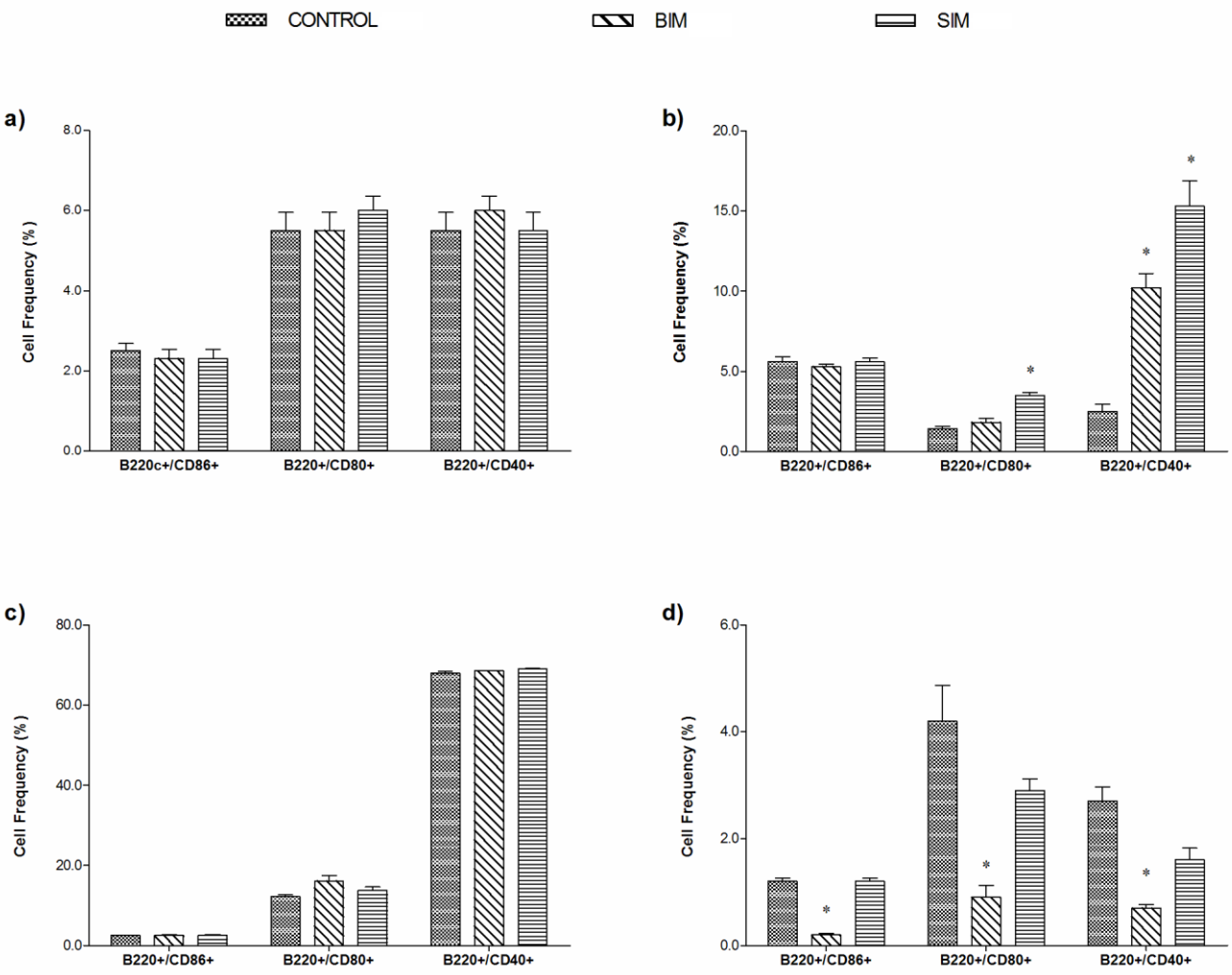


Figure 3. Frequency of CD45/B220+ cells expressing CD80, CD86 and CD40 in spleen cell from born (BIM+OA) or suckled (SIM+OA) mice from *S. mansoni*-infected mothers. Double labeling was performed with fluorochrome-labeled antibody PE-Cy5 anti-mouse CD45/B220+ plus PE anti-mouse CD80, CD86 or CD40 in cells from non-immunized mice (a) or on the third (b), fifth (c) and eighth (d) day post-immunization with OA in CFA. Mice previously suckled in infected mothers showed an increased frequency of CD40+ and CD80+/B220+ cells on third day (b) and declined on the eight day (d) while animals born from infected mothers the frequency of these cells decreased compared to CONTROL+OA and SIM+OA mice (d). The results represent the median of frequency of cell for seven mice/group±standard error. *$p<0.05$ compared with the Control+OA group.

APÊNDICE B - VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS

BREASTFEEDING AND PREGNANCY IN SCHISTOSOMOTIC MOTHERS IMPROVES THE DOWN-REGULATION TO A NON-RELATED ANTIGEN DURING POST-NATAL *SCHISTOSOMA MANSONI* INFECTION

Patrícia d`Emery Alves Santos[1], Virgínia Maria Barros de Lorena[2], Érica de Souza Fernandes[1], Iana Rafaela Fernandes Sales[1], Yara de Miranda Gomes[2], Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque[1,3], Vlaudia Maria Assis Costa[1,3], Valdênia Maria Oliveira de Souza[1,4]

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

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

[3]Department of Tropical Medicine, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

[4]Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

[*]Correspondence to: V. M. O. Souza, Laboratory of Immunology from LIKA/UFPE, Av. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: valdenia.souza@ufpe.br.

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

Financial support: FACEPE, CNPq.

Abstract

Previous exposure to parasite antigens, during helminth infections in the mother, may have altered immunity in relation to the homologous antigens of adult offspring in cases of post-natal infection, but little is known about immunity to heterologous antigens. The present study investigated immunity against ovalbumin (OA), in adult offspring of schistosomotic mothers, when exposed to infection or i.p. administration of *Schistosoma mansoni* soluble eggs antigen (SEA). Male mice, shortly after adoptive suckling, were divided into four groups: animals Born from Infected Mothers (BIM), animals Suckled by Infected Mothers (SIM) or animals Born/Suckled by Infected Mothers (BSIM) and animals born/suckled by non-schistosomotic mothers (CONTROL). On the 45th day, they were infected (80 cercariae) or injected with SEA (i.p). In some of the CONTROL animals this stage was not carried out (UNINFECTED/NON-SEA). All were immunized with OA+adjuvant. The *in vivo* hypersensitivity reactions (HR), IgG1 and IgG2a levels, cytokines production and regulatory T-cells (Tregs) frequency in spleen cultures were compared to CONTROL. Upon the infection, there were high IL-4 and IL-10 production and Tregs frequency, mainly in the SIM group. There was suppression in anti-OA immediate HR and low levels of IFN-γ, it was more intense in those who had suckled and gestated in schistosomotic mothers, respectively. In the BIM and SIM animals, when sensitized with SEA, the anti-OA immunity was suppressed, with higher levels of IL-10 and a greater frequency of Tregs cells. There was no change in the production of anti-OA antibodies. Post-natal infection in BIM and SIM offspring also led to lower levels of IL-4 and IFN-γ compared to the CONTROL animals. Then post-natal infection in offspring of schistosomotic mothers thus has great immunosuppressive potential, in particular in those who have had previous contact with milk from these mothers.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Immunomodulation; Ovalbumin; Pregnancy, Suckling; Descendants.

1. Introduction

Schistosomiasis is endemic in 76 countries, with up to 207 million individuals estimated to be infected around the world (Lustigman et al., 2012). In Brazil, the only species of *Schistosoma* found is *S. mansoni* (Amaral et al., 2006), which is responsible for chronic infection through eggs that are retained in liver and intestinal tissue, typically causing eosinophilic inflammation and a granulomatous reaction, which is gradually replaced by fibrous deposits (Gryseels et al., 2006). However, in endemic areas, most patients present with the chronic asymptomatic phase and only 4-12% develop serious manifestations of the disease (Caldas et al., 2008). This is related to an immunomodulatory phenomenon, in which the initial Th1 response against the cercarian antigens is inhibited by a powerful and predominant Th2-type response, with production of IL-4, IL-5 and IL-10 caused by the antigens of the eggs (Pearce et al., 1991; Finkelman et al., 1991; Moore et al., 2001). There is also stimulation of regulatory T lymphocytes (Tregs) — secretors of large quantities of IL-10 — which control the granulomatous reaction around the eggs in the host (McKee and Pearce, 2004). Studies in animals and humans show that this immunosuppressive profile generated by *S. mansoni* infections extends to the Th1 and Th17 specific for heterologous viral or bacterial antigens (Actor et al., 1993; Sabin et al., 1996) and auto-immune diseases (La Flamme et al., 2003; Osada et al., 2009; Ruyssers et al., 2010). Additionally there is an attentuation of the Th2 responses in cases of allergic reactions (Medeiros et al., 2003; Smits et al., 2007).

In endemic areas, there are around 10 million pregnant women and 40 million women of childbearing age who are chronically infected with *Schistosoma* (Friedman et al., 2007; Hillier et al., 2008) and several studies have been conducted for evaluating the consequences of maternal infection on the immunity of the offspring. In relation to homologous antigens, in cases of post-natal infection, the immunomodulation phenomenon appears to be preserved. Exposure to parasite antigens, as well as, the mother's anti-*Schistosoma* antibodies during the prenatal period and suckling was associated with modulation of the immune response in offspring. A weaker or even absent granulomatous response to *S. mansoni* eggs has been reported in mice born and suckled by

schistosomotic mothers and the levels of expression of the IL-12 and TGF-β genes were significantly higher in animals exposed to post-natal infection (Lenzi et al., 1987; Attallah et al., 2006; Othman et al., 2010). However, the immunomodulation in offspring to heterologous antigens there has been little descripted.

In humans, the *Schistosoma haematobium* mother infection during pregnancy reduced the efficacy of the BCG vaccination (Calmette-Guérin Bacillus) (Malhotra et al., 1999). In the case of vaccine antigens, it has been suggested that prior contact with parasite components in the mother may have an effect on the immune response to these antigens in offspring during their infancy (LaBeaud et al., 2009). A positive correlation was observed between levels of IgE specific for the *S. mansoni* antigen and the manifestations of gastrointestinal allergy in young who had received milk from infected mothers (Noureldin and Shaltout, 1998). In an experimental study, the effect of pregnancy and suckling were shown separately in mothers infected by *S. mansoni* on the anti-ovalbumin (OA) immune response. Adult animals who had previously received milk from infected mothers displayed an enhanced OA-specific humoral response and greater production of IL-2. On the other hand, gestation in schistosomotic mothers suppressed the OA-specific immune response of the offspring in an IL-10-dependent manner (Santos et al., 2010).

Knowing the risk for adult offspring of schistosomotic mothers living in an endemic area becoming infected by the parasite, we examined the intensity of the anti-OA imune response under conditions of post-natal contact with S. *mansoni* antigens. To this end, following adoptive suckling, the mice were divided into four groups: animals Born from Infected Mothers (BIM), animals Suckled by Infected Mothers (SIM) or animals Born/Suckled by Infected Mothers (BSIM) and animals born/suckled by non-schistosomotic mothers (CONTROL). When full-grown, the animals were submitted to infection or i.p. administration of SEA, followed by immunization with OVA in adjuvant. It was noted that infection in all groups of offspring led to suppression of IFN-γ levels and the immediate anti-OA hypersensitivity response, especially in BIM and SIM animals, respectively. A high production of IL-4 and IL-10, as well as increased frequency of Tregs cells was observed in

all groups, mainly in the SIM group. In the presence of SEA, the anti-OVA immunity was suppressed in animals born or suckled in infected mothers, with higher levels of IL-10 and a higher frequency of Tregs cells. There was no change in the production of anti-OA antibodies in the groups of infected offspring or those who received SEA. In conclusion, the post-natal infections in offspring born or suckled by schistosomotic mothers are capable of generating a potential immunosuppressor of heterologous antigens, although they do not alter the production of antibodies. This effect appears to be more pronounced when the milk from schistosomotic mothers is present.

2. Materials and Methods

Animals and Schistosoma mansoni infection

Swiss webster four-week-old female mice were infected, subcutaneously, with 20 *S. mansoni* cercariae, São Lourenço da Mata (SLM) strain. On the 45th day the infection was confirmed by Kato-Katz method (Katz et al., 1972). On the 60th day post-infection, estruses were synchronized by administration of 5 i.u. (100 μl) of eCG (equine chorionic gonadotrophin) hormone plus, after 48 h, injection of an additional 5 i.u. (100 μl) of hCG (human chorionic gonadotrophin) (Fowler and Edwards, 1957). The females were caged with male mice at a 1:1 ratio and successful mating was checked by presence of a vaginal plug. The same procedure was performed in non-infected females. 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, PE, Brazil. The animal protocol was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of the Oswaldo Cruz Foundation and are in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Immunization/Infection protocol and study groups

Immediately after birth, the newborns from *S. mansoni*-infected or non-infected mothers were housed in cages with interchanged mothers. After adoptive nursing, offspring mice born from infected mothers (BIM) were suckled by non-infected mothers and offspring of non-infected mothers were suckled by infected mothers (SIM). Another group of animals was born and suckled by schistosomotic mothers (BSIM). Animals born from non-infected females were also suckled by their own mothers (CONTROL). Six-week-old male offspring were infected with 80 *S. mansoni* cercariae, SLM strain (confirmed by Kato-Katz method) and, 60 days post-infection, were immunized, subcutaneously, with 100 μg of ovalbumin (OA) (grade V; Sigma-Aldrich) emulsified in complete Freund`s adjuvant (CFA) (Sigma-Aldrich), at the base of the tail (0.1 ml/animal). The immunization was also carried out in non-infected control offspring. Mice divided into five groups (*n*=5): (1) mice BIM; (2) mice SIM; (3) mice BSIM and (4) mice CONTROL subsequently infected with *S. mansoni* and immunized with OA+CFA; (5) mice CONTROL UNINFECTED and immunized with OA+CFA. Other groups of six-week-old male offspring, instead of being infected with *S. mansoni* cercariae received intraperitoneal injection of *S. mansoni* soluble egg antigens (SEA) and after 48 hours, were immunized with OA+CFA. The immunization was also carried out in control offspring without SEA. More five study groups were formed (*n*=5): (6) mice BIM; (7) mice SIM; (8) mice BSIM and (9) mice CONTROL subsequently administered with SEA and immunized with OA+CFA, and (10) CONTROL NON-SEA and immunized with OA+CFA.

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 OA was injected into one hind footpad and the same volume of saline in the other. Footpad swelling was periodically measured from 0.5 to 24 h using a pocket thickness gauge (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) and expressed as the increase in thickness relative to the saline-injected paw. The results are

expressed as the median ± standard error for each group. Mice non-immunized with OA were equally challenged to test the controls for nonspecific swelling (data not shown).

Detection of OA-specific antibodies by ELISA

On the ninth day after immunization, blood samples were taken from each group under intramuscular anesthesia with Xilazine HCl/Ketamine HCl. Plasma samples were tested individually for IgG1 and IgG2a antibodies using OA-coated (20 μg/ml) 96-well plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA). The reactions were developed with a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an OPD (O-phenylenediamine; Sigma) solution in 0.1 M citrate buffer plus H_2O_2. The plates were read (450 nm) in an automated ELISA reader. Titration curves were carried out for all the samples. The results are expressed as the median of the sample optical density (O.D.) from each group in an appropriated dilution (within the linear part of the titration curve) for each isotype ±standard error (1:2.048 for IgG1 or 1:16 for IgG2a).

Cell Culture

Nine days after immunization, the spleen of each animal was 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 10^7 (24 h) or 6×10^6 (72 h) cells/ml in 24-well tissue culture plates (Costar Cambridge, MA, USA) and subsequently stimulated with OA (500 μg/ml), SEA (20 μg/ml) or concanavalin A (Con-A) (5 μg/ml) at 37°C in 5% CO_2. Supernatants were harvested after 24 or 72 h and assayed for cytokine content: IL-4 (24 h), IL-10 and IFN-γ (72 h). Cells cultured for 72 h were collected and labeled for regulatory T cells detection.

Cytokine measurements

The cytokines were measured using specific two-site sandwich ELISA, using the following monoclonal antibodies: for IL-4, 11B11 and biotinylated BVD6.24G2; for IL-10, C252-2A5 and biotinylated SXC-1; and for IFN-γ, XMG 1.2 and biotinylated AN18. Binding of biotinylated antibodies was detected using a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an ABTS (2-2′-azinobis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulphonic acid); Sigma) solution in 0.1 M citrate buffer plus H_2O_2. The plates were read (405 nm) in an automated ELISA reader. The samples were quantified by comparison with the standard curves of purified recombinant cytokines (rIL-4, rIL-10 or rIFN-γ), with resulting detection limits of 0.3125 ng/ml for IL-4 or IL-10 and 2.5 ng/ml for IFN-γ.

Regulatory T cells staining and flow cytometric analysis

Spleen cells of male offspring from all groups were subjected to double-labeling with fluorochrome-labeled antibody solutions at a concentration of 0.5 mg/10^6 cells, specific for Tregs cells: PE anti-mouse FoxP3 plus PE-Cy5 anti-mouse CD4 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). After staining, the preparations were washed with PBS containing azide (0.1%) and fetal bovine serum (3%). After centrifugation, the cell pellet was resuspended in PBS with paraformaldehyde (0.5%) and maintained at 4°C until the moment of data acquisition. Data acquisition was performed using a flow cytometry (FACSCalibur (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) by collecting a minimum of 10.000 events per sample. The frequency of positive cells was analyzed using the program Cell Quest Pro and limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and isotype controls. A descriptive analysis of the frequency of cells in the upper right quadrant (double-positive cells) was performed. The results are expressed as the mean of the frequency of cells double-labeled from each group ±standard deviation.

