



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**  
**LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI - LIKA/UFPE**  
**CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES - CPQAM/FIOCRUZ**

**GABRIELA CALIXTO RIBEIRO DE HOLANDA**

**EFEITO DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM CAMUNDONGOS  
ESQUISTOSSOMÓTICAS NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DOS  
DESCENDENTES ADULTOS SOB INFECÇÃO PÓS-NATAL**

**RECIFE – PE**  
**2016**

**GABRIELA CALIXTO RIBEIRO DE HOLANDA**

**EFEITO DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM CAMUNDONGOS  
ESQUISTOSSOMÓTICAS NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DOS  
DESCENDENTES ADULTOS SOB INFECÇÃO PÓS-NATAL**

**ORIENTADORA: Dra. VALDÊNIA MARIA OLIVEIRA DE SOUZA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

**RECIFE – PE  
2016**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

H722e Holanda, Gabriela Calixto Ribeiro de.  
Efeito da gestação e amamentação em camundongos esquistossomóticos na resposta granulomatosa dos descendentes adultos sob infecção pós-natal / Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda. – 2016.  
80 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Camundongos. 2. Esquistossomose. 3. Granuloma. 4. Imunomodulação. 5. Relação materno-fetal. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientadora). II. Título.

618.9883            CDD (23.ed.)            UFPE (CCS2016-084)

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA 26 DE FEVEREIRO DE 2016.**

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 9 horas, na Sala 02 do Edf. das Pós-Graduações do CCS/UFPE, em sessão pública, teve início a defesa da Dissertação intitulada “EFEITO DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM CAMUNDONGOS ESQUISTOSSOMÓTICAS NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DOS DESCENDENTES ADULTOS SOB INFECÇÃO PÓS-NATAL” da aluna Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza. A mestranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de MESTRA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.008442/2016-91) em 17/02/2016, composta pelos Membros Doutores: Vladia Maria Assis Costa (Presidente da Banca), do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Silvia Maria Lucena Montenegro, do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ; e André de Lima Aires, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Dissertação. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder à mesma a menção (Aprovada/Reprovada/Em exigência) Aprovada da referida Dissertação. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 26/02/2016.

---

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vladia Maria Assis Costa

---

Profa. Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro

---

Prof. Dr. André de Lima Aires

---



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

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Souza Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles Pontes Filho

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Ana Catarina de Souza Lopus

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbaso de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vlândia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Libia Cristina Rocha Vilela Moura

Virginia Maria Lorena de Barros

*Dedico esta dissertação aos meus pais, pelo exemplo de superação e dedicação, por me ensinar a perseguir meus objetivos e nunca desanimar. Pelo amor, compreensão e paciência que sempre tiveram sou eternamente grata.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua maravilhosa glória nunca esqueceu de mim, nunca me desamparou.

Aos meus pais que durante a minha graduação e o mestrado perderam muitos cabelos e também ficaram com muitos outros brancos. Por me ensinarem diariamente a ser não apenas uma profissional melhor, mas também ser um ser humano. Vocês são meus melhores e maiores professores, amo vocês.

Aos meus avós, em especial a minha avó Amélia (*in memoriam*) que sempre foi exemplo de determinação e superação, por todas as vezes que me pediu pra estudar para "ser doutora"... - Vó, eu tô quase lá!

Ao meu irmão que provavelmente quis me matar durante todo esse processo devido ao constante estresse e por toda a preocupação que teve comigo e todo apoio prestado.

A minha orientadora Profa. Valdênia pela oportunidade de aprendizado e pela confiança que deposita em mim, por ensinamentos valiosos e por ser um exemplo de profissional.

A todos do Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, Letícia, Patrícia Evelyn, Yêda, Raul, Victor, Weverton, Amanda, Juliana, Cássia, Roeckson, André.

A Patrícia, Erica e Rafaela, que foram de extrema importância para minha formação, ajudando, ensinando, compartilhando e por quem tenho extremo carinho.

A Conceição, que sempre foi uma amiga, companheira de desventuras, que passou comigo por todo o processo de mestrado.

A Wheverton, em quem pude encontrar não apenas alguém disposto a ajudar e ensinar, mas um amigo... daqueles que a gente leva pra vida toda.

Aos amigos que fiz ao longo do caminho, em especial Katharina, Beatriz, Rayanne, Manoel e Diego, que me suportam em amor todos os dias, que sabem exatamente o que eu preciso ouvir (mesmo que sejam palavras duras) e pelo encorajamento.

A Miguel, um anjinho que Deus me concedeu a honra de ser madrinha, que mesmo tão pequenino já me ensina muito sobre o valor das coisas, saber o que realmente importa.

Aos meus amigos e irmãos em Cristo, Carlinhos, Hugo, Camila, Vanessa, Deborah, Suene, Victor, Carlinhos e Claudinho, por todas as orações, palavras de conforto e horas intermináveis de conversas e risos. Mesmo não entendendo muito, vocês sempre mantiveram a fé em mim e sempre me desafiaram a ser mais do que já sou. Vocês são incríveis e eu não poderia ser mais grata a Deus pela vida de cada um de vocês. Amo vocês meus queridos!

A todos os que um dia já foram meus professores, de forma direta ou indireta vocês me fizeram ser o que sou hoje e me ajudaram a alcançar meus objetivos.

*"Não a nós, Senhor, nenhuma glória para nós, mas  
sim ao teu nome, por teu amor e por tua  
fidelidade!"*

*Salmo 115:1*

## RESUMO

Infecções maternas por *Schistosoma mansoni* modulam a imunidade de descendentes adultos em infecções pós-natais. Avaliou-se separadamente o efeito da amamentação ou gestação neste fenômeno através do grau de fibrose hepática, produção de citocinas Th1, Th2 e regulatórias, frequência de macrófagos produtores de NO e IL-10 e linfócitos T regulatórios em camundongos adultos, descendentes de mães esquistossomóticas, quando submetidos a infecção pós-natal. Para isto, fêmeas *Swiss webster* foram submetidas a infecção com *S. mansoni* (20 cercárias), sincronização do estro e acasalamento. Após nascimento, foi realizada a amamentação adotiva, em que descendentes 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 (MIAI). Para grupo CONTROLE utilizou-se animais nascidos e amamentados em mães não infectadas. Descendentes adultos (machos) foram infectados (80 cercárias) e 60 dias pós-infecção, os animais tiveram os esplenócitos cultivados apenas com meio de cultura ou acrescentado de SWAP (12,5 µg/mL) ou ConA (5 µg/ml). Após 24 h e 72 h os sobrenadantes foram dosados para IL-4; IL-5; IL-10; IFN-γ, TGF-β; NO e as células usadas para imunofenotipagem, com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos para CD4+FoxP3, CD16/CD32+NOS2, CD14+IL-10+. O tecido hepático dos animais foi submetido a histomorfometria. Em relação ao Controle, o grupo MI apresentou frequência aumentada de CD16/CD32+NOS2+, maior produção de NO, IL-5 e IL-10, com diminuição de IFN-γ e, em comparação ao grupo MIAI, maior número e tamanho dos granulomas. O grupo AI, em relação ao Controle, obteve maior frequência de CD16/CD32+NOS2+, maiores níveis de TGF-β, menos IL-5, NO e IFN-γ. Em relação ao MIAI, tamanho maior de granuloma. O grupo MIAI apresentou menor número e tamanho de granulomas com menor produção de IFN-γ e NO, maior de IL-10 e TGF-β, além de maior frequência de células CD4+/FoxP3+. Não houve diferença nos níveis de células CD14+/IL-10+. Em conclusão, a gestação seguida da amamentação em mães esquistossomóticas proporcionou uma diminuição da reação granulomatosa e, além da produção da IL-10 (dependente da gestação) e de TGF-β (dependente da amamentação), as células T com fenótipo regulatório são requeridas para este fenômeno.