Statistical analysis

To analyze the hypersensitivity reactions and antibody production, statistical differences between groups were assessed using the Wilcoxon test (treatment×time) and Kruskal-Wallis test, respectively, followed by multiple comparisons using the Mann-Whitney test. For cytokine analysis and flow cytometric, a one-way analysis of variance followed by multiple comparison using the Tukey's method was used. Calculations for statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and values of $\rho<0.05$ were considered significant. All procedures were repeated three times to evaluate the reproducibility of the results.

3. Results

3.1. The immediate anti-OA hypersensitivity reactions are suppressed on contact with *S. mansoni* antigens and the strongest offspring are those that have previously been suckled by schistosomotic mothers.

The offspring born (BIM), suckled by (SIM) and born/suckled by (BSIM) schistosomotic mothers, along with animals born/suckled by non-schistosomotic females (CONTROL) underwent post-natal infection 60 days after immunization by OA in adjuvant. To evaluate the anti-OA HR *in vivo*, all the groups were challenged by aggregate OA in the footpad and the extent of the swelling was measured. The same procedure was carried out in offspring born/suckled by mothers who were not infected with *S. mansoni* (CONTROL UNINFECTED).

As shown in Figure 1A, all the infected groups displayed the immediate hypersensitivity reaction (0.5 hours) statistically less than the non-infected group (CONTROL UNINFECTED). This suppression persists in the immediate responses at 3 and 6 hours and was observed at 9 hours only in the SIM group. At 6 and 9 hours, this later group also exhibited an HR statistically lower than that of the group of offspring of non-schistosomotic mothers (CONTROL).

In relation to the delayed anti-OA hyersensitivity response (24 hours), no statistical diferences were observed between the groups of offspring of schistosomotic and non-

schistosomotic mothers undergoing post-natal infection and the animals in the CONTROL UNINFECTED group.

As a way of evaluating the action of *S. mansoni* egg antigens alone on the anti-OA HR of offspring of schistosomotic mothers, all the groups received SEA (instead of infection) and, after 48 hours, were immunized with OA+CFA (Figure 1B). On comparison with the CONTROL NON-SEA group, it was found that there was no significant difference between the offspring born/suckled by non-infected mothers who received SEA (CONTROL). By contrast, the group of animals born from schistosomotic mothers, BIM, exhibited statistically lower immediate 0.5 and 3 hours hypersensitivity reactions. In the groups who received milk from infected mothers, SIM and BSIM, the reduction in anti-OA HR occurred after 3 and 6 hours.

In the case of the delayed (24 hours) anti-OA hypersensitivity response, no statistically significant diferences were found between the groups of offspring of schistosomotic or non-schistosomotic mothers who received SEA and the animals from the CONTROL NON-SEA group.

3.2. Neither *S. mansoni* infection nor administration of SEA alter the production of specific anti-OA IgG1 and IgG2a in the offspring of schistosomotic mothers in adult life.

Nine days after immunization, blood was taken from all the groups and the levels of antibodies in plasma were measured using ELISA. The production of anti-OA IgG1 (Fig. 2A) and IgG2a (Fig. 2C) antibodies exhibited similar levels in the groups of offspring of schistosomotic and non-schistosomotic mothers which had been infected later in adult life, without significant differences in relation to the CONTROL UNINFECTED group. The same result was observed when the different groups received SEA as adults, without significant differences in relation to the CONTROL NON-SEA group (Figs. 2B and 2D).

3.3. Contact with *S. mansoni* antigens stimulates the production of IL-4, albeit at a lower intensity in the adult offspring of schistosomotic mothers with post-natal infection.

Spleen cells from the animals in the study groups were cultured in the presence of OA or Con-A, for 24 or 72 hours, and the supernatant was collected for quantification of secreted cytokines. Figure 3A shows that, under mitogenic stimulation, there was significantly higher production of IL-4 in all the groups of infected animals, compared to the CONTROL UNINFECTED group. However, in the groups of offspring of schistosomotic mothers, production of IL-4 was lower in comparison to the group of offspring of non-schistosomotic mothers (CONTROL). Furthermore, IL-4 was only found in the supernatant of the latter group under antigenic stimulus *in vitro* with OA.

Figure 3B shows levels of IL-4 in the different groups that received SEA in adult life. Levels of this cytokine were only found under mitogenic stimulation. Under these conditions, lower levels of IL-4 were found in the BSIM group and higher levels in the suckled by (SIM) and born from (BIM) schisotosomotic mothers groups, compared to the CONTROL and CONTROL NON-SEA.

3.4. Post-natal infection led to greater production of IL-10, in particular in the offspring of schistosomotic mothers, while sensitization with SEA stimulated the production of IL-10 in the offspring of these mothers.

With regard to the production IL-10, under stimulation with Con-A, the infected animals (BIM, SIM, BSIM and CONTROL) produced significantly higher levels of this cytokine than non-infected animals (CONTROL UNINFECTED) (Fig. 4A). Looking only at the infected groups, levels of IL-10, there were no statistically significant diferences between all these groups and the CONTROL group. In response to OA, the production of IL-10 was statistically lower in infected animals (CONTROL) and in animals born from (BIM) or only suckled by (SIM) schistosomotic mothers in comparison with the CONTROL UNINFECTED group immunized with OA. However, there was higher production of this cytokine in the BSIM animals immunized with OA, compared to the CONTROL.

For the offspring who received SEA, with Con-A stimulus, there was lower production of IL-10 in the SIM group and in the CONTROL in comparison to the CONTROL NON-SEA (Fig. 4B). Looking only at the groups that received SEA, the levels of IL-10 were higher in animals in the BIM group compared to the CONTROL. After stimulation with OA, there was significantly greater production of IL-10 in the BIM group, while production was lower in the CONTROL group, in comparison to the CONTROL NON-SEA. There was no significant difference in animals that received milk from schistosomotic mothers. Comparing only the groups that received SEA, the levels of IL-10 were higher in animals from the BIM, SIM and BSIM groups compared to the CONTROL.

3.5. In adult offspring, contact with *S. mansoni* antigens suppressed production of IFN-γ, in particular in the offspring of schistosomotic mothers, when infected.

In the case of IFN-γ (Fig. 5A), in comparison with the CONTROL UNINFECTED group, a significant reduction was observed in the synthesis of this cytokine under stimulation by OA and Con-A in all groups of infected animals. In comparison with the CONTROL group and under mitogenic stimulation, there was lower production of IFN-γ in the BIM and SIM groups, and no alteration in the BSIM group. In the case of stimulation with OA antigen, a reduction in production occurred in the BIM group and there was higher production in the BSIM group. There was no statistically significant difference in the SIM group.

Figure 5B presents analysis of IFN-γ for adult offspring sensitized with SEA. Under stimulation with Con-A, the groups that received SEA, SIM, BSIM and the CONTROL produced lower levels of IFN-γ compared to the CONTROL NON-SEA group. There was no difference in the levels of this cytokine in the BIM group. Looking only at the groups that received SEA, the BIM, SIM and BSIM produced more IFN-γ than the CONTROL group. After stimulation with OA, there was a significant reduction in the synthesis of this cytokine in all the groups that received SEA

compared to the CONTROL NON-SEA group. The SIM group produced significantly higher levels of IFN-γ compared to the CONTROL group that received SEA.

3.6. Post-natal infection caused an increase in the frequency of Tregs cells in adult offspring, in particular in those suckled by schistosomotic mothers, while sensitization with SEA led to the presence of Tregs in offspring born of these mothers.

The frequency of regulatory T-cells was evaluated in spleen cells from the animals under study by flow cytometry. The cells were obtained from cell cultures after stimulation with OA, Con-A or SEA (72 hours) and double-marked with monoclonal anti-CD4 and anti-FoxP3 antibodies.

Figure 6A shows the percentage of Tregs cells in the groups studied. In the cultures without stimulation (basal), the infected groups exhibited a higher frequency of Tregs when compared to the CONTROL UNINFECTED group. The SIM group showed a higher frequency (BIM=0.65%; SIM=1.63%; BSIM=0.50%; CONTROL=0.80%; CONTROL UNINFECTED=0.24%) compared to the other infected groups. In the case of Con-A stimulation, the spleen cells of all groups exhibited similar regulatory T cells frequencies (BIM=0.14%; SIM=0.39%; BSIM=0.15%; CONTROL=0.29%; CONTROL UNINFECTED=0.35%).

In the cultures stimulated with OA, the infected SIM and CONTROL groups saw an increase in the frequency of Tregs compared to the CONTROL UNINFECTED groups (BIM=0.77%; SIM=1.0%; BSIM=0.47%; CONTROL=1.07%; CONTROL UNINFECTED=0.49%). The same was observed in the case of *in vitro* stimulation with SEA (BIM=0.50%; SIM=0.80%; BSIM=0.47%; CONTROL=0.95%; CONTROL UNINFECTED=0.33%). However, a low frequency of Tregs was observed in the cells stimulated with OA from the BSIM group, compared with the CONTROL group.

In the animals that received SEA (Fig. 6B), the basal frequency for Tregs was higher in BIM and SIM offspring than in those from the CONTROL groups with or without SEA (BIM=0.73%;

SIM=0.74%; BSIM=0.33%; CONTROL=0.32%; CONTROL NON-SEA=0.18%). In the case of stimulation with SEA, the spleen cells from the BIM and SIM groups exhibited higher frequencies of Tregs compared to the frequency observed in the CONTROL NON-SEA (BIM=0.73%; SIM=0.50%; BSIM=0.32%; CONTROL=0.34%; CONTROL NON-SEA=0.21%). The BIM group exhibited the highest frequency in relation to the CONTROL.

No diferences were observed in the frequency of Tregs cells after stimulation with OA in any of the groups under study (BIM=0.52%; SIM=0.40%; BSIM=0.45%; CONTROL=0.38%; CONTROL NON-SEA=0.47%).

In the cultures stimulated with Con-A, the groups that received SEA did not exhibit any differences when compared to the CONTROL NON-SEA group. However, in the BSIM group, there was a high frequency of Tregs compared to the CONTROL group (BIM=0.04%; SIM=0.05%; BSIM=0.21%; CONTROL=0.05%; CONTROL NON-SEA=0.13%).

4. Discussion

It is known that infection by *S. mansoni* and soluble egg antigens negatively modulates the immune response of the host to homologous and heterologous antigens (Lenzi et al., 1987; Sabin et al., 1996; Sewell et al., 2003; La Flamme et al., 2003; Attallah et al., 2006; Smits et al., 2007; Osada et al., 2009; Othman et al., 2010; Cardoso et al., 2012). In the experimental model presented here, involving immunization with OA in adjuvant (Souza et al., 2002), infection by this trematode also shifted the anti-ovalbumin response to a Th2/Tregs suppressor profile with higher production of IL-4/IL-10, an excellent frequency of Tregs cells, reduction in immediate HRs and the production of IFN-γ. Here, contact with the soluble eggs antigen was less potent than the induction of the anti-OA suppression, with lower production of IFN-γ. The main aim of the present study was to investigate the intensity of the anti-OA immune response in adult offspring born or suckled by schistosomotic mothers, after post-natal contact with *S. mansoni* antigens.

In this regard, it was observed that gestation in schistosomotic mothers maintained suppression of anti-OA immunity in cases of post-natal infection, with suppression of IHR, the presence of Tregs cells and IL-10. However, in these animals, there was notable lower production of IFN-γ compared to offspring born from non-schistosomotic mothers and subsequently infected (CONTROL-INFECTED). Was also compared anti-OA immunity in animals infected as adults, who had previously received breast milk with or without *S. mansoni* antigens. In both groups, infection in adult life caused an increase in the frequency of Tregs, in the presence of *in vitro* OA, along with IL-10. However, in the SIM-INFECTED group, there was enhanced suppression of anti-OA IHR and this was highly conducive to a micro-environment rich in basal Tregs cells, as well as Tregs cells under *in vitro* stimulation with SEA, with suppression of IFN-γ synthesis. Interestingly, in the animals born and suckled by schistosomotic mothers the intensity of suppression of anti-OA IHR and the frequency of basal Tregs cells reflected the effect of gestation and were lower than in those who received milk. However, the suppression of levels of IFN-γ was lower in relation to the animals only born from schistosomotic mothers.

In combination, these results show that contact with these immunological factors in the parasite, during interuterine life, heightens the reduction in levels of IFN-γ in post-natal infection, in adult offspring, which seems to be reduced during suckling. It is expected that the suppressive gestational micro-environment (Heikkinen et al. 2003; Blois et al. 2004; Jin et al. 2011), in addition to the suppressive action of the parasite antigens of *S. mansoni* on the dendritic cells (Thomas and Harn, 2004), leads to lower anti-OA response capacity in BIM animals. In fact, recently we reported a failure of expression of the CD86 costimulatory molecules in the DCs (Santos et al., *in press*) and this was associated with lower capacity to activate the T-cell-dependent response. In the present study, these offspring were exposed to the process of post-natal infection that may have increased this inefficiency of the T-cell effector response through the altered DCs.

It could be observed that infection in the animals that had previous contact with breast milk containing parasite antibodies and antigens intensified the suppressive background via Tregs, and that this was accompanied by reduced production of IFN-γ and even more powerful suppression of anti-OA IHR. Intriguingly, it was found that, in the SIM animals a higher frequency of B lymphocytes expressing CD80 and CD40, after being OA stimulation (Santos et al., *in press*). This characteristic was related to the increased production of anti-OA antibodies (Santos et al., 2010). However, an LB CD40+/CD80+, IL-2-dependent profile was required for the generation of regulatory CD25+CD4+ cells (Zheng et al., 2010). Regulatory B cells are generated during *S. mansoni* infection and are required for reduction in Th effector activity and for the generation of Tregs cells (Amu et al. 2010; Harris and Gause, 2011). In the present study, the possibility that the SIM offspring, as well as having contact at an early age with the milk from infected mothers, also being exposed to the process of post-natal infection, thereby encouraging more effective generation of Bregs lymphocytes, also needs to be investigated.

In the SIM-INFECTED group, the levels of IL-10 detected in response to Con-A were similar to those of the CONTROL-INFECTED and the production of this cytokine in response to OA was lower, compared to the CONTROL UNINFECTED group. It is important to note that, in the BSIM animals, the levels of IFN-γ in response to OA were partially restored in comparison to the levels in the CONTROL UNINFECTED group, although there was higher production of IL-10. These results corroborate those of studies that have demonstrated an immunosuppressive mechanism via Tregs acting independently of IL-10 (Taylor et al., 2006; Pacífico et al., 2009; Cardoso et al., 2010) and possibly through cell to cell contact (Collison et al., 2009).

It can be seen that, both in the offspring born from infected mothers and in those suckled by them, the shift in the Th2/IL-4 response, when infected, is less intense than in the CONTROL-INFECTED animals, with greater Th1/IFN-γ suppression. Thus, the shift in the anti-OA Th2 response as a result of post-natal infection and the Th1/IFN-γ response are compromised. These

findings suggest a broad type of suppression, related to the infection process in the offspring studied here.

With regard to sensitization with SEA, in the BIM and SIM animals there were suppression of anti-OA IHR immunity along with the generation of Tregs cells, IL-10 in response to OA and IL-4, previously not observed in the offspring of non-schistosomotic mothers that also received SEA. However, *in utero* contact with the immunological and parasitic components led to high production of IL-10, in response to OA, in relation to contact with milk from infected mothers (SIM and BSIM). Despite this, the suppression of IFN-γ production was similar and less evident in these offspring compared to the CONTROL-INFECTED group, thereby corroborating the possible action of Tregs, without compromising IL-10 with the suppression of the anti-OA response (Taylor et al., 2006).

In relation to the production of antibodies, no alterations were observed in levels of OA-specific IgG1 and IgG2a, showing that there was no damage to the humoral immunity in the animals that were infected or sensitized with SEA. The same occurred in the case of the animals born or suckled by schistosomotic mothers. These results were not expected. Knowing that there was a reduction in the production of anti-OA antibodies in the BIM animals (Santos et al., 2010), contact with infection/SEA in adult life abolished this anti-OA suppressive capacity, rather than accentuate, acquired during gestation in infected mothers. In relation to the animals previously suckled by schistosomotic mothers, the results found here show that, although post-natal contact with parasite antigens predisposes them to suppression of anti-OA immunity, this was not observed for humoral immunity either. The immunomodulation by infection/SEA in the humoral immune response is contradictory (Kullberg et al., 1992; Curry et al., 1995; Montesano et al., 1999; Smits et al., 2007; Cardoso et al., 2010) and merits further investigation of the offspring studied here.

In conclusion, contact with parasite antigens in offspring of schistosomotic mothers favored negative heterologous immunomodulation, which acted more powerfully against infection (Th1/Th2 suppression) and in those who had had previous contact with milk from these mothers. However,

this phenomenon cannot be confirmed by measurement of antibodies, re-emphasizing the importance of prior contact, either *in utero* and/or during suckling, with parasite antigens, for an adequate humoral immune response in individuals who live in endemic areas and are thus prone to infection as adults. Experimental and clinical studies are required to investigate the potential benefits or not of maternal schistosomiasis in the prevention of allergies, auto-immune disease and heterologous infection in offspring living in endemic areas.

Acknowledgements

We thank Maria da Conceição Batista for competent technical assistance. The authors also thank the Program for Technological Development in Tools for Health - PDTIS/FIOCRUZ for the use of its facilities. This work was conducted in compliance with Brazilian laws.