**Palavras-chave:** Camundongos. Esquistossomose. Granuloma. Imunomodulação. Relação materno-fetal.

## ABSTRACT

Maternal infections by *Schistosoma mansoni* modulate adult offspring immunity in postnatal infections. Here, was evaluated separately the effect of breastfeeding and pregnancy in this phenomenon by the degree of hepatic fibrosis, the production of Th1, Th2 and regulatory cytokines, the expression of macrophages producing NO and IL-10, and regulatory T lymphocytes in adult offspring from schistosomotic mothers when subjected to post-natal infection. *Swiss webster* females were subjected to infection with *S. mansoni* (20 cercariae), synchronization of estrus and mating. After birth, adoptive breastfeeding was held in which offspring of infected mothers breastfed in uninfected mothers (BIM) and offspring of uninfected mothers were breastfed by infected mothers (SIM). Another group of animals born in schistosomotic mothers breastfeeding remained in their mothers (BSIM). To control group was used animals born and breastfed in uninfected mothers. Male offsprings were infected when adults (80 cercariae) and 60 days post-infection animals splenocytes were cultured with medium alone or added with SWAP (12.5 µg/ml) and ConA (5 µg/ml). After 24 h and 72 h the supernatants were assayed for IL-4; IL-5; IL-10; INF-γ; TGF-β; NO and the cells used for immunophenotyping with monoclonal antibodies bound to fluorochromes for CD4+FoxP3+, CD16/CD32+NOS2+, CD14+IL-10+. The liver tissue were subjected to histomorphometry. Compared to control, the BIM group showed increased frequency of CD16/CD32+NOS2+, increased production of NO, IL-5 and IL-10, a reduction of IFN-γ and compared to BSIM group, the greater number and size of granulomas. The SIM group compared control, had a higher frequency of CD16/CD32+NOS2+, higher TGF-β levels, less IL-5, NO and IFN-γ. Regarding BSIM, greater granuloma size. The BSIM group showed smaller number and size of granulomas with lower production of IFN-γ and NO, increased IL-10 and TGF-β, as well as higher frequency of CD4+/FoxP3+ cells. There was no difference in the levels of CD14+/IL-10+ cells. In conclusion, gestation followed by breastfeeding in schistosomotic mothers provided a reduction in granulomatous reaction, and besides the production of IL-10 (dependent on gestation) and TGF-β (dependent breast feeding) T cells with regulatory phenotype are required to this phenomenon.

**Keywords:** Granuloma. Immunomodulation. Maternal-fetal relation. Mice. Schistosomiasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Tabela 1.</b> Número de ovos por grama de fezes, número e tamanho de granulomas e fibrose hepática em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas	42
<b>Figura 1.</b> Células esplênicas cultivadas no intervalo de 24 h expressando (A) CD16/32+NOS-2+; (B) CD14+IL-10+	43
<b>Figura 2.</b> Células Células esplênicas cultivadas no intervalo de 24 h expressando CD4+FoxP3+	44
<b>Figura 3.</b> IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ e NO secretados por esplenócitos	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACF</b>	Adjuvante Completo de Freund
<b>ABTS</b>	2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid
<b>APCs</b>	<i>Antigen-presenting cell</i> (Células apresentadoras de antígenos)
<b>Arg-1</b>	Arginase 1
<b>Breg/B10</b>	Linfócitos B regulatórios
<b>CCL</b>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
<b>Cepa SLM</b>	Cepa São Lourenço da Mata
<b>COL1A1</b>	<i>Collagen type I alpha 1</i>
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>CXCL</b>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
<b>eCG</b>	Gonadotrofina Coriônica Equina
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>Fizz-1</b>	<i>Found in inflammatory zone</i>
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead box P3</i>
<b>hCG</b>	Gonadotrofina Coriônica Humana
<b>HDAC</b>	Histona desacetilases
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IgE</b>	Imunoglobulina E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (óxido nítrico sintetase induzível)
<b>M1</b>	Macrófagos classicamente ativados
<b>M2</b>	Macrófagos alternativamente ativados
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (proteína quimioatrativa de monócitos)
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> (fator estimulante de colônia de macrófagos)
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS-2</b>	Óxido nítrico sintetase 2
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
<b>PE</b>	Ficoeritrina conjugada a estreptavidina
<b>PE-Cy-5</b>	Ficoeritrina conjugada a estreptavidina - cianina
<b>PIII</b>	Fração do Antígeno solúvel do verme adulto
<b>PRRs</b>	<i>Pattern recognition receptors</i> (receptores de reconhecimento padrão)

<b>SEA</b>	<i>Soluble eggs antigen from Schistosoma mansoni</i> (Antígeno solúvel do ovo do <i>S.mansoni</i> )
<b>SjHSP60</b>	<i>Heat Shock Protein 60 of Schistosoma japonicum</i> (Proteína de choque térmico 60 de <i>Schistosoma japonicum</i> )
<b>Sm 22.6</b>	Antígeno de <i>Schistosoma mansoni</i> 22.6 kDa
<b>Sm 29</b>	Antígeno de <i>Schistosoma mansoni</i> 29 kDa
<b>STAT3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3)
<b>SWAP</b>	<i>Soluble worm antigenic preparation</i> (Antígeno solúvel do verme adulto)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
<b>Th</b>	Linfócitos T <i>helper</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumoral necrose factor alfa</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
<b>Treg</b>	Linfócitos T regulatórios
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão celular vascular)
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento do endotélio vascular)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
2.1 Imunomodulação na esquistossomose .....	20
2.2 Fibrose hepática na esquistossomose.....	22
2.3 <i>Status</i> de ativação de macrófagos na esquistossomose.....	23
2.4 Relação materno-descendente para antígenos homólogos.....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1. Objetivo geral .....	28
3.2 Objetivos específicos .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Local do estudo.....	30
4.2 Animais.....	30
4.3 Infecção materna e parasitológico de fezes .....	30
4.4 Sincronização do estro e acasalamento.....	30
4.5 Formação dos grupos de estudo.....	31
4.6 Infecção dos descendentes .....	31
4.7 Cultura de células esplênicas .....	31
4.8 Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem .....	32
4.9 Histopatologia.....	33
4.10 Dosagem das citocinas nos sobrenadantes.....	33
4.11 Dosagem de Óxido Nítrico nos sobrenadantes .....	34
4.12 Considerações éticas .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	36
EFEITO DA AMAMENTAÇÃO E GESTAÇÃO EM MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DOS DESCENDENTES ADULTOS SOB INFECCÃO PÓS-NATAL .....	36
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>APÊNDICE A.</b> .....	62

<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>85</b>

## ***INTRODUÇÃO***

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical presente em 78 países e é estimado que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (COLLEY et al., 2014). A única espécie presente no Brasil é o *S. mansoni* (FONSECA et al., 2014). A doença apresenta duas formas clínicas distintas durante seu curso, com predomínio do perfil de linfócitos T *helper* 1 (Th1) na fase aguda e predomínio do perfil de linfócitos Th2/T regulatórios (Treg) na fase crônica (SOUZA et al., 2011; GRYSEELS, 2012).

Vem sendo relatado que infecções maternas pelo *Schistosoma mansoni* podem modular a resposta imune dos descendentes, quando adultos, em infecções pós-natais. Attallah et al. (2006) e Othman et al. (2010) mostraram que a exposição pré-natal à infecção pelo *S. mansoni* diminui a intensidade da doença e as alterações histopatológicas em infecções pós-natais. Contudo, não foi evidenciado se este fenômeno deve-se à gestação ou à amamentação em mães esquistossomóticas.

O estudo do efeito do leite materno de mães infectadas, separado da gestação, demonstrou que a amamentação potencializa a produção de anticorpos, interleucina 2 (IL-2) e melhora a capacidade de ativação dos linfócitos B e de linfócitos T, sob ativação antigênica (COLLEY et al., 1999; SANTOS et al., 2010; SALES et al., 2012). Contudo, a amamentação predispõe a uma frequência basal aumentada de células Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e suprimiu a reação inflamatória em um modelo de asma alérgica (SALES et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016;). Estes dados ressaltam o caráter dicotômico do leite de mães esquistossomóticas.

Com relação à gestação em mães esquistossomóticas, o microambiente supressor gestacional (HEIKKINEN et al., 2003; BLOIS et al., 2004; SVENSSON et al., 2011) é amplificado pela propriedade intrínseca dos ovos e vermes adultos de *S. mansoni* em induzir a produção de IL-10 por células dendríticas (DCs) e linfócitos B (THOMAS; HARN 2004; AMU et al., 2010). Em conjunto, a gestação em mães infectadas parece favorecer IL-10 e um *status* supressor que é mantido por longo período durante a vida adulta, visto que em descendentes apenas gerados houve grande produção de IL-10, além de diminuir a capacidade estimulatória das células apresentadoras de antígenos (APCs) (SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2014).

Dentre estes mecanismos de modulação do granuloma, estão os macrófagos e células Treg. Os macrófagos possuem plasticidade fenotípica e funcional e dependendo do

microambiente se diferenciam em duas subpopulações distintas: a primeira, possui alta capacidade de apresentação antigênica e alta produção de NO, envolvidos na resposta imune Th1, e a outra subpopulação de macrófagos é estimulada na presença de IL-4, tendo uma produção elevada de IL-10 (BARRIE et al., 2012; GORDON; MARTINEZ, 2010; SICA; MANTOVANI, 2012). Estas células promovem o remodelamento da matriz extracelular, reparo tecidual, angiogênese, atividade imunorreguladora e anti-inflamatória. Na esquistossomose, a produção de óxido nítrico sintetase-2, IFN- $\gamma$  e IL-12 tem sido relacionada com o aumento no grau de severidade da imunopatologia em animais deficientes em IL-4 (La FLAMME et al., 2001; RUTIZKY et al., 2001; HERBERT et al., 2010).