References

Actor JK, Shirai M, Kullberg MC, Buller RM, Sher A, Berzofsky JA. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:948-952. [PubMed: 8094248]

Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101:79-85. [PubMed: 17308751]

Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. J Allergy Clin Immunol 2010; 125:1114-1124. [PubMed: 20304473]

Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-Emshaty HM, Elsheikha HM. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. Parasitol Res 2006; 99:137-145. [PubMed: 16521039]

Blois SM, Soto CDA, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. Biol Reprod 2004; 70:1018-1023. [PubMed: 14681197]

Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, Gazzinelli G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Trop 2008; 108:109-117. [PubMed: 18577364]

Cardoso LS, Olivera SC, Góes AM, Oliveira RR, Pacífico LG, Marinho FV, Fonseca CT, Cardoso FC, Carvalho EM, AraújoMI. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. Clin Exp Immunol 2010; 160:266-274. [PubMed: 20132231]

Cardoso LS, Oliveira SC, Araujo MI. *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2012; 12:24-32. [PubMed: 22214332]

Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DAA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. J Immunol 2009; 182:6121-6128. [PubMed: 19414764]

Curry AJ, Else KL, Jones F, Bancroft A, Grencis RK, Dunne DW. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. J Exp Med 1995; 181:769-774. [PubMed: 7836929]

Finkelman FD, Pearce EJ, Urban Jr JF, Sher A. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. Immunol Today 1991; 12:A62-66. [PubMed: 1829892]

Fowler RE, Edwards RG. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. J Endocrinol 1957; 15:374-384. [PubMed: 13475597]

Friedman JF, Mital P, Kanzaria HK, Olds GR, Kurtis JD. Schistosomiasis and pregnancy. Trends Parasitol 2007; 23:159-164. [PubMed: 17336160]

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet 2006; 368: 1106-1118. [PubMed: 16997665]

Harris N, Gause WC. B cell function in the immune response to helminths. Trends Immunol 2011; 32:80-88. [PubMed: 3076625]

Heikkinen J, Möttönen M, Komi J, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. Clin Exp Immunol 2003; 131:498-505. [PubMed: 12605704]

Hillier SD, Booth M, Muhangi L, Nkurunzuza P, Khihembo M, Kakande M, Sewankambo M, Kizindo R, Kizza M, Muwanga M, Elliot AM. *Plasmodium falciparum* and helminth co-infection in a semi-urban population of pregnant women in Uganda. J Infect Dis 2008; 198:920-927. [PubMed: 18721060]

Jin LP, Fan DX, Li DJ. Regulation of costimulatory signal in maternal-fetal immune tolerance. Am J Reprod Immunol 2011; 66:76-83. [PubMed: 21276120]

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1972; 14:397-400. [PubMed: 4675644]

Kullberg MC, Pearce EJ, Hieny SE, Sher A, Berzofsky JA. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. J Immunol 1992; 148:3264-3270. [PubMed: 1533656]

LaBeaud AD, Malhotra I, King MJ, King CL, Hing CH. Do antenatal parasite infections devalue childhood vaccination? PLoS Negl Trop Dis 2009; 3:e442. [PubMed: 19478847]

La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Infect Immun 2003; 71:4996-5004. [PubMed: 12933842]

Lenzi JA, Sobral AC, Araripe JR, Grimaldi Filho G, Lenzi HL. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82:257-267. [PubMed: 3151101]

Lustigman S, Prichard RK, Gazzinelli A, Grant WN, Boatin BA, McCarthy JS, Basáñez MG. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiases. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6:e1582. [PubMed: 22545164]

Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kazura JW, King CL. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. J Immunol 1999; 162:6843-6848. [PubMed: 10352306]

McKee AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. J Immunol 2004; 173:1224-1231. [PubMed: 15240714]

Medeiros MJr, Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araújo MI, Cruz AA, Atta AM, Rego MA, de Jesus AR, Taketomi EA, Carvalho EM. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. J Allergy Clin Immunol 2003; 111:947-951. [PubMed: 12743556]

Montesano MA, Colley DG, Freeman GL, Secor WE. Neonatal exposure to idiotype induces *Schistosoma mansoni* egg antigen-specific cellular and humoral immune responses. J Immunol 1999; 163:898-905. [PubMed: 10395685]

Moore KW, de Wall Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001; 19:683-765. [PubMed: 11244051]

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. [PubMed: 9707682]

Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. Int J Parasitol 2009; 39:457-464. [PubMed: 18835272]

Othman AA, Shoheib ZS, Saied EM, Soliman RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. Immunobiology 2010; 215:101-112. [PubMed: 19457572]

Pacífico LG, Marinho FA, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales-Junior PA, Cardoso LS, Araújo MI, Carvalho EM, Cassali GD, Teixeira MM, Oliveira SC. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+CD25+FoxP3+ T cells independente of interleukin-10. Infect Immun 2009; 77:98-107. [PubMed: 18824533]

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med 1991; 173:159-166. [PubMed: 1824635]

Ruyssers NE, De Winter BY, De Man JG, Ruysser ND, Van Gils AJ, Loukas A, Pearson MS, Weinstock JV, Pelckmans PA, Moreels, TG. *Schistosoma mansoni* proteins attenuate gastrointestinal motility disturbances during experimental colitis in mice. World J Gastroenterol 2010; 16:703-712. [PubMed: 20135718]

Sabin EA, Araujo MI, Carvalho EM, Pearce EJ. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis 1996; 173:269-272. [PubMed: 8537675]

Santos PEA, Sales IR, Schirato GV, Costa VM, Albuquerque MC, Souza VM, Malagueño E. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. Parasitol Res 2010; 107:95-102. [PubMed: 20372927]

Santos PEA, Lorena VMB, Fernandes ES, Sales IR, Gomes YM, Albuquerque MC, Costa VM, Souza VM. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013 (in press).

Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. Int Immunol 2003; 15:59-69. [PubMed: 12502726]

Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, Soullie T, Willart MA, Lievers E, Kadouch J, Kool M, Kos-van Oosterhoud J, Deelder AM, Lambrecht BN, Yazdanbakhsh M. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. J Allergy Clin Immunol 2007; 120:932-940. [PubMed: 17689595]

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. Braz J Med Biol Res 2002; 35:81-89. [PubMed: 11743619]

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. J Immunol 2006; 176:5839-5847. [PubMed: 16670290]

Thomas PG, Harn DA Jr. Immune biasing by helminth glycans. Cell Microbiol 2004; 6:13-22. [PubMed: 14678327]

Zheng J, Liu Y, Lau YL, TU W. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4 regulatory T cells. Cell Mol Immunol 2010; 7:44-50. [PubMed: 20081875]

Legends to Figures

Figure 1 - Hypersensitivity reactions to OA. *Swiss webster* mice born (BIM), suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) from *S. mansoni* infected mothers that were infected with 80 *S. mansoni* cercariae (A) or administered i.p. with 200μg/animal of SEA (B), immunized s.c. with OA (100μg/animal) in CFA, 60 days post-infection or 48 hours after SEA administration, and challenged with aggregated OA in the footpad 8 days after immunization (600μg/animal). Born and suckled mice from uninfected mothers (CONTROL), infected or uninfected (A) or with or without SEA (B) were immunized with OA were equally challenged. The results represent the median of the net increase in footpad thickness of five mice/group±standard error. •$\rho<0,05$ compared with the CONTROL group, #$\rho<0,05$ compared with the CONTROL UNINFECTED (A) or CONTROL NON-SEA (B) groups.

Figure 2 - OA-specific IgG1 and IgG2a antibodies. *Swiss webster* mice born (BIM), suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) from *S. mansoni* infected mothers, infected with 80 *S. mansoni* cercariae (A and C) or administered i.p. with 200μg/animal of SEA (B and D), and born and suckled mice from uninfected mothers (CONTROL), infected or uninfected (A and C) or with or without SEA (B and D) were immunized with OA (100μg/animal) in CFA. Isotype levels in the plasma were measured by ELISA in dilutions 1:2.048 (IgG1) and 1:16 (IgG2a) 9 days after immunization. The results represent the median of absorbance (O.D.)±standard error for five animals/group.

Figure 3 - IL-4 secreted by spleen cells. *Swiss webster* mice born (BIM), suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) from *S. mansoni* infected mothers, infected with 80 *S. mansoni* cercariae (A) or administered i.p. with 200μg/animal of SEA (B), and born and suckled mice from uninfected

mothers (CONTROL), infected or uninfected (A) or with or without SEA (B) were immunized with OA (100μg/animal) in CFA nine days before. A total of 10^7 cells were stimulated with OA (500 μg/ml) or Con-A (5 μg/ml) for 24 h. Cytokines were quantified in supernatants harvested after 24 h by sandwich ELISA. The results represent the mean±standard deviation for five animals/group. Non-stimulated cells produced <0.44 ng/ml of IL-4. •ρ<0,05 compared with the CONTROL group, #ρ<0,05 compared with the CONTROL UNINFECTED (A) or CONTROL NON-SEA (B) groups.

Figure 4 - IL-10 secreted by spleen cells. *Swiss webster* mice born (BIM), suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) from *S. mansoni* infected mothers, infected with 80 *S. mansoni* cercariae (A) or administered i.p. with 200μg/animal of SEA (B), and born and suckled mice from uninfected mothers (CONTROL), infected or uninfected (A) or with or without SEA (B) were immunized with OA (100μg/animal) in CFA nine days before. A total of 6 x 10^6 cells were stimulated with OA (500 μg/ml) or Con-A (5 μg/ml) for 72 h. Cytokines were quantified in supernatants harvested after 72 h by sandwich ELISA. The results represent the mean±standard deviation for five animals/group. Non-stimulated cells produced <0.625 ng/ml of IL-10. •ρ<0,05 compared with the CONTROL group, #ρ<0,05 compared with the CONTROL UNINFECTED (A) or CONTROL NON-SEA (B) groups.

Figure 5 - IFN-γ secreted by spleen cells. *Swiss webster* mice born (BIM), suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) from *S. mansoni* infected mothers, infected with 80 *S. mansoni* cercariae (A) or administered i.p. with 200μg/animal of SEA (B), and born and suckled mice from uninfected mothers (CONTROL), infected or uninfected (A) or with or without SEA (B) were immunized with OA (100μg/animal) in CFA nine days before. A total of 6 x 10^6 cells were stimulated with OA (500 μg/ml) or Con-A (5 μg/ml) for 72 h. Cytokines were quantified in supernatants harvested after 72 h by sandwich ELISA. The results represent the mean±standard deviation for five animals/group. Non-stimulated cells produced <2.5 ng/ml of IFN-γ. •ρ<0,05 compared with the CONTROL group, #ρ<0,05 compared with the CONTROL UNINFECTED (A) or CONTROL NON-SEA (B) groups.

Figure 6 - Splenic cells expressing CD4+ FoxP3+. *Swiss webster* mice born (BIM), suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) from *S. mansoni* infected mothers, infected with 80 *S. mansoni* cercariae (A) or administered i.p. with 200μg/animal of SEA (B), and born and suckled mice from uninfected mothers (CONTROL), infected or uninfected (A) or with or without SEA (B) were immunized with OA (100μg/animal) in CFA. Nine days after immunization, their spleen cells were unstimulated or stimulated with OA (500 μg/ml), SEA (20 μg/ml) or Con-A (5 μg/ml) for 72 hours, labeled and analyzed by Flow Cytometry. The results represent the mean of the frequency of spleen cells double-labeled±standard deviation for five animals/group. •ρ<0,05 compared with the CONTROL group, #ρ<0,05 compared with the CONTROL UNINFECTED (A) or CONTROL NON-SEA (B) groups.

Figure 1

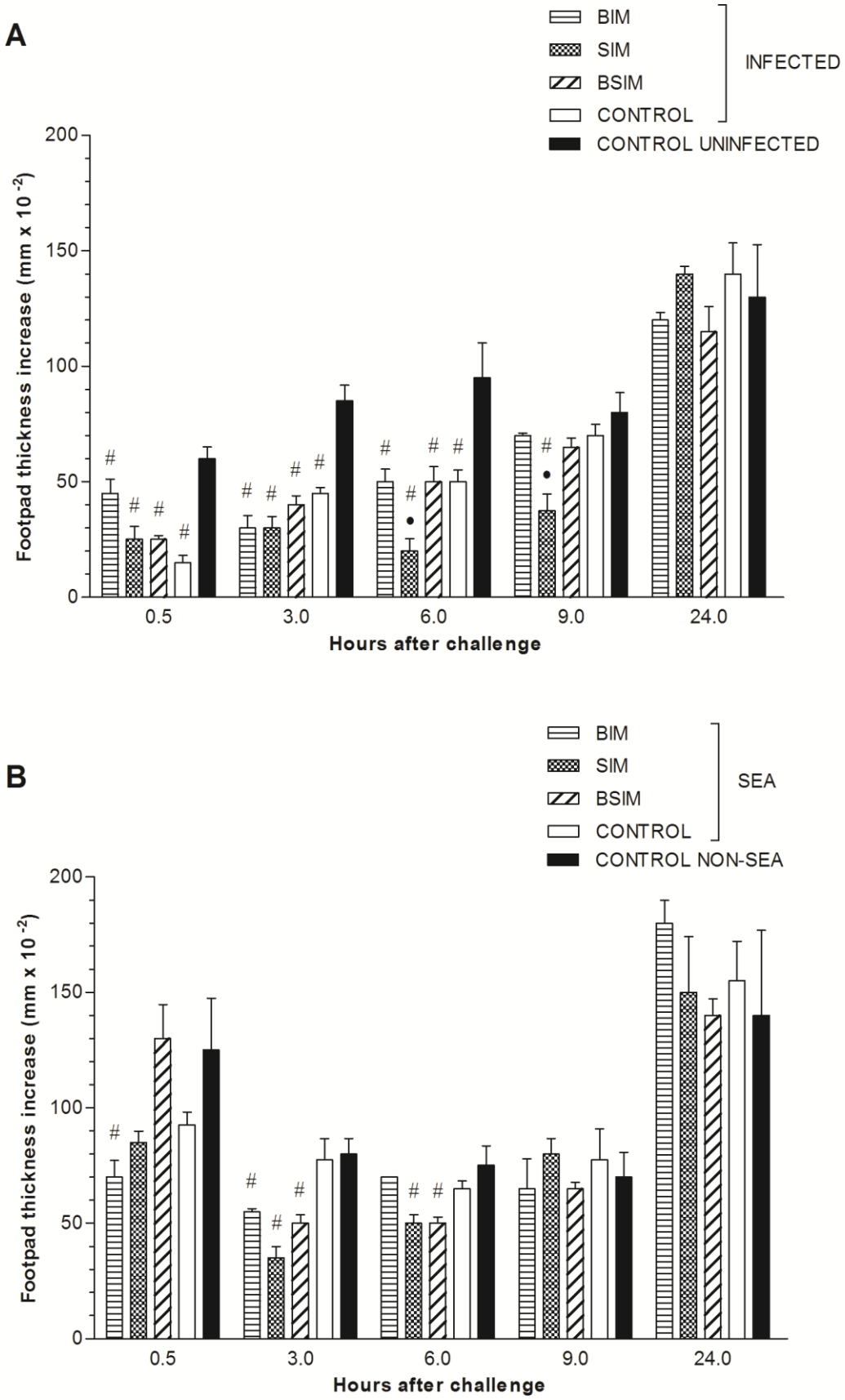

A
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
INFECTED
CONTROL UNINFECTED
Footpad thickness increase (mm x 10 -2)
200
150
100
50
0
0.5
3.0
6.0
9.0
24.0
Hours after challenge
B
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
SEA
CONTROL NON-SEA
Footpad thickness increase (mm x 10 -2)
200
150
100
50
0
0.5
3.0
6.0
9.0
24.0
Hours after challenge

Figure 2

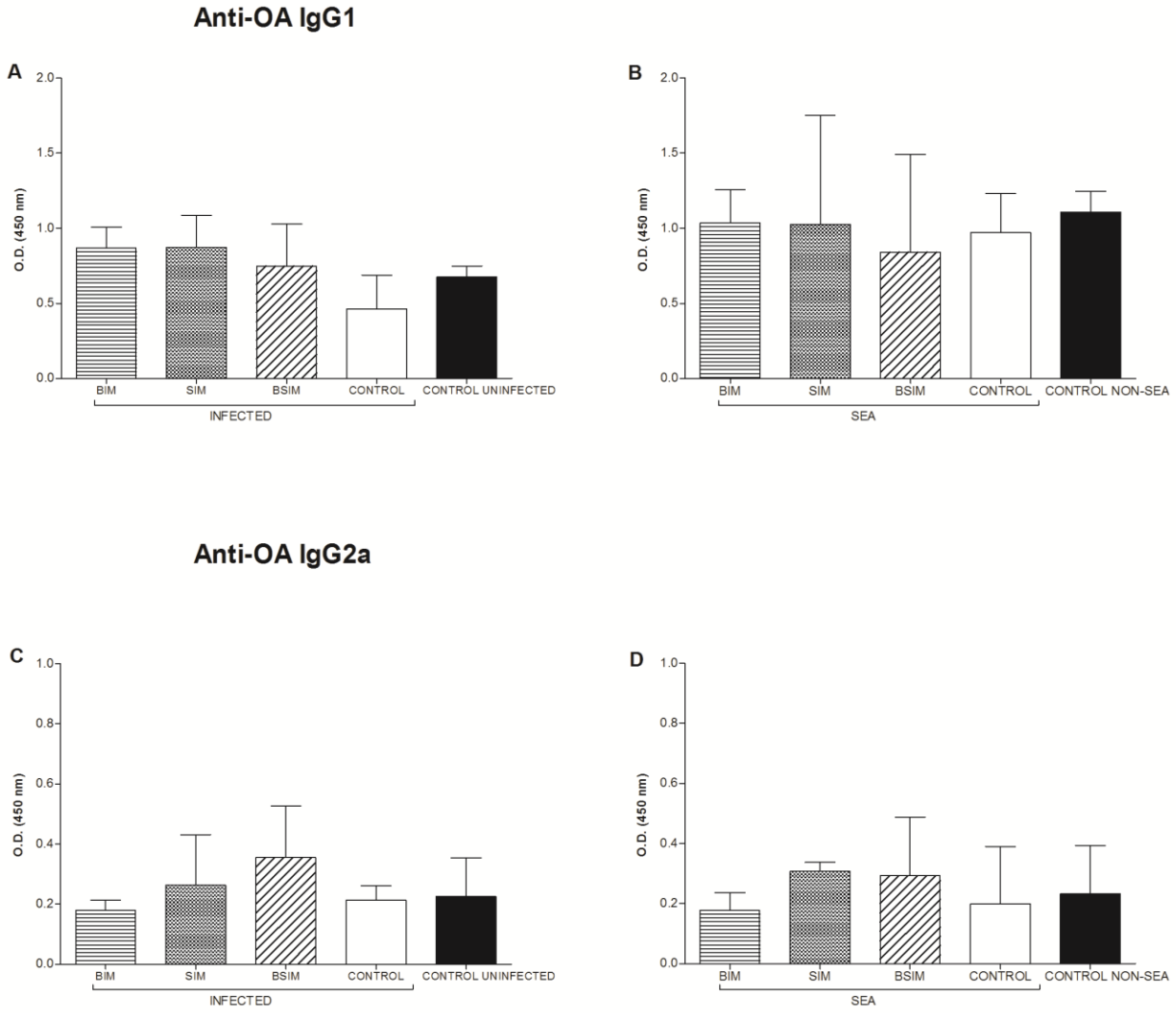

Anti-OA IgG1
A
B
O.D. (450 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL UNINFECTED
CONTROL NON-SEA
INFECTED
SEA
Anti-OA IgG2a
C
D
0.8
0.6
0.4
0.2