Estudos demonstram que os ovos de *Schistosoma* são capazes de estimular células Treg (YANG et al., 2007; EL-AHWANY et al., 2012). Zhou et al. (2015) observaram que a proteína de choque térmico 60 (SjHSP60) presente no antígeno solúvel dos ovos (SEA) foi capaz de estimular células Treg TRL-4-dependente através da expansão de Tregs pré-existentes e a conversão *de novo* de células não regulatórias em Tregs com o intuito de limitar o dano imunopatológico causado no fígado do hospedeiro. Além disto, a infecção apenas com vermes machos de *S. mansoni* em camundongos, levou ao recrutamento de células Treg para o pulmão e consequente supressão da resposta alérgica anti-ovalbumina (OVA) (AMU et al., 2010). Cardoso et al. (2010) mostraram que quando camundongos foram imunizados com os antígenos *Sm* 22.6, *Sm* 29 e PIII (antígeno derivado do SWAP) houve redução do número de células inflamatórias, eosinófilos e imunoglobulina E (IgE) anti-OVA em animais infectados e asmáticos. Além disso, os níveis de citocinas Th2 nestes animais foram diminuídos, com elevação dos níveis de IL-10 e aumento da frequência de células Treg.

Portanto, teve-se por objetivo avaliar em camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas quando submetidos à infecção pós-natal o número e tamanho dos granulomas hepáticos, deposição de colágeno, o nível de citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 e IL-5) e regulatórias (TGF- $\gamma$ , IL-10) e de NO, bem como a frequência de macrófagos produtores de NO e de IL-10 e a presença de Tregs. Os resultados obtidos fornecerão informações sobre a importância do contato prévio, seja *in utero* e/ou durante amamentação, no fenômeno de imunomodulação da reação granulomatosa em indivíduos de área endêmica e, portanto, passivos de infecção quando adultos.

***REVISÃO DA LITERATURA***

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Imunomodulação na Esquistossomose

Com mais de 779 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, distribuídas em 78 países, a esquistossomose é uma doença tropical considerada de alta morbidade e mortalidade que afeta atualmente cerca de 240 milhões de pessoas em todo o mundo e, por isso, é considerada uma das mais importantes helmintíases (WHO et al., 2014). Existem seis espécies de *Schistosoma* capazes de parasitar o homem: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. malayensis* (MELO; COELHO, 2010). Porém, o *S. mansoni* é a espécie responsável por infectar pessoas nas Américas, Oriente Médio e África (COLLEY, et al., 2014). No Brasil a única espécie encontrada é o *S. mansoni* e existem cerca de 25 milhões de indivíduos em áreas de risco, dos quais quatro a seis milhões encontram-se infectados (LAMBERTUCCI, 2010). O estado de Pernambuco está entre os estados que exibem alta prevalência de pessoas infectadas e, de acordo com a Secretaria de Saúde de Pernambuco (2010), a esquistossomose é endêmica em 109 municípios (distribuídos em litoral, zona da mata e agreste) de um total de 185 municípios.

A esquistossomose apresenta duas formas clínicas bem distintas durante seu curso, a forma aguda e a forma crônica, com sintomatologias diferentes (NOUR, 2010), que acompanham mudanças na resposta imune dos hospedeiros.

A fase aguda começa a partir da penetração da forma infectante do parasita (cercárias), passando pela migração, maturação e acasalamento dos vermes. Este período caracteriza-se por sintomas inespecíficos como febre, dor de cabeça, mialgia, fadiga e hiporexia (CALDAS et al., 2008; GRYSEELS, 2012). Essas alterações ocorrem na fase pré-patente (antes da oviposição) como um reflexo da atuação de citocinas com uma resposta predominantemente Th1, com produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12 além do envolvimento de componentes do sistema imune inato (macrófagos, granulócitos e sistema complemento) após estímulo provocado pelos esquistossômulos e vermes adultos (CALDAS et al., 2008; SOUZA et al., 2011). Quando os vermes atingem a maturação sexual, eles acasalam e migram para as veias mesentéricas e ali ocorre a oviposição dos ovos. Nesta fase pós-postural, aproximadamente 20% dos ovos liberados pelas fêmeas alcançam o lúmen intestinal e são liberados nas fezes, porém 80% dos ovos não alcançam o lúmen, e devido ao fluxo sanguíneo na circulação venosa intestinal, os ovos são levados a outros órgãos como o fígado. A medida

que os ovos vão se fixando nos tecidos e se encontram maduros (miracídio vivo), eles são capazes de gerar uma mudança no perfil de resposta imune do hospedeiro, com a regulação negativa da produção e funções efectoras de mediadores pró-inflamatórios do perfil Th1 como TNF- $\alpha$ , MCP-1 e VCAM-1. Isto acontece devido a indução de granulomas inflamatórios com predomínio da resposta Th2/Treg, mediada pela secreção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. (BURKE et al., 2009; LAYLAND et al., 2010; PEARCE et al., 1991; WOLFS et al., 2014).

Além de estimular o perfil Th2, os ovos são capazes de estimular células T convencionais e células T regulatórias (Tregs) - CD4+CD25+FoxP3+, que são necessárias para a manutenção da resposta Th2 e essenciais no processo de imunomodulação presente na esquistossomose, auxiliando no controle do granuloma, protegendo o hospedeiro do agravamento da doença (McKEE; PEARCE, 2004; TAYLOR et al., 2006). Além dos ovos do parasita, tem sido evidenciada a capacidade do próprio verme adulto em estimular células Treg. Amu et al. (2010) observaram que quando camundongos foram infectados apenas com vermes machos de *S. mansoni*, houve recrutamento de células Treg para o pulmão e consequente supressão da resposta alérgica anti-OVA. Cardoso et al., (2010) mostraram que quando camundongos foram imunizados com os antígenos *Sm* 22.6, *Sm* 29 e PIII (antígeno derivado do SWAP) houve redução do número de células inflamatórias, eosinófilos e IgE anti-OVA em animais infectados e asmáticos. Além disso, os níveis de citocinas Th2 nestes animais foram diminuídos, com elevação dos níveis de IL-10 e aumento da frequência de células Treg. O PIII é capaz de interferir na imunidade antiparasita e de diminuir a reação de hipersensibilidade para os ovos de *S. mansoni* (HIRSCH, 1997).

É visto que a IL-10 sintetizada por células Th2 e Treg ajuda a suprimir o desenvolvimento da resposta Th1, reforçando assim a polarização do perfil Th2 e a transição da fase aguda para a fase crônica da doença (SADLER et al., 2003; McKEE; PEARCE, 2004). Na fase crônica, as manifestações clínicas variam a depender da localização dos ovos e da intensidade da carga parasitária, podendo se apresentar nas formas intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e até neurológica (PORDEUS et al., 2008).

Embora citocinas Th1 e Th2 sejam capazes de orquestrar o desenvolvimento do granuloma hepático (SADLER et al., 2003; HAMS et al., 2013), tem sido estudado o papel do perfil Th17 durante a doença. Foi visto que o TGF- $\beta$  e a IL-6 são requeridos para uma geração efetiva de células Th17 e a IL-23 atua na ativação e diferenciação dessas células (BETTELLI et al. 2006; NURIEVA et al. 2007). A IL-17 é a citocina marcante deste perfil pró-inflamatório, e a resposta Th17 é induzida durante a inflamação sendo importante para o

desenvolvimento total da inflamação e imunopatologia severa induzida pelos ovos do verme (DIAZ; ALLEN 2007; RUTITZKY et al., 2011).

## 2.2 Imunogênese da fibrose hepática na esquistossomose

Lesões crônicas do fígado induzem fibrose hepática (IWAISAKO et al., 2012). A fibrose é definida pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), como o colágeno (HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN 2011). Durante uma lesão há destruição tecidual, de forma que é necessário que a fibrogênese se sobrepõe à fibrólise (ANDRADE, 2008), através do aumento de colágeno e sua deposição no tecido em substituição às células danificadas.

Durante o processo de lesão hepática ocorre recrutamento de células inflamatórias que secretam fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que vão desempenhar um papel importante na fibrogênese, pois são capazes de estimular a proliferação, migração e ativação de células estreladas hepáticas (LEE; FRIEDMAN, 2011). Estas células estão envolvidas principalmente na deposição de matriz extracelular, contribuindo para a angiogênese e fibrogênese esquistossomótica (BARRIE, et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

As células estreladas hepáticas são produtoras de colágeno em áreas pericentrais (BATALLER; BRENNER, 2005) e, em estado de quiescência, estocam vitamina A e lipídio, e secretam componentes da MEC em pouca quantidade (CABALLERO-MENDONZA et al., 1999; BROWN et al., 2006). Após dano tecidual, as células estreladas hepáticas quiescentes se diferenciam em miofibroblastos, devido a ação de citocinas fibrogênicas (IWAISAKO et al., 2012). Quando ativadas, as células estreladas hepáticas liberam a vitamina A estocada e expressam marcadores como a alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), secretam IL-6 e molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e aumentam a produção de colágeno (BURT, 1993; FRIEDMAN, 1999).

Em estudo com camundongos, a presença de células estreladas hepáticas foi detectada nas bordas de granulomas seis semanas pós-infecção por *S. japonicum*, através de marcadores como desmina e  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que coincide com a mudança do perfil Th2 e modulação do tamanho do granuloma. Também foi observado um pico de ativação destas células através da expressão de  $\alpha$ -SMA em camundongos no período de oito a dez semanas de infecção. (BARTLEY et al., 2006).

Em outro estudo foi verificado células positivas para  $\alpha$ -SMA na área fibrótica de

granulomas causados por ovos de *S. japonicum*, que foi relacionado com o aumento da regulação de genes associados a fibrose hepática (COL1A1, TGF- $\beta$  e PDGF- $\beta$ ), bem como quimiocinas associadas com recrutamento de células estreladas hepáticas e macrófagos (CXCL1, CCL6, CXCL14) (BURKE et al., 2010). O granuloma é o evento patogênico de maior importância durante a fase crônica (GRYSEELS et al., 2006), composto por vários tipos celulares como neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos (REIS et al., 2001) que desempenham funções variadas com o objetivo de aprisionar e reter os antígenos dos ovos.

### **2.3 Status de ativação de macrófagos na esquistossomose**

Os macrófagos são células que possuem grande plasticidade fenotípica e funcional a depender do microambiente que se encontra (MARTINEZ et al., 2008).

Com base no *status* de ativação, os macrófagos apresentam-se em duas subpopulações distintas: Macrófagos classicamente ativados (M1), que possuem alta capacidade de apresentação antigênica e alta produção de IL-12, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e iNOS desencadeando a ativação de uma resposta imune do tipo Th1. Estas células possuem ação antiproliferativa, atividade citotóxica e são fonte importante de citocinas pró-inflamatórias. Outra subpopulação de macrófagos são os Macrófagos alternativamente ativados (M2) que são estimulados na presença de IL-4 e IL-13, IL-10 e M-CSF. Esta subpopulação está ligada a um perfil de resposta imune do tipo Th2, também promovendo o remodelamento da matriz extracelular, reparo tecidual, angiogênese, atividade imunorreguladora e anti-inflamatória. Os macrófagos M2 secretam IL-10, CCL2, CCL17 e CCL22, além de expressar os genes Arg-1, Fizz-1 e Ym-1 (GORDON; MARTINEZ, 2010; SATOH et al., 2010; KRAUSGRUBER et al., 2011; BARRIE et al., 2012; SICA; MANTOVANI, 2012).

Foi visto que a ativação excessiva de macrófagos M1 pode causar inflamação crônica e danos nos tecidos, de forma que macrófagos M1 têm sido implicados na patogênese de diversas condições inflamatórias, incluindo aterosclerose, diabetes e glomerulonefrite (MANTOVANI et al., 2013; WYNN et al., 2013).

Durante o curso natural da patologia na esquistossomose, macrófagos M1 vão sendo substituídos por macrófagos alternativamente ativados, de forma que essas células podem auxiliar na fibrogênese tanto pela supressão de citocinas anti-fibrogênicas como pela atuação da enzima arginase-1 (WILSON et al., 2007; GORDON; MARTINEZ, 2010). Sabe-se que a expressão de Arg1 é capaz de hidrolisar L-arginina em ureia e L-ornitina. Por sua vez, a L-ornitina pode ser metabolizada até prolina, aminoácido necessário para a produção de

colágeno. Porém, a exacerbação da resposta Th2/M2 pode gerar asma e fibrose hepática (BARRON et al., 2011; MOREIRA; HOGABOAM, 2011). Em conjunto, as células estreladas hepáticas e os macrófagos alternativamente ativados tem grande importância durante a fibrogênese (PEREIRA et al., 2013).

Em estudo experimental, Pesce et al. (2009) demonstraram que animais deficientes para Fizz-1 (*Found in inflammatory zone-1*) quando infectados por *S. mansoni* tiveram exacerbação da reação granulomatosa e desenvolvimento de fibrose, mostrando que o Fizz-1 é necessário para regulação negativa da resposta Th2. Interessantemente, os helmintos são capazes de induzir células T regulatórias e macrófagos alternativamente ativados (M2), necessários para assegurar a sobrevivência do hospedeiro em conjunto com o perfil de resposta Th2 através da regulação negativa da resposta Th1 (HERBERT et al., 2004; KREIDER et al., 2007).

Zhu et al. (2014), através de estudo *in vitro* com macrófagos peritoneais purificados provenientes de camundongos infectados com *S. japonicum*, observaram que, quando as células foram estimuladas com os antígenos do verme adulto (SWAP), houve aumento do percentual de macrófagos M1 com elevação dos níveis de IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS. Já o estímulo do SEA provocou um aumento do percentual de macrófagos M2, IL-10 e Arg-1 (JOSHI et al., 2008; WOLFS 2014). Herbert et al. (2004) mostraram que durante a infecção por *S. mansoni*, macrófagos M2 são necessários para suprimir respostas do tipo Th1/M1.

## **2.4 Relação materno-descendente para antígenos homólogos**

As condições imunológicas geradas durante a gestação e o aleitamento são capazes de promover a manutenção do feto e sua proteção, mas o grau de competência imune dos descendentes pode ser alterado devido a exposição materna a alérgenos, citocinas e processos infecciosos (HERZ et al., 2000; FUSARO et al., 2007). Friedman et al. (2007) relataram que existe em média 10 milhões de gestantes e 40 milhões de mulheres em idade reprodutiva que se encontram infectadas por alguma das espécies de *Schistosoma*. Assim, diferentes estudos têm sugerido que a infecção materna por *S. mansoni* teria um papel importante no desenvolvimento da imunidade do descendente, favorecendo o controle da doença em indivíduos de área endêmica.

A passagem transplacentária e pelo leite materno de antígenos do *S. mansoni* e anticorpos antiparasita foi descrita em humanos (SANTORO et al., 1977) e em camundongos (HASSAN et al., 1997). Lenzi et al. (1987), estudando camundongos recém-nascidos e ao

mesmo tempo lactentes de mães infectadas pelo *S. mansoni*, observaram a transferência de anticorpos contra antígenos de cercárias, de ovos e de vermes adultos, através da avaliação do soro dos descendentes. Attallah et al. (2003) detectaram o antígeno 63-kD (identificado em diferentes fases do ciclo do *S. mansoni*) no leite, no soro e no cordão umbilical de mães infectadas esquistossomóticas.

A exposição aos anticorpos e antígenos, durante o período pré-natal ou a amamentação, esteve associada com a modulação da resposta imune dos descendentes para antígenos homólogos, ou seja, em infecções pós-natais (HANG et al., 1974; COLLEY et al., 1999; MONTESANO et al., 1999; ATTALLAH et al., 2003; CALDAS et al., 2008; ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010). Attallah et al. (2006) observaram que em animais nascido seguidos de amamentação em mães esquistossomóticas houve níveis de IgG, tamanho e número de granulomas hepáticos, bem como recuperação de vermes reduzidos. Othman et al. (2010) corroboram os achados de que a exposição pré-natal à infecção pelo *S. mansoni* diminui a intensidade da doença e as alterações histopatológicas em infecções pós-natais. Estes autores também observaram que os níveis de expressão dos genes de IL-12 e de TGF- $\beta$ , citocinas regulatórias, foram significativamente maiores nos animais expostos à infecção materna (pré-natal). Entretanto, estas investigações não elucidaram se a proteção granulomatosa é desencadeada pela amamentação ou pela gestação.

Sabe-se que o leite de mães esquistossomóticas possui efeito dicotômico, com potencial tolerogênico ou estimulador (FIELD, 2005; BLEWETT et al., 2008). O estudo do efeito do leite materno de mães infectadas, separado da gestação, demonstrou que a amamentação potencializa a produção de anticorpos e IL-2 (COLLEY et al., 1999; SANTOS et al., 2010). Em estudos *in vitro*, os linfócitos B imaturos cultivados com o leite de mães esquistossomóticas, demonstraram uma maior expressão das moléculas CD40 e CD80, favorecendo o status de ativação, já que neste mesmo estudo foi demonstrada uma maior frequência de células CD3+CD28+ e uma menor frequência de células CD4+CTLA-4+, desse modo favorecendo a interação CD28:CD80. Contudo, a amamentação predispôs a uma frequência basal aumentada de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e suprimiu a reação inflamatória em um modelo de asma alérgica (SALES et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016;). Antígenos relacionados ao parasita, e o LNFP-III, componente do leite materno, estão associados com a ativação, proliferação, síntese de IL-10 e a geração de um subtipo de linfócitos B com função regulatória (CD5<sup>+</sup>/CD1d<sup>+</sup>) (THOMAS; HARN, 2004; MANGAN, et al., 2004; TIAN, et al., 2015). Sabendo que os antígenos parasitários são capazes de levar a indução de Treg, é possível que antígenos parasitários presentes no leite e

em associação com o microambiente supressor da mucosa intestinal (WEINER et al., 2011; (EL-AHWANY et al., 2012) possam amplificar esta propriedade.