Figure 3

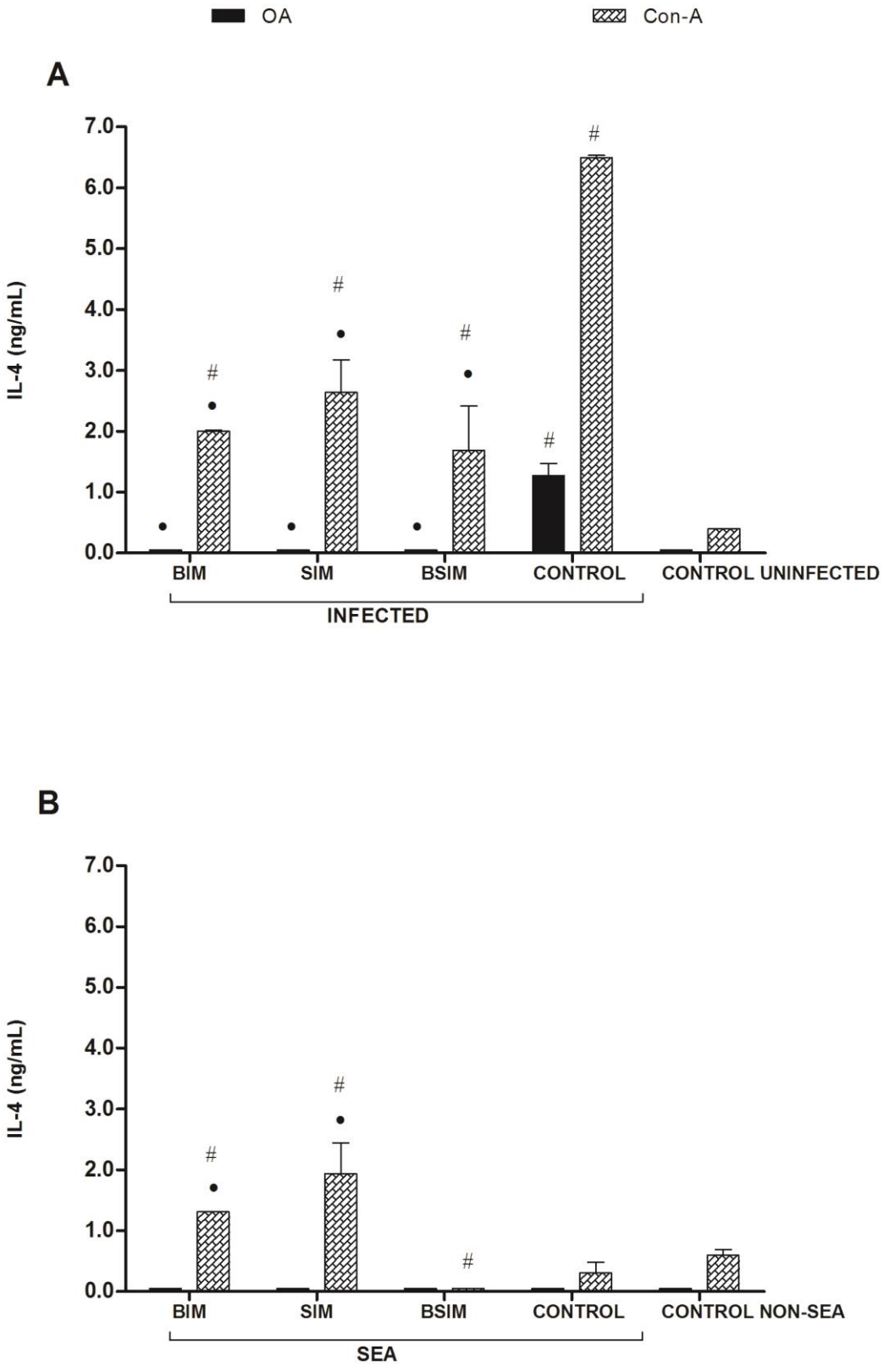

OA
Con-A
A
IL-4 (ng/mL)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
#
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL UNINFECTED
INFECTED
B
IL-4 (ng/mL)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
#
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL NON-SEA
SEA

Figure 4

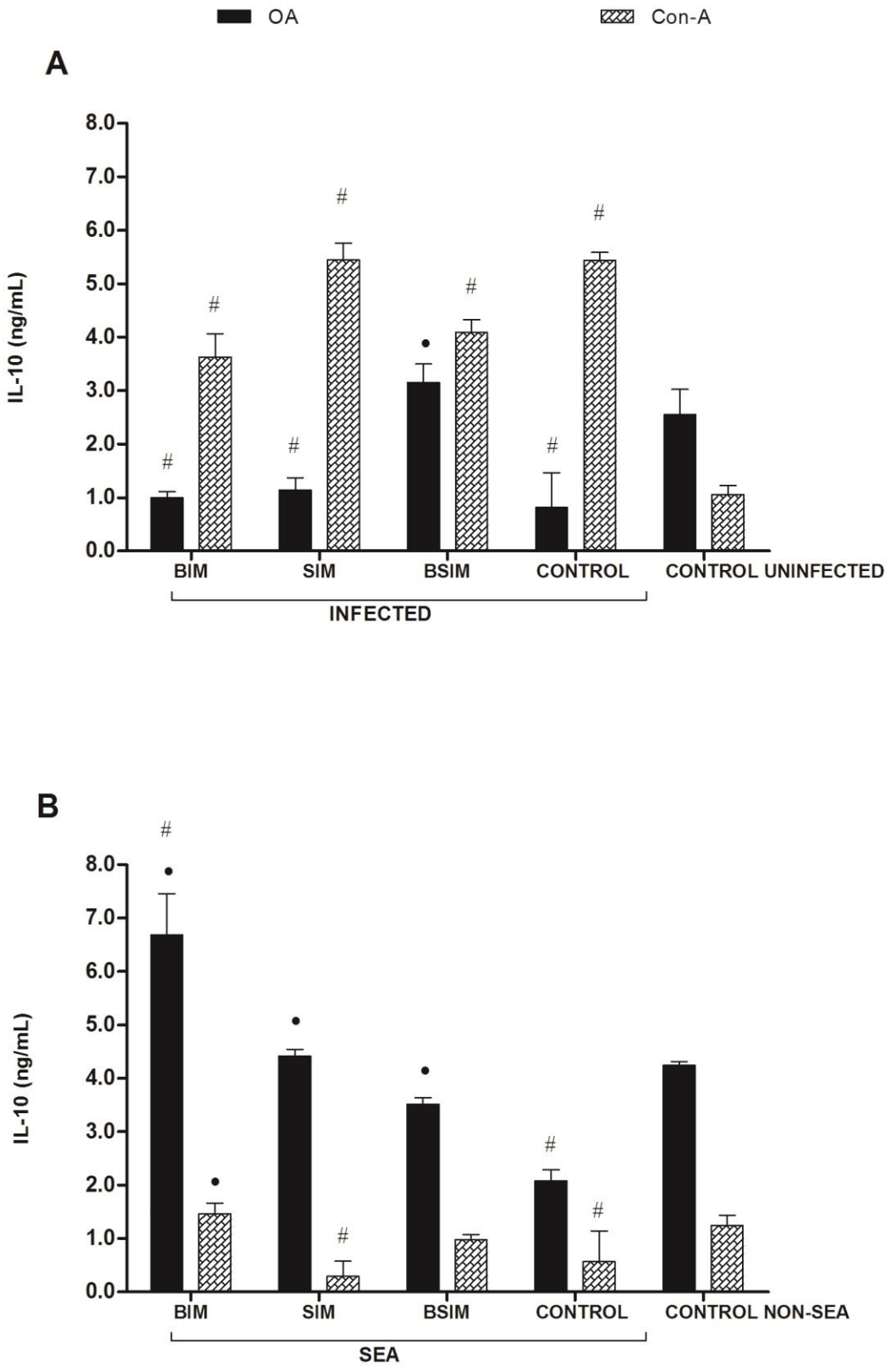

OA
Con-A
A
IL-10 (ng/mL)
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL UNINFECTED
INFECTED
B
IL-10 (ng/mL)
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL NON-SEA
SEA

Figure 5

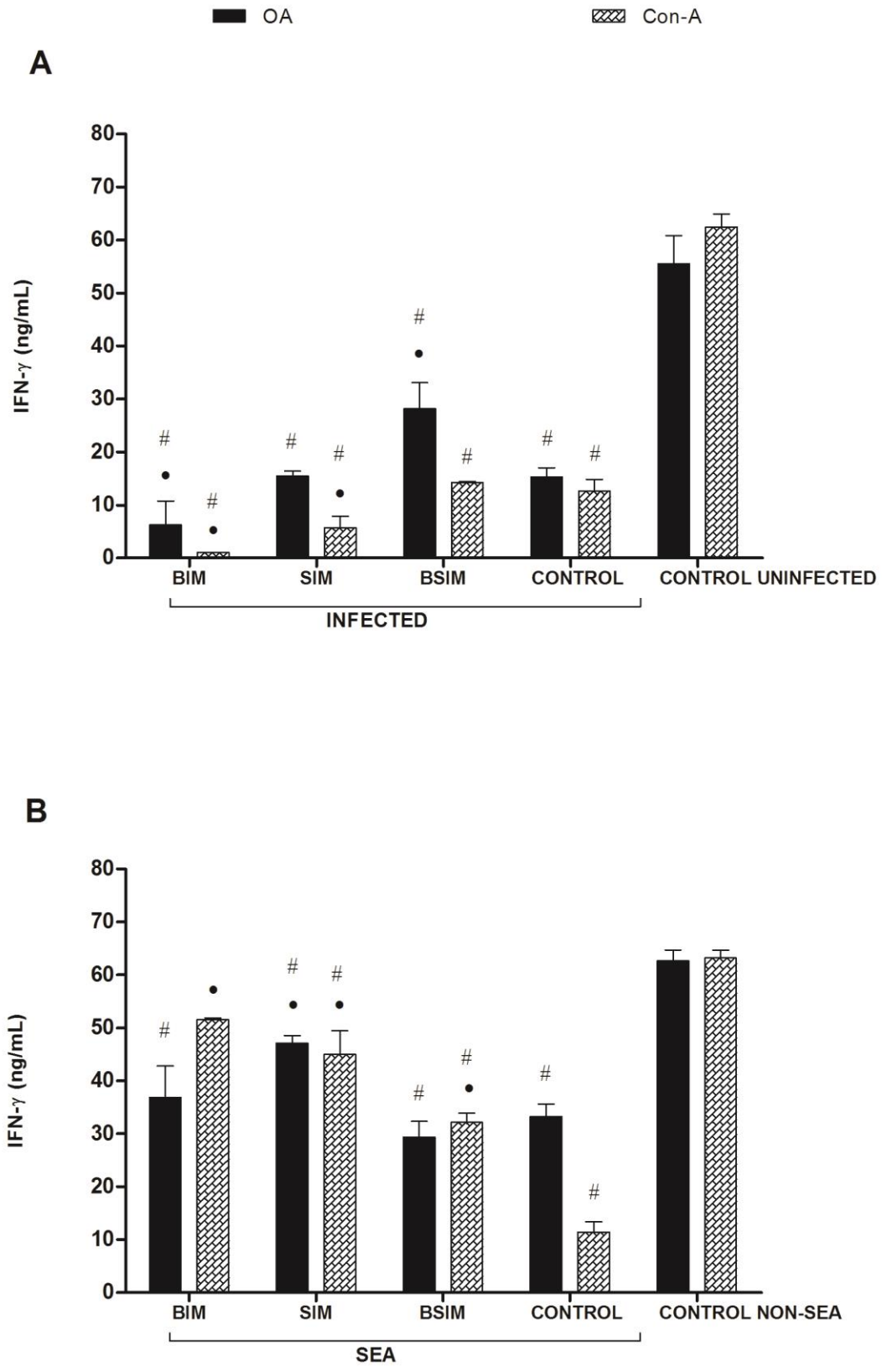
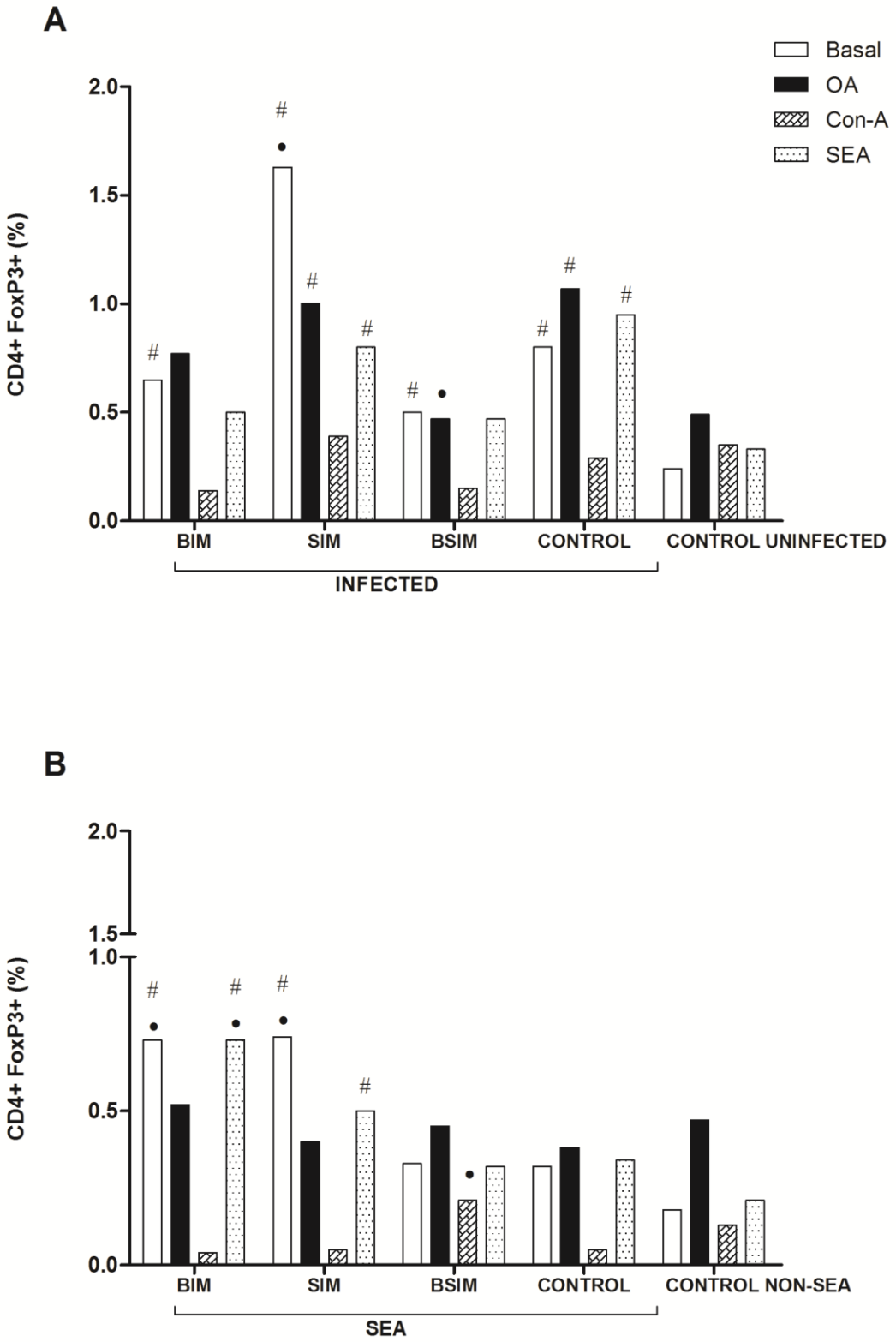

OA
Con-A
A
IFN-γ (ng/mL)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL UNINFECTED
INFECTED
B
IFN-γ (ng/mL)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL NON-SEA
SEA

Figure 6


A
Basal
OA
Con-A
SEA
CD4+ FoxP3+ (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL UNINFECTED
INFECTED
B
CD4+ FoxP3+ (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BIM
SIM
BSIM
CONTROL
CONTROL NON-SEA
SEA

APÊNDICE C - Marcação de células F4/80+ (macrófagos) e moléculas CD86, CD80 e CD40 em descendentes adultos de mães esquistossomóticas

A análise das células F4/80+ (macrófagos) e moléculas CD86, CD80 e CD40, foi realizada em animais não-imunizados e no 8º dia após imunização com OVA. Nos animais do grupo AI (amamentados em mães-infectadas) não houve alteração na expressão destas moléculas (Fig. 1), um perfil semelhante ao encontrado nas DCs e nos linfócitos B (8º dia após imunização). Com relação, aos animais nascidos de mães infectadas (MI), os macrófagos apresentaram similar expressão de CD40 (Fig. 1C) (semelhante às células CD11c+), acompanhada da diminuição de CD86 e CD80 (Fig. 1A e 1B) (semelhante às células B220+).