Contudo, Colley et al. (1999) demonstraram que a administração de anticorpos anti-SEA, durante o período de amamentação, foi capaz de induzir nos descendentes adultos e infectados pelo *S. mansoni* diminuição do perfil de resposta Th2, com menor granuloma e melhora na produção de anticorpos anti-SEA. Em modelo experimental para asma, quando as fêmeas foram acasaladas durante a fase Th1 da infecção por *S. mansoni*, o IFN- $\gamma$  materno conferiu a prole proteção contra asma alérgica (STRAUBINGER et al., 2014).

Com relação ao microambiente uterino, o microambiente gestacional tem sido caracterizado como um compartimento imunoinibitório, principalmente pela produção de IL-10 por células dendríticas (DCs) e macrófagos *in utero*/tecidos de interação placentária (HEIKKINEN et al., 2003; BLOIS et al., 2004). Macrófagos (M2) são induzidos na mucosa uterina para favorecer a tolerância fetal, via IL-10 (GUSTAFSSON et al., 2006; SVENSSON et al., 2011), e estão relacionados com o remodelamento tecidual (GORDON; MARTINEZ, 2010). Em relação a gestação em mães esquistossomóticas, a propriedade intrínseca dos antígenos de *S. mansoni* (ovos e vermes adultos) de induzir a produção de IL-10 por células apresentadoras de antígenos (APCs) já foi demonstrada (THOMAS; HARN 2004; AMU et al., 2010). A gestação parece favorecer a produção de IL-10 e o status supressivo que é mantido a longo prazo na vida adulta, visto que em descendentes apenas gerados houve grande produção de IL-10, além de diminuir a capacidade estimulatória de células dendríticas.

Com base no exposto, objetivou-se avaliar em camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas quando submetidos à infecção pós-natal o número e tamanho dos granulomas hepáticos, deposição de colágeno, o nível de citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 e IL-5) e regulatórias (TGF- $\gamma$ , IL-10) e de NO, bem como a frequência de macrófagos produtores de NO e de IL-10 e a presença de Tregs. Os resultados obtidos fornecerão informações sobre a importância do contato prévio, seja *in utero* e/ou durante amamentação, no fenômeno de imunomodulação da reação granulomatosa em indivíduos de área endêmica e, portanto, passivos de infecção quando adultos.

***OBJETIVOS***

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Analisar em camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni* submetidos à infecção pós-natal, o número e tamanho de granulomas hepáticos, deposição de colágeno, o perfil de linfócitos T efetores e regulatórios e produção de NO, bem como a expressão de CD14 e IL-10, CD16/CD32 e NOS2 na população de macrófagos.

#### 3.2 Objetivos específicos

Em camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni* versus mães não infectadas objetivou-se estudar a resposta imune para antígenos homólogos (infecção pós-natal) e resposta imune sistêmica (estimulador policlonal):

Comparar as análises histopatológicas do tecido hepático para quantificação e determinação do tamanho dos granulomas e avaliação da deposição de colágeno.

Comparar a produção das citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$ ) produzidas *ex vivo* por esplenócitos em resposta ao SWAP e mitógeno.

Comparar o NO produzido por esplenócitos *ex vivo*, em resposta ao SWAP e mitógeno.

Comparar em cultura de células esplênicas a frequência de linfócitos com fenótipo regulatório (CD4, Foxp3) e a frequência de macrófagos produtores de NO sintetase (CD16/CD32+/NOS-2+) ou IL-10 (CD14+/IL-10+).

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Local do estudo**

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

### **4.2 Animais**

Foram utilizados 15 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com quatro semanas de idade para infecção com *S. mansoni* e 10 animais não infectados utilizados como controle. Os animais foram fornecidos e mantidos em boas condições de saúde e nutrição no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

### **4.3 Infecção materna e parasitológico de fezes**

A infecção foi realizada por via percutânea, com 20 cercárias de *S. mansoni*/animal recentemente eliminadas por caramujos infectados pela espécie *Biomphalaria glabrata* e infectados por miracídios da cepa BH (Belo Horizonte), mantidos no Moluscário da disciplina de Parasitologia do departamento de Medicina Tropical (UFPE) pela equipe do Setor de Imunologia do LIKA/UFPE. Após 45 dias de infecção, os camundongos fêmeas foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram confeccionadas três lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de Kato-Katz (KATZ et al., 1972) para confirmação da infecção e estimar o número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

### **4.4 Sincronização do estro e acasalamento**

No 60º dia de infecção das 15 fêmeas, o estro das fêmeas (infectadas e não infectadas)

foi sincronizado (FOWLER; EDWARDS, 1957; WANG et al., 2001) através da administração de hormônios. No primeiro dia foi administrado 5 UI (100 µL) de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) e no terceiro dia 5 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). Posteriormente, as fêmeas foram acasaladas (duas fêmeas para um macho) e foi observada a formação do *plug* vaginal para confirmação do acasalamento. O mesmo procedimento foi realizado para as fêmeas não infectadas.

#### **4.5 Formação dos grupos de estudo**

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 e amamentados em fêmeas infectadas (MIAI). Para o grupo controle foram utilizados animais nascidos/amamentados em mães não infectadas (CONTROLE).

#### **4.6 Infecção dos descendentes**

Aos 45 dias de vida os filhotes machos foram selecionados e infectados por via percutânea com 80 cercárias de *S. mansoni*/animal. A obtenção das cercárias e infecção dos descendentes foi semelhante a realizada para a infecção materna, descrita no tópico 4.3.

#### **4.7 Cultura de células esplênicas**

Foram retirados os baços dos descendentes dos diferentes grupos de estudo, 60 dias pós-infecção. As suspensões de células esplênicas foram obtidas assepticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640. Após centrifugação (400 g por 10 min./4°C), as hemácias provenientes do órgão foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 20 segundos. As células foram ressuscitadas em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma-Aldrich® Chemical, St. Louis, Mo., USA), mantidas no gelo por 5 min. para deposição do estroma e, após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo a contagem das células e o teste de viabilidade realizados com o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10% (90 µL de Azul de Trypan a 10% + 10 µL de

suspensão de células). As células foram cultivadas nos intervalos de 24 h ( $5 \times 10^6$  células/tubo) para posterior imunofenotipagem e 72 h ( $12 \times 10^6$  células/tubo) para dosagem de citocinas em sobrenadante, em tubos de cultura de 8 mL e submetidas a estímulo antigênico com SWAP ( $12,5 \mu\text{g/mL}$ ) e ConA ( $5 \mu\text{g/mL}$ ). Os tubos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  em estufa umidificada de  $\text{CO}_2$  a 5%.

#### **4.8 Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem**

Após 24 horas de cultivo foram adicionados a cada tubo, contendo as suspensões de células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos,  $5 \mu\text{L}$  de Golgi Stop (para cada  $5 \times 10^6$  células), agitados em vórtex e devolvidas a estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por um intervalo de quatro horas. Passado este período de incubação, as células foram lavadas com  $6,0 \text{ mL}$  de PBS  $0,01\text{M}$  + 5% de SBF estéril gelado, em seguida foram agitadas em vórtex e centrifugadas a  $400 \text{ g}$  por 10 minutos sob a temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS  $0,01\text{M}$  + 5% de SBF estéril, no mesmo volume da cultura inicial e distribuídas nos tubos de citometria, sendo  $100 \mu\text{L}$  por tubo com concentração final de  $1 \times 10^6$  células por tubo. Realizou-se a marcação celular com os anticorpos de superfície (anti-CD4; anti-CD14; anti-CD16/CD32), sendo acrescentado ao tubo  $0,5 \mu\text{L}$  de cada anticorpo em ambiente escuro, seguido de agitação em vórtex e incubação por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  no escuro. Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas uma vez com  $1 \text{ mL}$  de PBS  $0,01\text{M}$  + 5% de SBF estéril gelado com agitação em vórtex e posterior centrifugação a  $400 \text{ g}$  por cinco minutos. Depois disso, o sobrenadante foi descartado e acrescentado  $200 \mu\text{L}$  de tampão de fixação e as células foram incubadas por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  no escuro. Após este tempo, foi realizada nova lavagem com  $1 \text{ mL}$  de PBS  $0,01\text{M}$  + 5% de SBF estéril gelado. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado aos tubos  $500 \mu\text{L}$  da solução de permeabilização, diluída quatro vezes e incubados por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  no escuro. Posteriormente as células foram lavadas com  $1 \text{ mL}$  de PBS  $0,01\text{M}$  + 5% de SBF estéril gelado. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se a cada tubo  $1 \mu\text{L}$  dos anticorpos para marcação intracelular (Foxp3; IL-10; NOS2) e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente em ambiente escuro. Uma nova lavagem foi realizada com  $1 \text{ mL}$  por tubo da solução de permeabilização diluída 10x em água destilada estéril, seguida de agitação no vórtex e centrifugação em  $400 \text{ g}$  por cinco minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Depois o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se a cada tubo  $300 \mu\text{L}$  da solução de fixação para posterior leitura em citômetro de fluxo. Os eventos ( $10.000$  para linfócitos e  $1.000$  para macrófagos)

foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest™ Pro (BD-Pharmingen®, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos pela média dos percentuais de células duplo-marcadas obtidos no *pool* dos baços de todos os animais em cada grupo.