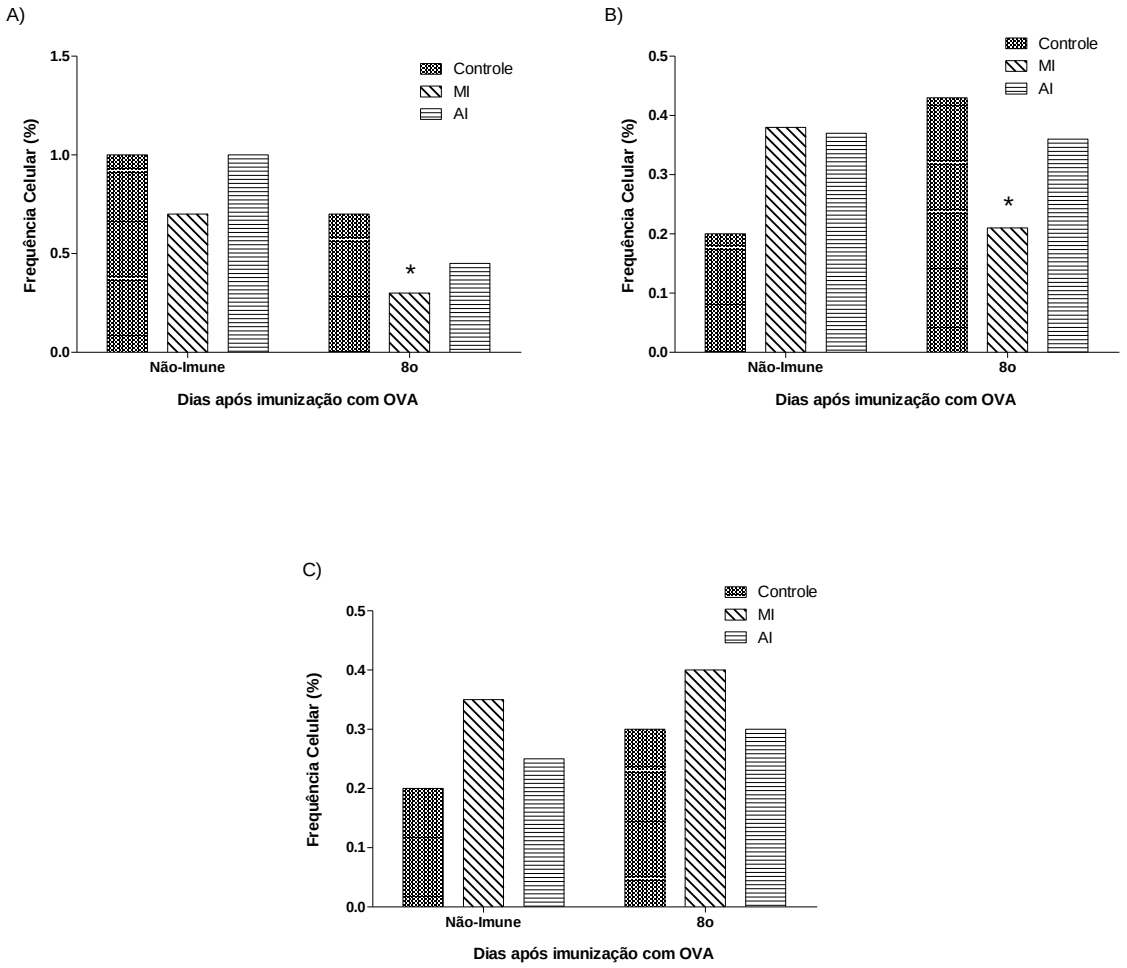
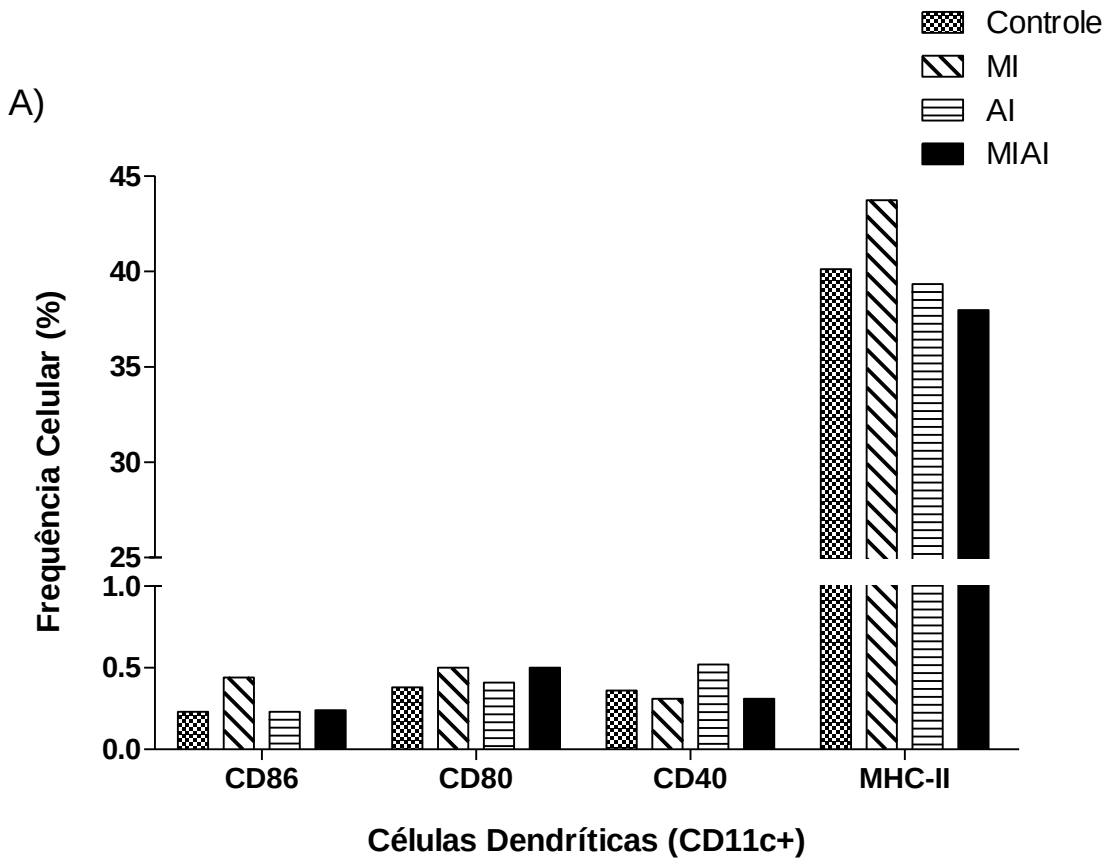
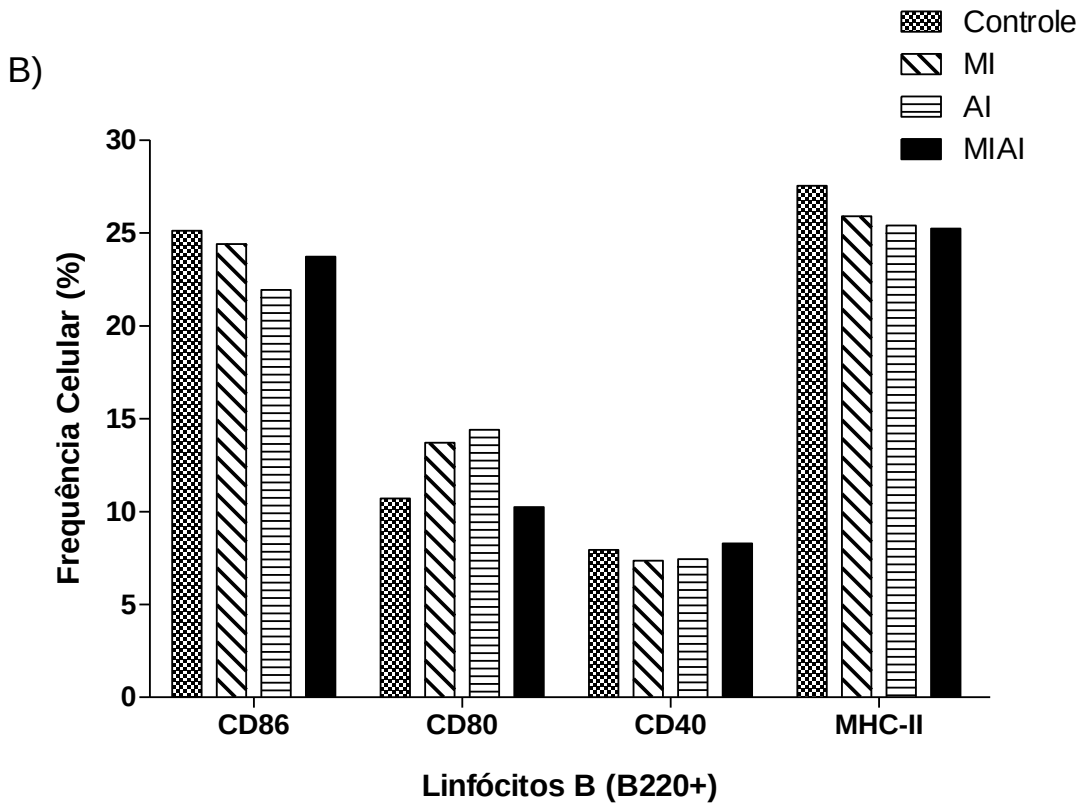


Figura 1. Frequência de células esplênicas F4/80+ expressando CD86 (A), CD80 (B) e CD40 (C) em descendentes adultos nascidos (MI) ou amamentados (AI) em mães infectadas pelo *S. mansoni* e em descendentes adultos de mães não-infectadas (Controle) não-imunizados ou imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em adjuvante 8 dias antes.

APÊNDICE D - Marcadores de atividade celular nas APCs logo após desmame

Células esplênicas de 5 filhotes machos dos grupos MI, AI, MIAI e Controle foram analisadas logo após o desmame (21 dias) por citometria de fluxo. A figura 2 mostra a frequência das células dendríticas CD11c+ (Fig. 2A), dos linfócitos B B220+ (Fig. 2B) e dos macrófagos F4/80+ (Fig. 2C) marcados também para as diferentes moléculas co-estimulatórias. Desta forma, observamos que o percentual de APCs expressando as diferentes moléculas co-estimulatórias (CD86, CD80 e CD40), assim como as de MHC-II, foram semelhantes entre os grupos de estudo avaliados.





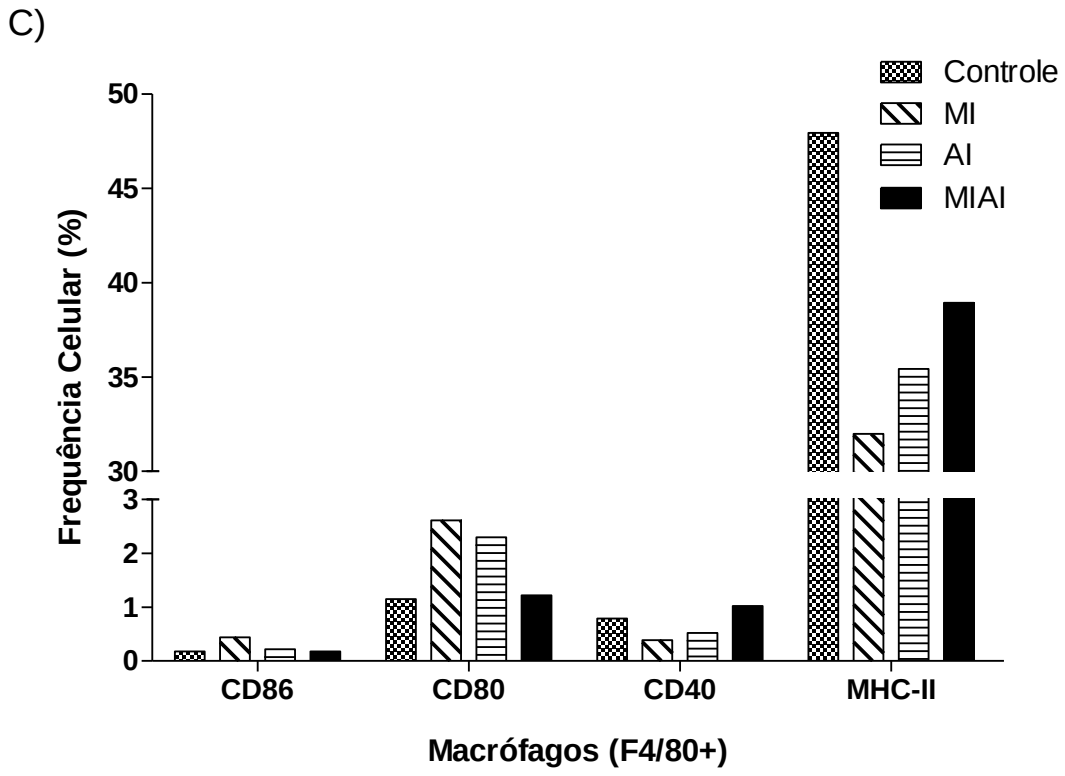


Figura 2. Frequências de células esplênicas CD11c+ (A), B220+ (B) e F4/80+ (C) expressando CD86, CD80, CD40 e MHC-II em descendentes nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni* e em descendentes de mães não-infectadas (Controle) analisadas logo após o desmame (21 dias) sem imunização.

APÊNDICE E - Relação Tregs:CD4+ nos grupos infectados ou administrados com SEA

A figura 3 mostra a relação entre a frequência de células Tregs e células T CD4+, avaliadas por citometria de fluxo em células esplênicas cultivadas com e sem estímulos de OVA, Con-A ou SEA (72 horas), nos animais dos grupos MI, AI, MIAI e CONTROLE infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (Fig. 3A) ou administrados com SEA (Fig. 3B).

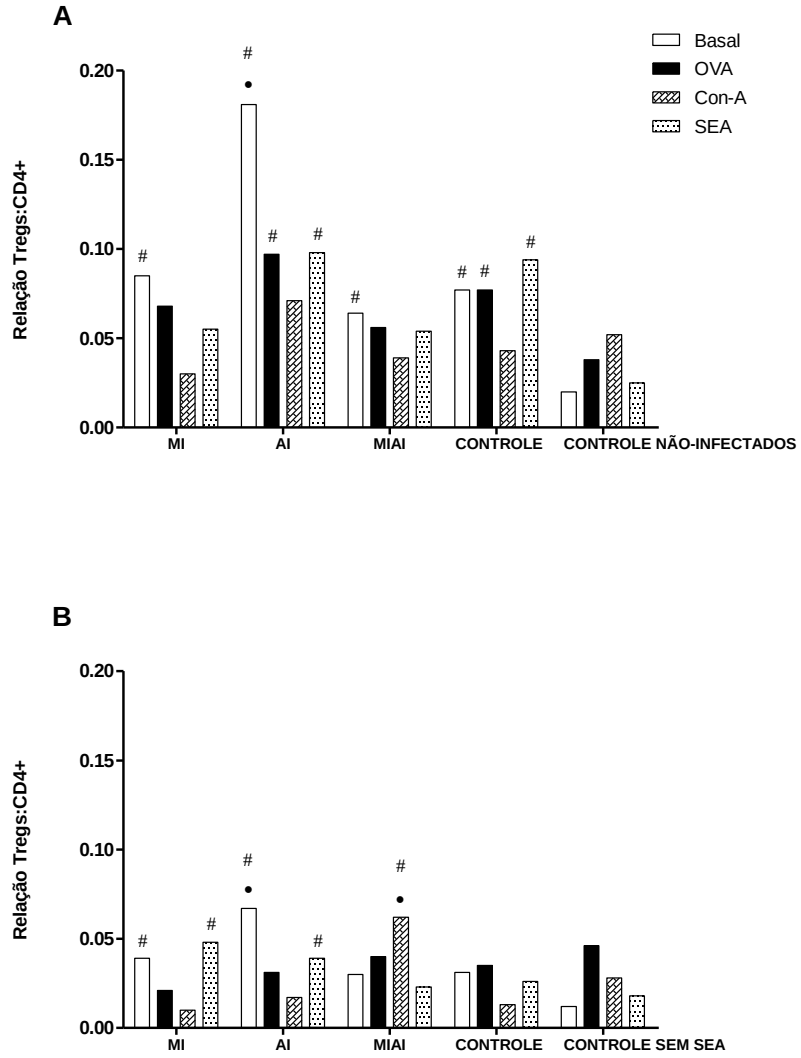
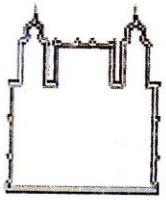


Figura 3. Relação entre a frequência de células Tregs (FoxP3+) e células T CD4+ em camundongos *Swiss webster* nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas pelo *S. mansoni*, infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (A) ou administrados i.p. com 200μg/animal de SEA (B), e camundongos nascidos/amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE), infectados e não-infectados (A) ou administrados com SEA e sem SEA (B), imunizados s.c. com OVA (100μg/animal) em CFA. Os resultados representam a relação entre a média das frequências celulares no "pool" dos baços de 5 animais/grupo ± desvio padrão. •$\rho<0,05$ comparado ao grupo CONTROLE, #$\rho<0,05$ comparado ao grupo CONTROLE NÃO-INFECTADOS (A) ou CONTROLE SEM SEA (B).

ANEXOS

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



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado :

" Caracterização do perfil de resposta imune de camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo Schistosoma mansoni. "

número P-470/08, proposto por Giuliana Viegas Schirato, foi licenciado pelo Nº L-0063/08.