#### 4.9 Histomorfometria

Após a eutanásia dos camundongos, fragmentos dos 3 lóbulos hepáticos foram selecionados, fixados em formalina tamponada. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos (4 µm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan). Os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e também foram corados pela técnica de Tricômico de Masson (JUNQUEIRA et al., 1979), para a avaliação do número e tamanho dos granulomas e deposição de colágeno.

#### 4.10 Dosagem das citocinas nos sobrenadantes

Os sobrenadantes da cultura das células esplênicas, sob os diferentes estímulos descritos no tópico 4.7, foram coletados. Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10, INF- $\gamma$  e TGF- $\beta$  foram determinados por ELISA sanduíche, nos sobrenadantes com intervalo de cultivo de 24 h para a dosagem de IL-4 e IL-5 e 72 h para a dosagem das demais citocinas. Placas de ELISA (2595, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura específico para cada citocina e incubadas à temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida, foram bloqueadas com uma solução de PBS-T (Tampão salina fosfato mais 0.05% de Tween 20) e 10% SBF (WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil), por 60 minutos. Após lavagem e distribuição das amostras, as placas foram incubadas a 4°C por 18 horas, e após esse período, foram lavadas com PBS-T para posterior adição do segundo anticorpo biotilado, específicos para as diferentes citocinas, diluído com PBS-T acrescido de 0,1% de soro albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich® Chemical, St. Louis, Mo., USA). Em seguida à incubação e temperatura ambiente por uma hora, cada placa foi novamente lavada por três vezes com PBS-T e, então, adicionada o conjugado enzimático (estreptavidina marcada com peroxidase, Sigma-Aldrich® Chemical, St. Louis, Mo., USA) em uma proporção de 1:6000 em PBS-T contendo BSA 0,1%. Após incubação à temperatura ambiente, as placas foram

novamente lavadas com PBS-T e a reação revelada pela adição do substrato contendo  $H_2O_2$  e o cromógeno ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma-Aldrich® Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH = 5,5 . A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada a 405 nm em leitor de ELISA (BIO RAD® modelo 2550). A dosagem de TGF- $\beta$  foi feita através do kit da Invitrogen™, seguindo as especificações do fabricante para ativação do TGF- $\beta$  com tratamento com HCl e NaOH. As concentrações das citocinas nas amostras foram calculadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.0, a partir de curvas-padrão obtidas utilizando concentrações conhecidas das citocinas recombinantes, com limites de detecção de 0,076 ng/mL para IL-4, 0,15 ng/mL para IL-5, 0,61 ng/mL para IFN- $\gamma$ , 0,31 ng/mL para IL-10, 62,5 pg/mL para TGF-b. Os resultados foram apresentados como média aritmética + desvio padrão da média.

#### **4.11 Dosagem de Óxido Nítrico nos sobrenadantes**

Os sobrenadantes da cultura das células esplênicas no intervalo de 72h, sob os diferentes estímulos descritos no tópico 4.7, foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de Óxido Nítrico (GREEN et al., 1982). Para medir a produção de nitrito, alíquotas de 50  $\mu$ L das amostras a serem dosadas foram incubadas com 50  $\mu$ L dos reagentes (25  $\mu$ L da solução de sulfanilamida 1% e 25  $\mu$ L de solução de N-naphthylethylenediamine dihydrochloride 0,1% em 2,5% de  $H_3PO_4$ ) à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura foi realizada em absorbância de 550 nm, em leitor de ELISA com limite de detecção de 1,56  $\mu$ M/mL.

#### **4.12 Considerações éticas**

Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil (CEUA-CPqAM/FIOCRUZ) e encontram-se de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) os quais são adotados como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA- CPqAM/FIOCRUZ (ANEXO A).

***RESULTADOS***

## 5 RESULTADOS

### EFEITO DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO EM CAMUNDONGOS ESQUISTOSSOMÓTICAS NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DOS DESCENDENTES ADULTOS SOB INFECÇÃO PÓS-NATAL

#### INTRODUÇÃO

A esquistossomose é endêmica em 78 países e estima-se que pelo menos 261 milhões de pessoas se encontram infectadas no mundo (WHO, 2015). Granulomas ricos em macrófagos e eosinófilos, induzidos pelo dos ovos retidos especialmente no tecido hepático, caracterizam a infecção. Nesta fase, há predominância da resposta Th2 com elevação dos níveis de IL-4, IL-5, IL-13 que regula negativamente a resposta Th1 induzida pelos vermes adultos (PEARCE et al., 1991; BURKE et al., 2009; FAIRFAX et al., 2012). Esta resposta é também associada com a estimulação de células T regulatórias (Tregs) e IL-10, que controla a reação granulomatosa ao redor dos ovos no hospedeiro (MCKEE; PEARCE 2004; TAYLOR et al., 2006).

Apesar da indução da resposta granulomatosa, casos graves são menos frequentes em áreas endêmicas (CALDAS et al., 2008) e este fenômeno vem sendo atribuído à infecção esquistossomótica materna que parece modular negativamente as infecções pós-natais. Attallah et al. (2006) reportaram uma redução da reação granulomatosa em animais nascidos e amamentados em mães maciçamente infectadas e Othman et al. (2010) corroboraram estes achados e mostraram o aumento da expressão gênica de IL-12 e TGF- $\beta$ .

O estudo do efeito do leite materno de mães infectadas, separado da gestação, demonstrou que a amamentação potencializa a produção de anticorpos, IL-2 e melhora a capacidade de ativação dos linfócitos B e de linfócitos T, sob ativação antigênica (COLLEY et al., 1999; SANTOS et al., 2010; SALES et al., 2012). Contudo, a amamentação predispõe a uma frequência basal aumentada de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) e suprimiu a reação inflamatória em um modelo de asma alérgica (SALES et al., 2012; SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016;). Estes dados ressaltam o caráter dicotômico do leite de mães esquistossomóticas.

Com relação à gestação em mães esquistossomóticas, o microambiente supressor gestacional (BLOIS et al., 2004; SVENSSON et al., 2011) é amplificado pela propriedade intrínseca dos ovos e vermes adultos em induzir a produção de IL-10 por células dendríticas

(DCs) e linfócitos B (THOMAS; HARN 2004; AMU et al., 2010). Em conjunto, a gestação em mães infectadas parece favorecer IL-10 e um *status* supressor que é mantido a longo prazo, visto que em descendentes apenas gerados houve grande produção de IL-10, além de diminuir a capacidade estimulatória das APCs.

Dentre os mecanismos de resposta imune celular, destaca-se a ação dos macrófagos. Com base no *status* de ativação, os macrófagos apresentam-se em duas subpopulações: a primeira, possui alta capacidade de apresentação antigênica e alta produção de NO, envolvidos na resposta imune Th1, e a outra subpopulação de macrófagos é estimulada na presença de IL-4, tendo uma produção elevada de IL-10 (BARRIE et al., 2012; GORDON; MARTINEZ, 2010; SICA; MANTOVANI, 2012). Estas células promovem o remodelamento da matriz extracelular, reparo tecidual, angiogênese, atividade imunorreguladora e anti-inflamatória. Na esquistossomose, a produção de óxido nítrico sintetase-2, IFN- $\gamma$  e IL-12 tem sido relacionada com o aumento no grau de severidade da imunopatologia em animais deficientes em IL-4 (La FLAMME et al., 2001; RUTIZKY et al., 2001; HERBERT et al., 2010).