Sua licença de Nº L-0063/08 autoriza o uso anual de :

- 456 Mus musculus

Esse protocolo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ). Na presente formatação, este projeto está licenciado e tem validade até 8 de setembro de 2012.

Rio de Janeiro, 25/09/2008

Dra. Norma Vollmer Labarthe
Coordenadora da CEUA
FIOCRUZ

ANEXO B - Santos et al., 2010 (Parasitol. Res., v. 107, n. 1, p. 95-102).

Parasitol Res (2010) 107:95–102
DOI 10.1007/s00436-010-1839-5

ORIGINAL PAPER

Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice

Patrícia d'Emery Alves Santos · Iana Rafaela Fernandes Sales · Giuliana Viegas Schirato · Vlaudia Maria Assis Costa · Mônica Camelo P. A. Albuquerque · Valdênia Maria Oliveira Souza · Elizabeth Malagueño

Received: 4 May 2009 / Accepted: 7 March 2010 / Published online: 7 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract *Schistosoma mansoni* infection modulates the immunity to unrelated antigens in the host. In this study, we have investigated the effect of pregnancy and nursing from schistosomotic mother mice on the immune response to ovalbumin (OA), in adult offspring. Then, newborn mice were divided into four groups: animals born from infected mothers (BIM) suckled by non-infected mothers; animals from non-infected mothers suckled by infected mothers (SIM); and two other groups that were mice born and suckled in infected mothers (BSIM) or non-infected (control) mothers. The adult offspring were immunized with OA plus adjuvant. We compared the OA-specific hypersensitivity reactions (HR), antibodies levels (IgG, IgG2a) and the cytokine production in splenocyte cultures. Remarkable interleukin (IL)-10 synthesis was observed in mice BIM; while the anti-OA antibodies levels and immediate HR were impaired. IL-10 neutralization recovered this suppression. Differently, in mice SIM and BSIM there was an enhancement in the anti-OA humoral response and high IL-2 production, however low level of the IL-10 was detected in mice BSIM. In conclusion, schistosomotic pregnancy provides an immunosuppressive potential, IL-10 dependent, which was sustained throughout adult life. Regardless, suckling by infected mothers induces great responsiveness to an unrelated antigen and repairs the inhibitory potential acquired during prenatal stage.

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and P.E.A. Santos was in receipt of a Master's Fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

P. d. A. Santos · I. R. F. Sales · V. M. A. Costa · M. C. P. A. Albuquerque · E. Malagueño
Laboratory of Immunology,
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA),
Federal University of Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brazil

G. V. Schirato · V. M. O. Souza (✉)
Laboratory of Immunology,
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA),
Federal University of Pernambuco,
Recife, Pernambuco, Brazil
e-mail: valdenia.souza@ufpe.br

Introduction

Schistosoma trematode has infected more than 200 million people in tropical countries, of which 40 million are women of childbearing age (Friedman et al. 2007). In Brazil, *Schistosoma mansoni* is the only species found with alarming rates of infection in the Southeast and Northeast of the country. Infected pregnant women are commonly observed in the endemic areas (Barbosa et al. 2006). Schistosomiasis is marked by a delayed-hypersensitivity reaction with consequent granulomatous inflammation and fibroses around of parasites' eggs in the liver and intestine (Wynn et al. 2004).

Several studies have demonstrated that the immune response to parasites or allergens in pregnant women can skew the fetal or early neonatal immunity (Herz et al. 2000; Brustoski et al. 2005; Leme et al. 2006). Exposure to *S. mansoni* prenatally and during breastfeeding modulates the immunity against the homologous antigen in postnatal infection, which leads to a reduction in the size and quantity of egg granuloma in the offspring's liver (Hang et al. 1974; Lenzi et al. 1987; Attallah et al. 2006). These findings were associated with a fetal/neonatal sensibilization through the transference of circulating schistosomal antigens and maternal parasite-specific antibodies by way of the placenta and breast milk (Lenzi et al. 1987; Attallah et al. 2003).

Interestingly, an immunomodulator phenomenon in response to soluble egg antigen (SEA) is required for the protective granuloma formation without destructive pathology (Wilson et al. 2007). SEA elicits a dominant Th2 response (interleukin (IL)-4, IL-13, IL-10, eosinophilic infiltrated and fibroses) that downregulates the initial Th1 response (IFN-γ, TNF-α, macrophage activation and nitric oxide) to larval and egg antigens (Pearce et al. 1991). Recently, it was demonstrated that the Th2 effector response is controlled by egg-specific regulatory T cell that lessens the fibrotic reaction (Taylor et al. 2006). In experimental or humans studies, it has been observed that the immunosuppressive mechanism elicited by the schistosomotic infection could be extended to a non-parasite antigen. For example, in concomitant *S. mansoni* infection or egg immunization the efficient Th1 responses to viral or bacterial infections/vaccinations could not be properly achieved (Actor et al. 1994; Sabin et al. 1996) as well as an autoimmune inflammatory response (La Flamme et al. 2003). In the same way, in allergic and *S. mansoni*-infected individuals or mice the Th2-dependent inflammatory reaction to allergens was diminished (Medeiros et al. 2003; Smits et al. 2007).

As described above, the hyporesponsiveness to homologous schistosomal antigen in the offspring has been attributed to previous antigen contact and immunity factors acquired from the infected mothers, as there are anti-*S. mansoni* antibodies and a regulatory environment in pregnancy (Lenzi et al. 1987; Attallah et al. 2006). However, the effects of *S. mansoni* maternal infection on the immune responses to a heterologous antigen in the adult offspring are poorly defined. Malhotra et al. (1999) related the diminution of vaccination efficacy to BCG (Bacilo Calmette-Guérin) in children from *Schistosoma haematobium*-infected mothers. Noureldin and Shaltout (1998) demonstrated a positive correlation between maternal anti-*S. mansoni* IgE levels and gastrointestinal allergic manifestations in infants that are breastfed by infected mothers.

In the present investigations, we performed experiments aimed to understand the effect of maternal schistosomiasis on the immune responses to a heterologous antigen, ovalbumin (OA), in adult offspring. With this in mind, we studied the pregnancy effects in *S. mansoni*-infected mothers separately or together with suckling, since there was an interchange of mothers: litters from *S. mansoni*-infected mothers were suckled by non-infected mothers and those from non-infected mothers were suckled by infected mothers. As adults, both mice born from infected mothers and mice only suckled by them were immunized with OA plus adjuvant. Humoral and cell-mediated responses to OA were analyzed. Our results showed that offspring from schistosomotic mothers acquired an anti-OA immunosuppressive potential, IL-10 dependent, during the prenatal stage that could be repaired by suckling from infected mothers.

Materials and methods

Animals and *S. mansoni* infection

Swiss Webster four-week-old female mice were infected subcutaneously (s.c.) with 20 *S. mansoni* cercariae, São Lourenço da Mata strain. On the 45th day the infection was confirmed by Kato-Katz method (Katz et al. 1972). On the 60th day post-infection, estruses were synchronized by administration of 5 IU (100 μl) of eCG (equine chorionic gonadotrophin) hormone plus, after 48 h, injection of 5 IU (100 μl) of hCG (human chorionic gonadotrophin) (Fowler and Edwards 1957). The females were caged with 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. 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 of studies was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Pernambuco.

Study groups and immunization protocol

Immediately after birth, the newborns from *S. mansoni*-infected or non-infected mother were housed in cages with interchanged mothers. Then, after adoptive nursing, offspring mice born from infected mothers (BIM) were suckled by non-infected mothers. The offspring mice from non-infected mothers were suckled by infected mothers (SIM). Another group of animals born from *S. mansoni*-infected mothers remained suckling in their own mothers (born and suckled in infected mothers (BSIM)). For the control group was used animals born and suckled by non-infected mothers.

After six weeks, male offspring mice were divided into groups ($n=10$) and submitted to the immunization protocol. Mice were immunized, subcutaneously (s.c.), with 100 μg of ovalbumin (OA; grade V; Sigma-Aldrich) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma-Aldrich), on the base of the tail (0.1 ml/animal). The eight following groups were used to evaluate the post-natal effects of exposure to *S. mansoni* infection in utero and during nursing: (1) mice BIM+OA, mice only born from infected mothers and immunized with OA+CFA; (2) non-immunized mice BIM; (3) mice SIM+OA, animals only suckled by infected mothers and immunized with OA+CFA; (4) non-immunized mice SIM; (5) mice BSIM+OA, animals born and suckled by infected mothers and immunized with OA+CFA; (6) non-immunized mice BSIM; (7) control+OA, animals born and suckled by non-infected mothers 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 OA was injected into one hind footpad and the same volume of saline in the other. Footpad swelling was periodically measured from 3 to 24 h using a pocket thickness gauge (Mitutoyo Mfg. Co. Tokyo, Japan) and expressed as the increase in thickness relative to the saline-injected paw. The results are expressed as the median ± standard error for each group. Mice non-immunized with OA (group 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 Xilazine HCl/Ketamine HCl. Plasma samples were tested individually for IgG1 and IgG2a antibodies using OA-coated (20 μg/ml) 96-well plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA). The reactions were developed with a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an OPD (*O*-phenylenediamine; Sigma) solution in 0.1 M citrate buffer plus H_2O_2. The plates were read (450 nm) in an automated ELISA reader. Titration curves were carried out for all the samples. The results are expressed as the median of the sample optical density (O.D.) from each group in an appropriated dilution (within the linear part of the titration curve) for each isotype ±standard error (1:8,192 for IgG1 or 1:16 for IgG2a).

Cytokine assays

Nine days after immunization, the spleen of each animal was 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 10^7 (24 h) or 6×10^6 (72 h) cells/ml in 24-well tissue culture plates (Costar Cambridge, MA, USA) and subsequently stimulated with OA (500 μg/ml) or concanavalin A (Con A) (5 μg/ml). Supernatants were harvested after 24 or 72 h and assayed for cytokine content: IL-2 and IL-4 (24 h), IFN-γ and IL-10 (72 h). The cytokines were measured using specific two-site sandwich ELISA, using the following monoclonal antibodies: for IL-2, JES6-IA12 and biotinylated JES6-5H4; for IL-4, 11B11 and biotinylated BVD6.24G2; for IFN-γ, XMG 1.2 and biotinylated AN18; and for IL-10, C252-2A5 and biotinylated SXC-1. Binding of biotinylated antibodies was detected using a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an ABTS (2-2′-azinobis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulphonic acid); Sigma) solution in 0.1 M citrate buffer plus H_2O_2. The plates were read (405 nm) in an automated ELISA reader. The samples were quantified by comparison with the standard curves of purified recombinant cytokines (rIL-2, rIFN-γ, rIL-4, or rIL-10), with resulting detection limits of 0.44 ng/ml for IL-2, 1.25 ng/ml for IFN-γ, 0.31 ng/ml for IL-10 and IL-4.

In vivo IL-10 neutralization

Mice born of infected mothers (BIM) and born of non-infected mothers (control) received intraperitoneal (i.p.) injections with 2 mg of rat anti-mouse IL-10 monoclonal antibody (MoAb) (2A5) or equivalent amounts of a control rat IgG MoAb (GL-113), 2 h before OA-immunization. *In vivo* hypersensitivity reactions were elicited eight days after immunization and plasma samples were tested individually for anti-OA IgG1 and IgG2a antibodies levels.

Statistical analysis

To analyze the hypersensitivity reactions and antibody production, statistical differences ($\rho<0.05$) between groups were assessed using the Wilcoxon test (treatment×time) and Kruskal–Wallis test, respectively, followed by multiple comparisons using the Mann–Whitney test. For cytokine analysis, a one-way analysis of variance followed by multiple comparison using the Tukey's method was used. All procedures were repeated three times to evaluate the reproducibility of the results.

Results

Anti-OA antibody-mediated and delayed-type hypersensitivity reactions in adult offspring from schistosomotic mothers

Eight days after immunization with OA, the antibody-mediated and delayed-type hypersensitivity reactions were elicited in the footpads of mice born from or only suckled by *S. mansoni*-infected mothers, after challenging with aggregated OA, and compared to the kinetic hypersensitivity reactions of OA-immunized mice from non-infected mothers that were similarly challenged. This analysis was also conducted in mice born and suckled by their infected mothers.

The anti-OA immediate hypersensitivity reaction, measured at three hours, was strongly increased (~50%) in mice

only suckled by *S. mansoni*-infected mothers (SIM+OA) when compared to the Control+OA group (Fig. 1). This reaction was 30% higher in offspring born from infected mice (BIM+OA and BSIM+OA) than in the control group. Six or nine hours after challenge, an increase in the immediate reaction to OA could also be noted in the groups of mice that received milk from infected mothers (SIM+OA and BSIM+OA). In contrast, a significant suppression was observed in BIM+OA group. Regarding OA-specific delayed-type hypersensitivity reaction (24 h), there was an increment in mice BIM+OA and mice BSIM +OA groups, while no alteration was observed in the mice SIM+OA group.

Skin reactions in the OA non-immunized groups, for test non-specific swelling, were unremarkable (data not shown).

Maternal schistosomiasis alter the OA-specific IgG1 and IgG2a antibodies production in adult offspring

Nine days after immunization, the antibody levels were assessed in the plasma obtained from all the above groups. Anti-OA IgG1 antibody production in the mice BIM+OA had decreased when compared to animals without previous infected-mother contact (Control+OA) or animals suckled by infected mothers (SIM+OA and BSIM+OA) (Fig. 2a). On the other hand, the SIM+OA and BSIM+OA groups showed a significant increased in the production of anti-OA IgG1 antibodies in comparison to control group. Figure 2b shows that the mice suckled by *S. mansoni*-infected mothers also synthesized higher anti-OA IgG2a antibody

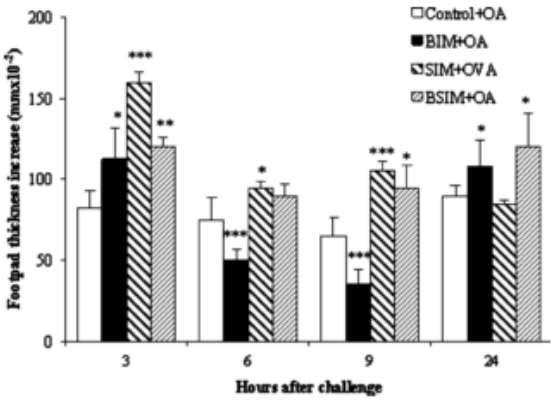


Fig. 1 Hypersensitivity reactions to OA in born (BIM+OA), suckled (SIM+OA) or born and suckled (BSIM+OA) mice from *S. mansoni*-infected mothers that were immunized with OA in CFA. Mice were challenged with aggregated OA in the footpad 8 days after immunization. Born and suckled mice from uninfected mothers and immunized with OA were equally challenged (Control+OA). The results represent the median of the net increase in footpad thickness of seven to ten mice/group±standard error. *$p<0.05$, **$p<0.01$, and ***$p<0.001$ compared with the Control+OA group

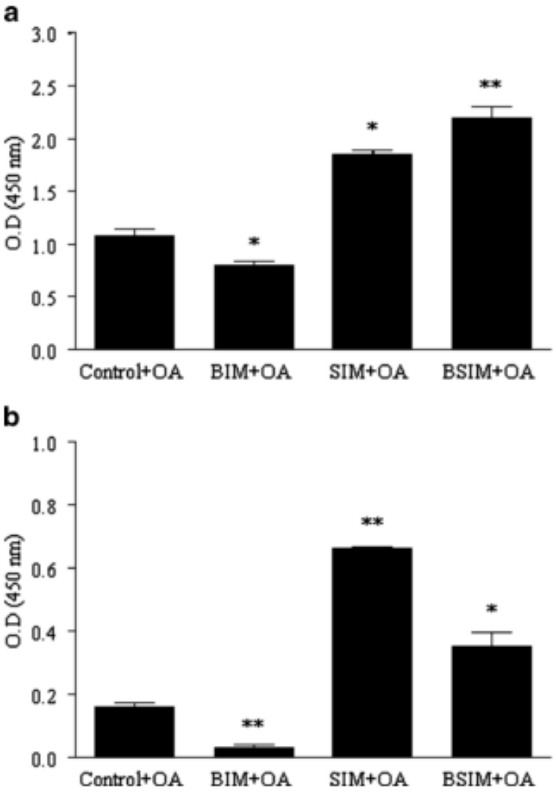


Fig. 2 OA-specific IgG1 (**a**) and IgG2a (**b**) antibodies produced by born (BIM+OA), suckled (SIM+OA), or born and suckled (BSIM+OA) mice from *S. mansoni*-infected mothers that were immunized with OA in CFA. Isotype levels in the plasma were measured by ELISA in dilutions 1:8,192 (IgG1) and 1:16 (IgG2a) 9 days after immunization. Isotype levels from born and suckled mice from uninfected mothers (Control+OA) were also measured. The results represent the median of absorbance (O.D.)±standard error for seven to ten animals/group. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ compared with the Control +OA group

levels, but in a different proportion: a four-fold increase in the SIM+OA group and two-fold in the BSIM+OA. In contrast, in mice born from, but not suckled by infected mothers, the anti-OA IgG2a antibody production was drastically impaired. The production of OA-specific IgG1 or IgG2a antibodies did not occur in any of the non-immunized groups (data not shown).

Mice born from *S. mansoni*-infected mothers synthesize more IL-10, while IL-2 production is a striking outcome of the suckling from these mothers

Spleen cells from the different groups were cultured with OA or Con A and the supernatants were collected to quantify cytokine content. The results depicted in Fig. 3a show that the synthesis of IL-2 could be measured in the

Parasitol Res (2010) 107:95–102

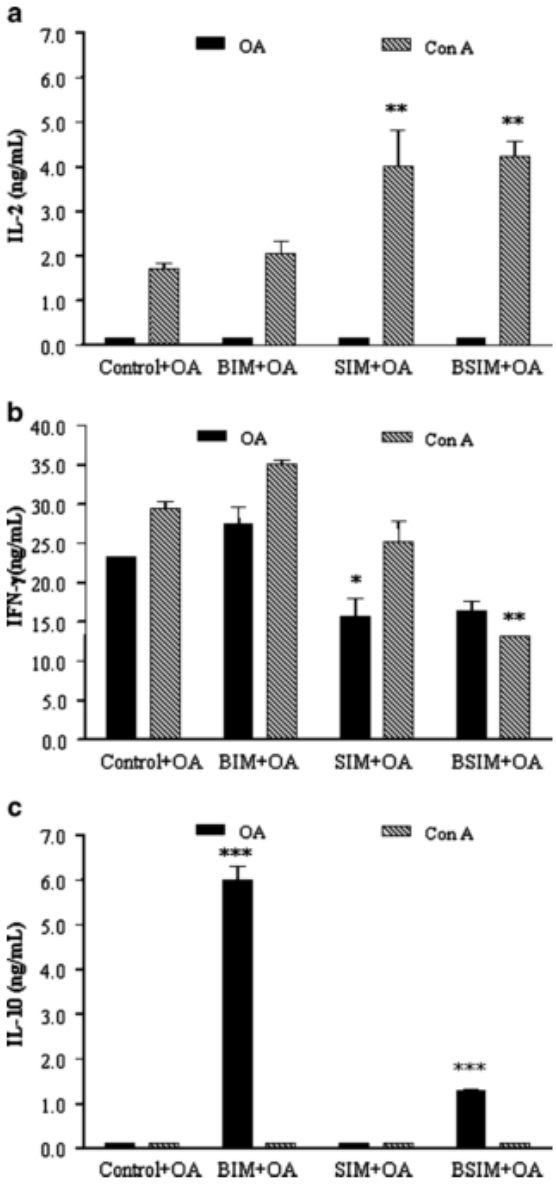


Fig. 3 IL-2 (**a**), IFN-γ (**b**), and IL-10 (**c**) secreted by spleen cells from born (BIM+OA), suckled (SIM+OA) or born and suckled (BSIM+OA) mice from *S. mansoni*-infected mothers that were immunized with OA in CFA nine days before. A total of 10^7 or 6×10^6 cells were stimulated with OA (500 μg/ml) or Con A (5 μg/ml) for 24 or 72 h, respectively. Cytokines were quantified in supernatants harvested after 24 h (IL-2) or 72 h (IFN-γ and IL-10) by sandwich ELISA. Cytokine levels produced by the group of mice born and suckled from uninfected mothers (Control+OA) were also quantified. The results represent the median±standard error for seven to ten 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. *$p<0.05$, **$p<0.01$, and ***$p<0.001$ compared with the Control+OA group

supernatants of cells following mitogenic stimulation. In this condition, a notable IL-2 synthesis was observed in both the SIM+OA and BSIM+OA groups, whereas in the BIM+OA group, the cytokine level was not altered in comparison to the control+OA group.

With regard to IFN-γ synthesis, there was a reduction in the SIM+OA and BSIM+OA animals when stimulated in vitro with OA and Con A, respectively, in relation to the control+OA and BIM+OA groups (Fig. 3b). There was no significant difference in the IFN-γ production between the BIM+OA and control+OA groups. IL-10 levels were detected only in the cell supernatants of the OA-immunized mice from infected mothers when restimulated in vitro with OA (Fig. 3c). It was possible to observe the high IL-10 production by the mice BIM+OA, while low levels of this cytokine was detected in the BSIM+OA mice in comparison to the former group. Under the culture conditions used, the levels of IL-4 were not detected in any of the tested groups.

IL-10 is committed with the anti-OA IgG1 and IgG2a antibodies suppression in mice born of *S. mansoni*-infected mothers

Since adult offspring born of *S. mansoni*-infected mothers provides IL-10 production in response to OA, accompanied of impairment of anti-OVA IgG1 and IgG2a synthesis, we wonder about the involvement of this cytokine on the anti-OA humoral response in this group. Therefore, mice born from infected mothers were treated with IL-10-blocking antibody and submitted to OA immunization. In the BIM+OA group that received anti-IL-10 treatment, the OA-specific IgG1 and IgG2a levels, as well as the footpad thickness increasing at 6 h and 9 h, were restored and significantly higher in relation to levels in mice BIM+OA treated with isotype control antibody (Table 1).

Discussion

S. mansoni infection induces immunosuppression against homologous and bystander antigens through a down-regulatory cytokine/T cell environment (Pearce et al. 1991; Actor et al. 1994; Sabin et al. 1996; La Flamme et al. 2003; Smits et al. 2007). Attenuation of schistosomiasis symptoms in postnatal infections has been associated with maternal infection, in which the parasite antigen and anti-*S. mansoni* antibodies are passed through the placenta and breast milk (Lenzi et al. 1987; Attallah et al. 2006). Here, we demonstrate that *S. mansoni*-infected mothers could influence the immunity of their descendants on a long-term basis by inducing a suppressive potential to an unrelated antigen. On the other hand, suckling from infected mothers

Table 1 Effect of in vivo anti-IL-10 monoclonal antibody treatment on OA-specific IgG1 and IgG2a synthesis and in vivo hypersensibility reaction (HR) in mice born from *S .mansoni* infected mothers

Groups[a]	IgG1[b]	IgG2a	HR (6h)[c]	HR (9h)
Control+OA GL113	0.4±0.1	0.2±0.08	45±3.5	75±5.0
Control+OA 2A5	0.25±0.07	0.6±0.3	75±5.0	90±12.0
BIM+OA GL113	0.10±0.05*	0.04±0.02*	30±4.1*	45±9.6*
BIM+OA 2A5	0.30±0.05**	0.6±0.3**	65±5.8**	80±5.1**

*$P<0.05$, BIM+OVA GL113 compared with Control+OA GL113; **$P<0.05$, BIM+OVA 2A5 compared with BIM+OA GL113

[a] Mice born from schitosomotic (BIM) and non-infected (Control) mothers submitted to i.p. injections with 2 mg of rat anti-IL-10 MoAb (2A5) or equivalent amounts of a control rat IgG MoAb (GL113), 2 h before OA immunization

[b] OA-specific IgG1 and IgG2a antibodies levels produced by BIM+OA or Control+OA groups, previously injected with 2A5 or GL113, 9 days after OA immunization. Titration of plasma was performed by ELISA. The results represent the median O.D.±standard error of 5–7 mice at 1:8,192 (IgG1) and 1:16 (IgG2a) dilution

[c] Footpad thickness increase, at 6 and 9 h, in response to OA±standard error of 5–7 mice from the BIM+OA or Control+OA group, previously injected with 2A5 or GL113. The mice were challenged with aggregated OA in the footpad 8 days after OA immunization

improved the humoral immune response to this antigen in adult life, in addition to attenuating the suppression acquired during gestation.

In an effort to mimic the parasitological and immunological aspects of *S. mansoni* infection in endemic areas, female mice were infected with a low parasitic load, which is similar to the conditions that are experienced by most of the endemic population in the Northeast of Brazil (Tanabe et al. 1997). The mice were mated during the egg deposition period (on day 60 post-infection), when the immunomodulation to schistosomiasis occurs (Pearce et al. 1991). All offspring were submitted to immunization with OA emulsified in an adjuvant, s.c., which has always been an appropriate protocol to evaluate the modulation induced by helminths (Ferreira et al. 1995; Souza et al. 2002).

Our results show that gestation in *S. mansoni*-infected mother mice helps to induce high amounts of IL-10 in the adult offspring with partial development of the immune response to OA in these mice. It was observed IL-2 and IFN-γ production, accompanied of a small increment in the in vivo anti-OA hypersensibility reaction (3 h) and cell-mediated response (24 h). The high IL-10 levels were committed with the hampering of the anti-OA IgG2a and IgG1 antibodies production and hypersensibility reaction dependent of immune complexes (6 and 9 h). The gestational microenvironment has been characterized as an immunoinhibitory compartment, mainly through the IL-10 production by DCs and macrophages in utero/placental interaction tissues (Heikkinen et al. 2003; Blois et al. 2004). The reduced immunity seems to remain after birth (Taylor and Bryson 1985; Tasker and Marshall-Clarke 1997), and gradually changes through continuous microbial contact in infancy that leads to the onset of immunological competence. The intrinsic property of soluble egg antigen from *S. mansoni* to elicit IL-10 production from APCs has already been shown (Thomas and Harn 2004). Thus, parasite antigen in the cells of the uterine-placental interface could accent the capacity of the uterine APCs to produce IL-10 and would favor the suppressive status that is sustained for a long period throughout the adult life.

In spite of the inhibitory background in the adult offspring, the IL-10 action was not enough to carry out the entire impairment effect in our OA immunization model in BIM mice. Compelling evidence has been reported that shows that an active Treg cell population is necessary for achieving efficient control on the Th effector response (Taylor et al. 2006) in an IL10-independent manner. Although maternal-derived T cells have been detected in the fetal/neonatal circulation (Wan et al. 2002; Srivatsa et al. 2003), we thought that egg-specific Treg cells generated in the infected mothers could be inactive in adult offspring. This assumption is supported by two findings taken together: adult offspring are schistosomal-antigen free (Attallah et al. 2006) and the indispensable permanence of parasite antigens for Treg cells regulatory activity (as observed in chronic diseases) (Sakaguchi 2003).

Additionally, maternal milk from *S. mansoni*-infected mothers provided an enhanced effect in the humoral response specific to OA (in vivo immediate HR, IgG1, and IgG2a levels) in the offspring. IFN-γ detection and remarkable IL-2 production, without IL-10 synthesis, raised the idea that these mice have much more responsiveness to an unrelated antigen in adult life when compared to mice suckling by non-infected mothers or those only born from infected mothers.

The beneficial effect of maternal IgG antibodies in milk on the wide development of lineage B cells of the newborn's immature immune system is well-known (Malanchère et al. 1997). Nevertheless, in our study, adult offspring that had contact with milk of non-infected mothers did not produce very high antibodies levels when

compared to offspring suckled by infected mothers. This data leads us to believe that previous contact with milk from *S. mansoni*-infected mothers leads to a more effective antibody production in the progeny. Indeed, prior administration of helminths antigen reinforces the humoral immune response to heterologous antigens instead of impairing it (Barriga 1984; Barriga and Ingalls 1984). Even by inductor route of immunological tolerance, as the oral mucosa, the simultaneous injection of both tolerated and unrelated protein is required (Carvalho et al. 1997). Hence, previous oral administration of *S. mansoni* antigens in neonatal mice would not damage the immune response to OA that was primed after a long period (adult life).

Interestingly, the joint effect of gestation and nursing in infected mothers revealed an intermediate profile in the mice BSIM+OA. IFN-γ synthesis, high levels of IL-2 and anti-OVA IgG1 and IgG2a antibodies were similar to the SIM+OVA group. However, there was a partial IL-10 production. This last result corroborates the effect *in utero* exposure to *S. mansoni* antigens in favoring IL-10 synthesis, while previous and ongoing contact with parasite antigens during breastfeeding improves the anti-OVA response in the adult life.

In summary, our findings show that *S. mansoni*-infected mothers affect the postnatal immune response to an unrelated antigen and emphasize the role of the breast milk from these mothers as an immunity stimulant that is maintained on a long-term basis. Further experiments carried out in mothers depleted in B or T cell can elucidate whether the increase of the immune responsiveness by lactation is due to antibody or T cell derived cytokine, beside of investigations about the modification in the mucosa immune response by parasite antigen in maternal milk. This study highlighted the importance of the experimental and clinical approach regarding efficacy of the vaccines and predisposition to allergy or autoimmunity in offspring born or breastfeeding in schistosomotic mothers.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. Carla Lima from the Special Laboratory of Applied Toxinology (CAT/CEPID), Butantan Institute, São Paulo-Brazil for her helpful comments and suggestions. We also thank Maria da Conceição Batista for competent technical assistance. This work was conducted in compliance with Brazilian laws.

References

Actor JK, Marshall MA, Eltoum IA, Buller RM, Berzofsky JA, Sher A (1994) Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. Eur J Immunol 24:3050–3056

Attallah AM, Ghanem GE, Ismail H, El Waseef AM (2003) Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. Am J Trop Med Hyg 68:647–651

Attallah AM, Abbas AT, Dessouky MI, El-emshaty HM, Elsheikha HM (2006) Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. Parasitol Res 99:137–145

Barbosa CS, Favre TC, Wanderley TN, Callou AC, Pieri OS (2006) Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 101 (suppl I):55–62

Barriga OO (1984) Immunomodulation by nematodes: a review. Vet Parasitol 14:299–320

Barriga OO, Ingalls WL (1984) Potentiation of IgE-like response to *Bordetella bronchiseptica* in pigs following *Ascaris suum* infection. Vet Parasitol 16:343–345

Blois SM, Soto CDA, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC (2004) Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. Biol Reprod 70:1018–1023

Brustoski K, Moüller U, Kramer M, Petelski A, Brenner S, Palmer DR, Bongartz M, Kremsner PG, Luty AJF, Krzych U (2005) IFN-γ and IL-10 mediate parasite-specific immune responses of cord blood cells induced by pregnancy-associated *plasmodium falciparum* malaria. J Immunol 174:1738–1745

Carvalho CR, Verdolin BA, Vaz NM (1997) Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. Scand J Immunol 45:276–281

Ferreira AP, Faquim ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS (1995) Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. Cell Immunol 162:202–210

Fowler RE, Edwards RG (1957) Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. J Endocrinol 15:374–384

Friedman JF, Mital P, Kanzaria HK, Olds GR, Kurtis JD (2007) Schistosomiasis and pregnancy. Trends Parasitol 23:159–164

Hang LM, Boros DL, Warren KS (1974) Induction of immunological hyporesponsiveness to granulomatous hypersensitivity in *Schistosoma mansoni* infection. J Infect Dis 130:515–522

Heikkinen J, Möttönen M, Komi J, Alanen A, Lassila O (2003) Phenotypic characterization of human decidual macrophages. Clin Exp Immunol 131:498–505

Herz U, Joachim R, Ahrens B, Scheffold A, Radbruch A, Henz H (2000) Prenatal sensitization in a mouse model. Am J Respir Crit Care Med 162:S62–S65

Katz N, Chaves A, Pellegrino J (1972) A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 14:397–400

La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT (2003) Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. Infect Immun 71:4996–5004

Leme AS, Hubeau C, Xiang Y, Goldman A, Hamada K, Suzaki Y, Kobzik L (2006) Role of breast milk in a mouse model of maternal transmission of asthma susceptibility. J Immunol 176:762–769

Lenzi JA, Sobral AC, Jr A, Grimaldi FG, Lenzi HL (1987) Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. Mem Inst Oswaldo Cruz 82:257–267

Malanchère E, Huetz F, Coutinho A (1997) Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. Eur J Immunol 27:788–793

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

Medeiros M Jr, Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araújo MI, Cruz AA, Atta AM, Rego MA, De Jesus AR, Taketomi EA, Carvalho EM (2003) *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. J Allergy Clin Immunol 111:947–951

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

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A (1991) Down-regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. J Exp Med 173:159–166

Sabin EA, Araújo MI, Carvalho EM, Pearce EJ (1996) Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis 173:269–272

Sakaguchi S (2003) Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. Nature Immunol 4:10–11

Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, Soullie T, Willart MA, Lievers E, Kadouch J, Kool M, Kos-van Oosterhoud J, Deelder AM, Lambrecht BN, Yazdanbakhsh M (2007) Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. J Allergy Clin Immunol 120:932–940

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS (2002) Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. Braz J Med Biol Res 35:81–89

Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Bianchi DW (2003) Maternal cell microchimerism in newborn tissues. J Pediatr 142:31–35

Tanabe M, Gonçalves JF, Gonçalves FJ, Tateno S, Takeuchi T (1997) Occurrence of a community with high morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection regardless of low infection intensity in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 91:144–149

Tasker L, Marshall-Clarke S (1997) 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 9:475–484

Taylor S, Bryson YJ (1985) Impaired production of γ-interferon by newborn cells in vitro is due to a functionally immature macrophage. J Immunol 134:1493–1497

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ (2006) Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. J Immunol 176:5839–5847

Thomas PG, Harn DAJ (2004) Immune biasing by helminth glycans. Cell Microbiol 6:13–22

Wan W, Shimizu S, Ikawa H, Sugiyama K, Yamaguchi N (2002) Maternal cell traffic bounds for immune modulation: tracking maternal H-2 alleles in spleens of baby mice by DNA fingerprinting. Immunol 107:261–267

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA (2007) Immunopathology of schistosomiasis. Immunol Cell Biol 85:148–154

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM (2004) Immunopathogenesis of schistosomiasis. Immunol Rev 201:156–167

ANEXO C - Normas para publicação no Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz On-line

Instructions to Authors

Author Guidelines

Submitted papers must be written in Portuguese or English.

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces).

Title: with up to 250 characters.

Author's names: without titles or graduations.

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only.

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations. See an example of result format at: http://memorias.ioc.fiocruz.br/results.pdf.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult: http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng.

• **In the text use authors' surname and date:**

Lutz (1910) or (Lutz 1910).

With two authors it is:
(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912).

When there are more than two authors, only the first is mentioned:
Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

• **At the end of the paper use the following styles:**

Journal article
Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz 14*: 15-61.

Book and Thesis
Forattini OP 1973. *Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose*, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. *Controle alternativo e alterações fisiológicas em Biomphalaria glabrata (Say, 1818), hospedeiro intermediário de Schistosoma mansoni Sambom, 1907 pela ação do látex de Euphorbia splendens var. hislopii N.E.B (Euphorbiaceae)*, PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book
Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet
Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:

http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm.

Monograph on the Internet
Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: http://www.nap.edu/books/0309074029/html/.

Homepage/Web site
Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: http://www.cancer-pain.org/.

Part of a homepage/Web site
American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html.

DATABASE ON THE INTERNET

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: http://www.abms.org/newsearch.asp.

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html Files updated weekly. Updated June 15, 2005.