Além disso, durante a infecção por *S. mansoni* ocorre a ativação de células Treg, produtoras de IL-10 e TGF- $\beta$ . Estas células são geradas de maneira a regular/modular as respostas Th1 e Th2 e diminuir a patologia na esquistossomose, garantindo a sobrevivência do hospedeiro à medida que a infecção toma um curso crônico (MCKEE; PEARCE 2004; TAYLOR et al., 2006). Amu et al. demonstraram que em camundongos infectados apenas com vermes machos de *S. mansoni*, houve recrutamento de células Treg para o pulmão e consequente supressão da resposta alérgica anti-OVA. Cardoso et al., (2010) mostraram que quando camundongos foram imunizados com os antígenos *Sm* 22.6, *Sm* 29 e PIII (antígeno derivado do verme adulto) houve redução do número de células inflamatórias, eosinófilos e IgE anti-OVA em animais infectados e asmáticos. Além disso, os níveis de citocinas Th2 nestes animais foram diminuídos, com elevação dos níveis de IL-10 e aumento da frequência de células Treg. De fato, foi observado que animais imunizados com macrófagos pulsados com PIII, apresentaram menor reação granulomatosa associada a uma diminuição da resposta imune mediada por células (GUSTAVSON et al., 2002).

Com base no exposto, objetivou-se avaliar em camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas quando submetidos à infecção pós-natal o número e tamanho de granulomas hepáticos, a deposição de colágeno, o nível de citocinas do perfil Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 e IL-5) e regulatórias (TGF- $\gamma$ , IL-10) e de NO, bem como a frequência de macrófagos produtores de NO e de IL-10 e a presença de Tregs. Desta forma foi

possível observar que a gestação seguida da amamentação em mães esquistossomóticas é mais eficiente em controlar a reação granulomatosa. Apenas a amamentação foi capaz de prejudicar as respostas Th1 e Th2, com altos níveis de TGF- $\beta$ , de maneira que células Treg parecem desempenhar um papel crucial neste fenômeno.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais e Infecção materna 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 BH 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 (100  $\mu$ L) do hormônio eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) e, após 48 horas, injeção de 5UI (100  $\mu$ L) de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana). 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 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 (nº 70/2014) e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **Grupos de estudo e protocolo de infecção dos descendentes**

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 (n=7), com seis semanas de idade, foram infectados com 80 cercárias da cepa BH de *S. mansoni* e no 45º dia de infecção, houve a confirmação da infecção pelo método de Kato-

Katz.

### **Cultura celular**

Foram retirados os baços dos descendentes (60 dias pós-infecção), nos diferentes grupos, após eutanásia por deslocamento cervical. Suspensões de células esplênicas foram obtidas assepticamente em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich® Chemical) suplementado com HEPES (10 mM), 2-mercaptoetanol (0,05 mM), 216 mg de L-glutamina, gentamicina (50 mg/L) e 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma-Aldrich® Chemical). As células de cada grupo (n=7) foram cultivadas numa concentração final de  $5 \times 10^6$  (24 h) e  $12 \times 10^6$  (72 h) células/tubo em tubos de 8 mL e estimuladas com SWAP (12,5 µg/mL) ou Concanavalina A (Con-A) (5 µg/mL) a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Os sobrenadantes foram coletados após 24 ou 72h e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção de IL-4 e IL-5 (24 h), IFN-γ, IL-10, TGF-β e NO (72 h). As células cultivadas por 24 h foram recuperadas e marcadas para detecção de células CD4+FoxP3+, CD16/32+NOS-2+, CD14+IL-10+.

### **Dosagem de Citocinas e Óxido Nítrico**

Os níveis das citocinas foram determinados por ELISA sanduíche utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: para IL-4, 11B11 e BVD6-24G2 biotilado; IL-5, 39D10 e 5A10 biotilado; para IL-10, C252-2A5 e SXC-1 biotilado; para IFN-γ, AN18 e XGM1.2 biotilado; e para TGF-β 6L8/1 e 7B8/1 biotilado. Ocorreu adição de estreptoavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich® Chemical) 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A dosagem de TGF-β foi realizada através de kit (Invitrogen™) e foi feita a ativação do TGF-β de acordo com as especificações do fabricante. As placas foram lidas (405 nm) no leitor de ELISA. As quantidades de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas com base nas curvas-padrões dos recombinantes purificados das citocinas (rIL-4, rIFN-γ, rIL-5, rIL-10 ou rTGF-β), com limites de detecção de 0,076 ng/mL para IL-4, 0,15 ng/mL para IL-5, 0,61 ng/mL para IFN-γ, 0,31 ng/mL para IL-10, 62,5 pg/mL para TGF-β.

Como medida da produção de Óxido Nítrico, foi realizada a dosagem de nitrito no sobrenadante de cultura celular pela reação com o reagente de Griess, (GREEN et al., 1982). A leitura foi realizada em absorbância de 550 nm, em leitor de ELISA com limite de detecção de 1,56 µM/mL.

### **Marcação celular**

As células esplênicas dos descendentes de todos os grupos foram submetidas à dupla-marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, específicos para presença de células CD4+FoxP3+, CD16/32+NOS-2+, CD14+IL-10+. As células foram ajustadas para uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL com PBS+SBF 5% estéril e as marcações foram realizadas aos pares com adição de 1  $\mu$ L dos anticorpos de marcação: FoxP3 (PE-Cy-5), CD4 (FITC), CD16/32 (FITC) e NOS-2 (APC), CD14 (FITC) e IL-10 (PE). A aquisição das células duplamente marcadas e a análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Pharmingen<sup>®</sup>, 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.

### **Estudo histomorfométrico do tecido hepático**

No 60º dia pós-infecção, os animais de todos os grupos tiveram os fígados coletados após anestesia e eutanásia, e foram fixados em formalina tamponada a 10%. Três fragmentos do fígado em corte transversal de três lóbulos distintos foram recolhidos a partir de cada animal. Os cortes histológicos (4  $\mu$ m) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan) e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômio de Masson (TM; seletivo para colágeno) para estudo morfométrico. O estudo foi realizado utilizando ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para medir o diâmetro médio (micrômetro -  $\mu$ m) de granulomas, com posterior cálculo da área ( $\mu$ m<sup>2</sup>), e intensidade da coloração azul (específico para colágeno) em histograma. As análises foram realizadas em imagens obtidas aleatoriamente em 10-20 campos/animal (100x). O estudo histomorfométrico foi realizado em sete animais/grupo.

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados através da comparação entre os diferentes grupos de animais utilizando-se uma análise de variância para dados paramétricos (ANOVA), seguida pela comparação múltipla segundo o método de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado o método de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. O

programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software®, San Diego, CA, USA) e foram considerados significativos valores de  $p < 0.05$ . Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados e foi apresentado um estudo representativo dos três estudos independentes.

## RESULTADOS

*Animais nascidos e amamentados em mães infectadas apresentaram redução do número e tamanho dos granulomas hepáticos*

Para verificar a intensidade da infecção e da reação granulomatosa nos animais gerados (MI) ou que receberam leite de mães infectadas (AI), a contagem de ovos nas fezes e a análise histomorfométrica do tecido hepático foi realizada 60 dias pós-infecção. As análises também foram realizadas nos animais nascidos/amamentados em mães infectadas (MIAI) ou não infectadas (CONTROLE) (TABELA 1; APÊNDICE A). Desta forma, observou-se que não houve diferença na contagem de ovos entre os grupos estudados. Entretanto, o grupo MIAI possui, significativamente menor número e tamanho granulomas, com semelhante quantidade de colágeno, em relação ao grupo Controle. O grupo MI apresentou mais e maiores granulomas, quando comparado ao grupo MIAI. O tamanho do granuloma no grupo AI foi maior em relação ao grupo MIAI.