• **Illustrations:** figures and tables must be understandable without reference to the text.

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with *a*, *b*, *c*, etc.) below.

•**Short communications**: should communicate rapidly single results or techniques. The text should be continuous and never arranged in sections or items. Therefore, results must be presented and discussed at a one time. Short Communications should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and up to five key words must be provided. See an example at http://memorias.ioc.fiocruz.br/104_8_1666.pdf.

• **Alternative format:** manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

• an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;
• a **copyright** assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.
•**Page charges:** there will be no page charges.
•**Proofs:** one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

ANEXO D - Comprovante eletrônico de submissão (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz).

REVISED - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz - Manuscript ID MIOC-2012-0443.R2

Dear Prof. Souza:

Your manuscript entitled "MATERNAL SCHISTOSOMIASIS ALTERS COSTIMULATORY MOLECULES EXPRESSION IN ANTIGEN-PRESENTING CELLS FROM ADULT OFFSPRING MICE" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2012-0443.R2.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts athttp://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo .

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,
Prof. Ricardo Lourenço
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
memorias@fiocruz.br

ANEXO E - Normas para publicação no International Journal for Parasitology.

INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY

Sponsored by the Australian Society for Parasitology

DESCRIPTION

The *International Journal for Parasitology* publishes the results of original research in all aspects of basic and applied **parasitology**, including all the fields covered by its Specialist Editors, and ranging from parasites and **host-parasite relationships** of intrinsic biological interest to those of **social** and **economic importance** in human and veterinary **medicine** and **agriculture.** Original research includes the development of novel and innovative concepts and ideas, as well as experimental and observational science that raises new hypotheses. Because of its breadth of discipline coverage, the aims and significance of all contributions should be made clear to readers who are not expert in the particular subject of papers. In applied parasitology, it will tend to favour contributions of broader significance to the subject rather than narrow, highly specialised applications. The principal form of publication is the full length paper which contains substantial results from a major program of research. The Journal also provides a medium for the rapid publication of a limited number of papers reporting highly significant original findings, as Rapid Communications. It also publishes Thematic Issues incorporating papers on a topical theme and commissions papers with emphasis on shorter, focussed Reviews of topical issues and strategically important subjects. The Journal encourages critical comment and debate on matters of current controversy in parasitology via "Current Opinions".

IMPACT FACTOR

2011: 3.393 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The journal publishes the results of high quality original research in all aspects of basic and applied parasitology, ranging from parasites and host-parasite relationships of intrinsic biological interest to those of social and economic importance in human and veterinary medicine and agriculture. Original research includes the development of new concepts and techniques, as well as experimental and observational science. Because of its breadth of discipline coverage, the aims and significance of all contributions should be made clear to readers who are not expert in the particular subject of papers. In applied parasitology, it will tend to favour contributions of broader significance to the subject rather than narrow, highly specialised applications.
The journal does not normally publish case reports.

Types of paper

There are two types of papers, structured as follows:

Original Research Papers

Title page. Contains the title, authors' names, addresses, name and contact details of the corresponding author.
Abstract. The second page contains an Abstract of not more than 300 words in a single paragraph. At the foot of this page a list of up to 8 Index Keywords should be provided.
Text. (see sections above) In addition to major headings two forms of subheadings are used: (a) the numbered italicised side subheading referring to several paragraphs; (b)

the italicised paragraph subheading at the beginning of a single paragraph used only in Materials and methods.

'Succinctus'
The journal offers an avenue for publishing short, succinct papers that describe highly significant research findings but with less content than a "research article". Articles will be limited to 4,000 words and not more than three display items (figures or tables). The article must not be preliminary but will describe significant and substantial new findings, be complete in itself and not be published at a later date in greater detail. The typescript should be marked *'Succinctus'* on the top left-hand corner of the title page. The first page should show title, author and address details. A short Abstract of not more than 100 words in the same style as for full papers plus up to six Keywords should follow. The text of the paper is next, written with a minimum number of paragraphs and unstructured (i.e. no headings). Text describing the methods should be included in the manuscript body and/or figure legends; the methodology should be succinct but contain sufficient information and/or suitable references to allow readers to replicate the work. Not more than 25 essential references should be cited. Other instructions are the same as those for full papers.

Contact details for submission
General enquiries prior to submission should be directed to the Editorial Office: editor@IJP.org.au

BEFORE YOU BEGIN
Ethics in publishing
For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see http://www.elsevier.com/publishingethics and http://www.elsevier.com/ethicalguidelines.

Policy and ethics
Care of experimental animals. It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

Conflict of interest
All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also http://www.elsevier.com/conflictsofinterest.

Submission declaration and verification
Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see http://www.elsevier.com/postingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck http://www.elsevier.com/editors/plagdetect.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:
Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.
After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see http://www.elsevier.com/copyright). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.
Authors whose articles are published in the International Journal for Parasitology will be asked to transfer copyright for that article to the Australian Society for Parasitology, Inc. If there are any issues or conflicts of interest which might prevent the author transferring copyright, they should inform the Editor when submitting the manuscript.
Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult http://www.elsevier.com/permissions). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult http://www.elsevier.com/permissions.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: http://www.elsevier.com/authorsrights.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see http://www.elsevier.com/funding.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit http://www.elsevier.com/fundingbodies.

Open access

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of $3000 applies (for further information on open access see http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options). Please note that you an only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at http://www.elsevier.com/fundingbodies. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: http://www.elsevier.com/authorsrights.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop http://webshop.elsevier.com/languageediting/ or visit our customer support site http://support.elsevier.com for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Submitted manuscripts are first reviewed by a specialist editor to assess significance and general suitability for the journal. Approximately half of all submissions progress to peer review.

The final pdf should be no larger than 5 MB.
If file size cannot be reduced to less than 10 MB, the author should contact the IJP Editorial Office for instructions (editor@IJP.org.au).

Required Information:
Name, affiliation, email, telephone and fax numbers and mail address information for one corresponding author.
This must be the same person nominated as corresponding author on the manuscript title page and this person must submit the manuscript on-line.
The corresponding author, through the web access, is responsible for actions with respect to each paper. E-mail prompts will be delivered only to the corresponding author. Articles can also be tracked by the corresponding author via the online system.
Name and affiliations of all other authors.
Cover letter is mandatory for all submissions and should address the novelty, significance of the work.
Note: Current Opinions and Invited Reviews are by invitation only).

Order of files
Manuscript should contain (in order) Title, Authors and addresses, Corresponding Author and address, Abstract, Keywords. In numbered sections: 1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results; 4. Discussion; then Acknowledgements; References; Legends

to Figures. Tables with their legends (in separate or combined files, numbered, in order). Figures (in separate files); preferred formats: JPEG, EPS or PDF. Supplementary and multimedia files.

Format
The preferred format for the text is Microsoft Word. The title page, abstract and text should be formatted with line numbers. The manuscript should be formatted to A4 size paper, in English, double spaced and with 2 cm margins.
Further journal requirements
During submission you will also have to:
Confirm that all authors have read the manuscript and accept responsibility for its contents.
Agree to an ' Ethics in Publishing' document.

Referees
Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information
Statistical Analysis
Authors should seek advice on data analysis prior to submission. A commentary (Morrison, D.A., 2002. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. Int. J. Parasitol. 32, 1065-1070) may also be consulted. Papers may be sent to referees with particular expertise in statistics and modelling.

PREPARATION
Use of wordprocessing software
It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: http://www.elsevier.com/guidepublication). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.
To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure
Subdivision - numbered sections
Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.
Introduction
State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.
Material and methods
Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate, however it is not a standard format for this journal; reasons for using the combined format must be provided in the submission cover letter. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Appendices

This journal does not publish appendices. Information should be included within the manuscript text or provided as supplementary material. If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent section, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

• ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Authors should supply a thumbnail image for all types of manuscripts. Articles accepted for publication will be featured via a copy of the article abstract together with a thumbnail image to direct people to the manuscript. An image that serves to illustrate the theme of the paper is desired. It can be a figure from the paper or a related image that typifies the content of the paper. Authors must supply the thumbnail image separately as an electronic file. The maximum final dimensions of the thumbnail image will be 5 cm x 5 cm. Please consider readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See http://www.elsevier.com/highlights for examples.

Keywords
Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using UK spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations
Avoid the use of abbreviations, but if necessary, authors should use the list (click here to see list) as a guide to those terms that need not be given in full, or define each abbreviation on first use.

Acknowledgements
Authors should provide confirmation of consent from persons acknowledged in manuscripts eg. personal communications. This can be provided in a covering letter or by e-mail to the editorial office.

Units
Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking
Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See http://www.elsevier.com/databaselinking for more information and a full list of supported databases.

Math formulae
Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes
Footnotes should only be used in tables.
Table footnotes
Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork
Electronic artwork
General points
• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
• Embed the used fonts if the application provides that option.
• Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
• Number the illustrations according to their sequence in the text.
• Use a logical naming convention for your artwork files.
• Provide captions to illustrations separately.
• Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.

• Submit each illustration as a separate file.
A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
http://www.elsevier.com/artworkinstructions
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.
Formats
If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.
Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.
Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
• Supply files that are too low in resolution;
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.
Color artwork
Illustrations of all kinds should be listed together under ’ Legend to Figures’ numbered consecutively and their positions indicated in the text. Figures should be high quality, of an adequate size to ensure clarity, and letters and numbers should be at least 4 mm in height. Magnification should be indicated by inclusion of a scale bar in the figure and its value should be indicated on the figure or in the legend. Each figure should be obvious from its file name. If images have been altered, describe the nature of changes made and software used. This information should be included in the ’ Materials and methods ’ section of the manuscript.
In general, figures will be printed and appear on electronic versions of papers in black and white. Where appropriate, colour figures can be provided on the electronic version, but black and white in the printed version. In this instance, authors are required to submit both colour and high quality black and white versions of figures. Authors should note that the figure legend will be the same in both versions. While there is no charge for colour in electronic versions, there generally is a fee for printed colour figures. Please contact the Editorial Office for the current policy.
Figure captions
Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables
Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References
Correct references are the responsibility of the author. Please ensure that all references cited in the text are included in the reference list.

References in the text start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g. 'Combes (2001) has shown the importance of ...', or '... has been

described (Combes, 2001; Kumar et al., 2004) ...', using date order. More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by two authors, use (Sangster and Dobson, 2002) or for more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. There is an output style available for EndNote. Please refer to the EndNote website or contact the Editorial Office for a copy of this style file.

The references in the reference list should be in alphabetical order. References to journal articles should contain names and initials of all author(s), year of publication, article title, abbreviation of the name of the journal, volume number and page numbers.

Unpublished data, personal communications and papers ' in preparation' or ' submitted', abstracts (whether published or not) and theses should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work "in press" may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter or e-mail from the named person(s) giving permission to quote such information. References to books should also include the title (of series and volume), initials and names of the editor(s) and publisher and place of publication.

Examples:
Combes, C., 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. University of Chicago Press, Chicago and London.
Kumar, N., Cha, G., Pineda, F., Maciel, J., Haddad, D., Bhattacharyya, M.K., Nagayasu, E., 2004. Molecular complexity of sexual development and gene regulation in *Plasmodium falciparum*. Int. J. Parasitol. 34, 1451-1458.
Pettersson, E.U., Ljunggren, E.L., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., in press. Functional analysis and localisation of a delta-class glutathione S-transferase from *Sarcoptes scabiei*. Int. J. Parasitol.
Sangster, N.C., Dobson, R.J., 2002. Anthelmintic resistance. In: Lee, D.L. (Ed.), The biology of nematodes. Taylor and Francis, London and New York, pp. 531-567.

Citation in text
Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references
As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references to published articles can be included in the reference list. Other web references such as software programs, databases and individual web pages, should have the reference details included at the appropriate place within the text.

References in a special issue
Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Journal abbreviations source
Journal names should be abbreviated according to the NLM catalogue:
http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: http://www.sciencedirect.com. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at http://www.elsevier.com/artworkinstructions. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

For non-integrated supplementary files, a footnote should be typed on the title page of the manuscript: ’ Note: Supplementary data associated with this article’. A copy of supplementary material should be submitted at the same time as the manuscript. Preferred formats are Microsoft Office for text or graphics and avi for movie files. Maximum size of files is 10 MB. If files cannot be reduced to 10MB, authors should contact the IJP Editorial Office (editor@IJP.org.au)

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at http://support.elsevier.com.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a

document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059
When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from http://get.adobe.com/reader. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html.
If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets).

Additional information

Submission of sequence data to databases

Novel nucleotide or protein sequence data must be deposited in the GenBank™ , EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript: 'Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ , EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by the World Wide Web to either GenBank (via BankIt: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/), EMBL (via WebIn: http://www.ebi.ac.uk/subs/allsubs.html) or to DDBJ (via SAKURA: http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/). Special types of submissions, such as genomes, bulk

submissions, segmented sets, and population/phylogenetic/mutation studies, can be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

GenBank/DNA sequence linking. In order for automatic links to be made between papers and GenBank, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See the example). When published they will appear in normal type.

Example: ' GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)'.

Additionally, any multiple alignments of nucleotide or protein data must be submitted to a recognised database and must also receive a unique accession number. The accession number can appear in the text in the relevant section of the Results, as: ' Alignment files are available by anonymous FTP from FTP.EBI.AC.UK in directory/pub/databases/embl/align or via the EMBLALIGN database via SRS at http://srs.ebi.ac.uk; under accession(s)' . The usual method for submitting alignments is by the World Wide Web to the European Bioinformatics Institute (via Webin- Align: http://www.ebi.ac.uk). Microarray data, in MIAME-compliant format, should be submitted to ArrayExpress (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/) or GEO (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Accession identifiers relating to the data should be provided in the manuscript text.

Policy on bioinformatics papers. In silico analysis: The following guidelines apply to papers that exclusively use in silico analysis or rely heavily on this approach for analysis and conclusions. Such papers should address a significant biological issue or issues. Bioinformatic data should be supported by novel or published biological data. Work would typically use information from a number of databases and even from a number of parasite or host species and use a number of analytical methods. Types of ' metaanalysis' are encouraged either across a wide range of parasites or, say, at a number of points in a metabolic or signalling pathway or an immune cascade. In silico analysis may be especially suitable for review articles.

Guidelines for the reporting of protein identifications using mass spectrometry: The following information should be provided for protein or peptide identifications using mass spectrometry:

1. The program, and version number, used to create peak lists and the parameters used in the creation of the list.
2. The program, and version number, of the program used for database searching. Parameters used for searching should be specified, including, but not limited to, precursor-ion mass tolerance, fragmention mass tolerance, modifications allowed for, missed cleavages and enzymes used in protein cleavage.
3. The name and version number of the sequence database used in searches. If a custom-made database is used then complete information on the origin of the sequences and database size should be disclosed. Given the dependence of scoring on database size, the use of a small database, or one excluding contaminants, should be justified.
4. A short description of the methods use to interpret the significance of search results, including any statistical analysis, confidence thresholds and other values specific to judging the certainty of the identification.
5. For large-scale experiments a false-positive determination should be reported. This may be the result of randomized database searches or other approaches.
6. Each protein identification should include the accession number, score generated by the search algorithm used, sequence coverage and the number of unique peptide sequences assigned in the protein identification.

7. Single peptide identifications should include an annotated MS/MS spectrum showing fragment assignments together with the peptide sequence, precursor mass, charge and error.
8. Identifications arising from peptide mass fingerprinting should include an annotated mass spectrum. The number of matched peaks, the number of unmatched peaks and the sequence coverage should also be reported along with all parameters and thresholds used to analyse the data. This includes mass accuracy, resolution, calibration methods, contaminant exclusions along with the scoring scheme used and measure of the false-positive rate.

Taxonomic publications. Taxonomic papers are considered only if they are of broad interest, going beyond purely morphological descriptions which are best suited to specialist journals. Examples of contributions of broader interest include description of new taxa which do not fit within accepted classifications, analyses which are of phylogenetic or biogeographic significance employing a range of analysis techniques or which include information on host-parasite relationships or deleterious effects on the host. Presentations which include description of new species should conform to a prescribed pattern as follows: where the new species name is written for the first time, ' n.sp' should succeed it. The name should be followed by: (1) a description, in telegraphic style, i.e. without articles and verbs, of the specific characters; accompanied by illustrations depicting the main differentiating characters; (2) a diagnosis, emphasising the characters of the new species or genus; (3) the details of type material, (host, location in host, geographic locality, collector, place of deposition and registration). Synopses (a brief summary of a small taxonomic group of parasites) and checklists (a list of parasites from particular hosts in particular localities) are acceptable, provided species named are critically evaluated, identifications are sound and the results are of broad scientific interest. Authors byshould comply with the International Code of Zoological Nomenclature.

Ecological Papers. Specimens upon which new host or locality records are based must be deposited in a museum or recognised collection to be available for further study and registration numbers must be cited.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit http://www.elsevier.com/artworkinstructions. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at http://www.elsevier.com/trackarticle. You can also check our Author FAQs at http://www.elsevier.com/authorFAQ and/or contact Customer Support via http://support.elsevier.com.

© Copyright 2012 Elsevier | http://www.elsevier.com

ANEXO F - Comprovante eletrônico de submissão (International Journal for Parasitology).

From: **Int J Parasitol** <editor@ijp.org.au>
Subject: Submission Confirmation

Dear Dr. Souza,

Your submission entitled "BREASTFEEDING AND PREGNANCY IN SCHISTOSOMOTIC MOTHERS IMPROVES THE DOWN-REGULATION TO A NON-RELATED ANTIGEN DURING POST-NATAL SCHISTOSOMA MANSONI INFECTION" has been received by the International Journal for Parasitology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is http://ees.elsevier.com/ijpara/.

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/IJPARA/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Your sincerely,

Elsevier Editorial System
International Journal for Parasitology
****

For further editorial assistance, please contact the International Journal for Parasitology E-mail: editor@IJP.org.au. For technical assistance, please visit the Elsevier customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923