**Tabela 1.** Número de ovos por grama de fezes, número e tamanho de granulomas e fibrose hepática em camundongos infectados por *S. mansoni* nascidos e/ou amamentados em mães esquistossomóticas

Grupos <sup>a</sup>	Kato-Katz (opg) <sup>b</sup>	Número de granulomas hepáticos <sup>c</sup>		Tamanho do granuloma <sup>d</sup> (TM)	Colágeno (TM) <sup>e</sup>
		HE	TM		
Controle	80 ± 13,86	4,56 ± 0,44	4,05 ± 0,15	97769 ± 6284	136,6 ± 3,78
MI	100 ± 27,68	4,75 ± 0,22*	4,15 ± 0,23*	101688 ± 569*	143,4 ± 1,86
AI	119,2 ± 30,39	3,10 ± 0,15	2,97 ± 0,28	94579 ± 6255*	138,7 ± 2,85
MIAI	96 ± 9,79	2,12 ± 0,25 <sup>#</sup>	2,87 ± 0,16 <sup>#</sup>	70015 ± 3645 <sup>#</sup>	146,3 ± 2,49

*a*- Camundongos *Swiss Webster* infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* dos grupos Nascido (MI), amamentados (AI) e nascidos/amamentados (MIAI) em mães infectadas. Sessenta dias pós-infecção, os fígados foram submetidos a morfometria. O fígado de camundongos nascidos e amamentados em mães não infectadas (Controle) foram analisados nas mesmas condições [coloração de hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson (TM)]; *b* - mediana ± erro padrão (SE) do número de ovos por grama de fezes (OPG). A análise foi realizada 48 dias após a infecção; *c* - mediana ± SE de número de granulomas hepáticos por campo; *d* - mediana ± SE do tamanho (área de secção) de granulomas hepáticos em  $\mu\text{m}^2$ . Análise de 10 granulomas por animal (n = 7), num total de 70 granulomas/grupo; *e*- Colágeno: mediana ± SE da proporção de colágeno obtido a partir do software ImageJ<sup>®</sup>; #  $p < 0,05$  em comparação com o grupo de Controle; \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo MIAI, através do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

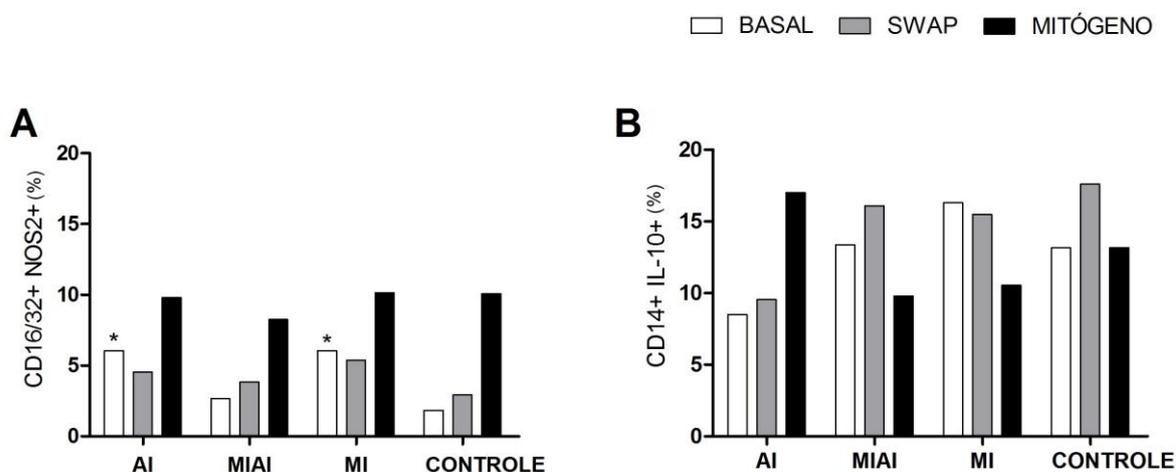
*Avaliação de macrófagos produtores de NO e IL-10 em descendentes de mães esquistossomóticas, quando infectados na vida adulta.*

A avaliação de macrófagos produtores de NO e IL-10 foi realizada pela marcação de células CD16/CD32+/NOS-2+ e CD14+/IL-10+, respectivamente, frente ao estímulo com SWAP ou Con A. A análise da frequência destas células em cultura sem estímulo também foi realizada (basal).

Ao analisar as células CD16/CD32+ expressando NOS-2, quando cultivadas sem estímulo (Figura 1A), a frequência foi três vezes maior destas células nos grupos de animais AI e MI em relação ao grupo CONTROLE e o grupo MIAI (AI = 6,0%, MIAI = 2,7%, MI = 6,0%, CONTROLE = 1,8%). Para as células dos grupos experimentais estimuladas com SWAP, não houve diferença na frequência destas células em comparação ao grupo CONTROLE (AI = 4,5%, MIAI = 3,8%, MI = 5,5%, CONTROLE = 2,9%). Sob estímulo com mitógeno, não houve significância na frequência das células CD16/CD32+/NOS-2+ dos grupos experimentais em comparação ao grupo controle (AI = 9,8%, MIAI = 8,3%, MI = 10,2%, CONTROLE = 10,0%).

A frequência de células CD14+/IL-10+ nos descendentes adultos não apresentou

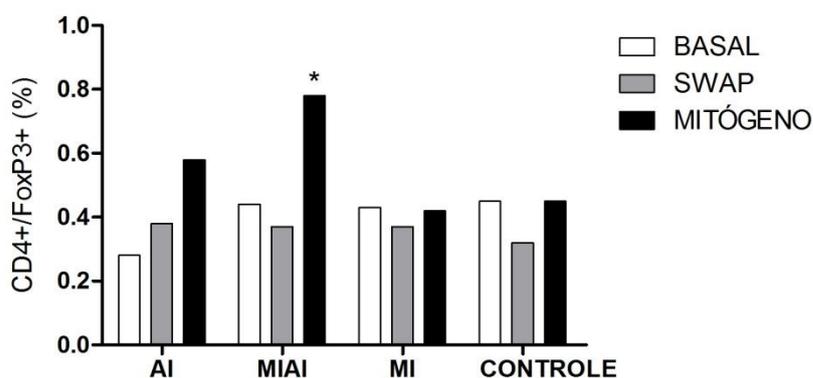
diferença entre os grupos frente aos diferentes estímulos (FIGURA 1B).



**Figura 1.** Células esplênicas cultivadas no intervalo de 24 h expressando (A) CD16/32+NOS2+; (B) CD14+IL-10+. Camundongos *Swiss webster* infectados (80 cercárias) nascidos de mães infectadas (MI), amamentados em mães infectadas (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI), com sete semanas de vida, tiveram os esplenócitos cultivados em diferentes condições: Ausência (BASAL), presença do SWAP (12,5 µg/mL) ou de Concanavalina A (MITÓGENO) (5 µg/mL). As células foram marcadas com anticorpos conjugados a substâncias fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados representam a média da frequência de células esplênicas duplo-marcadas para sete animais/grupo. Os resultados apresentados são de um estudo representativo dos três estudos independentes. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo CONTROLE.

*Frequência de células CD4+/Foxp3+ em descendentes de mães esquistossomóticas, quando infectados na vida adulta*

Foi realizada a marcação de células que expressavam as moléculas CD4 e FoxP3 e analisadas por citometria de fluxo nos diferentes grupos de estudo. Na Figura 2, em relação ao grupo CONTROLE, observou-se uma frequência basal semelhante entre os grupos experimentais (AI = 0,3%, MIAI = 0,4%, MI = 0,4%, CONTROLE = 0,4%). O mesmo foi verificado para o estímulo com SWAP (AI = 0,4%; MIAI = 0,4%, MI = 0,4%; CONTROLE = 0,3%), porém para o estímulo com ConA houve estatisticamente maior frequência destas células para o grupo MIAI, cerca de duas vezes a mais comparada ao CONTROLE (AI = 0,5%; MIAI = 0,8%; MI = 0,4%; CONTROLE = 0,4%) (FIGURA 2).



**Figura 2.** Células esplênicas cultivadas no intervalo de 24 h expressando CD4+FoxP3+. Camundongos *Swiss webster* infectados (80 cercárias) nascidos de mães infectadas (MI), amamentados em mães infectadas (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI), com sete semanas de vida, tiveram os esplenócitos cultivados em diferentes condições: Ausência (BASAL), presença do SWAP (12,5 µg/mL) ou presença de Concanavalina A (MITÓGENO) (5 µg/mL). As células foram marcadas com anticorpos conjugados a substâncias fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados representam a média da frequência de células esplênicas duplo-marcadas para sete animais/grupo. Os resultados apresentados são de um estudo representativo dos três estudos independentes. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo CONTROLE.

*Produção de citocinas e óxido nítrico por cultura de células esplênicas dos descendentes de mães esquistossomóticas quando adultos infectados*

A produção basal de IL-4 entre os grupos experimentais e o grupo CONTROLE foi semelhante, bem como em resposta ao estímulo antigênico SWAP. Do contrário, para o estímulo com mitógeno, houve menor produção desta citocina no grupo MI em comparação ao grupo CONTROLE e os demais grupos experimentais (FIGURA 3A).

Com relação à IL-5, houve estatisticamente menor produção basal no grupo AI e maior no grupo MI, em comparação ao grupo CONTROLE. Contudo, comparando a produção desta citocina entre os grupos experimentais, foi visto que os grupos AI e MIAI tiveram menor produção em relação ao grupo MI. Para o estímulo com SWAP, os diferentes grupos experimentais não apresentaram diferença em relação ao grupo CONTROLE, porém foi observada uma produção diminuída nos animais dos grupos AI e MIAI, em relação ao grupo MI. Os diferentes grupos, quando estimulados em cultura com o mitógeno ConA, não apresentaram diferença em relação ao grupo Controle (Figura 3B).

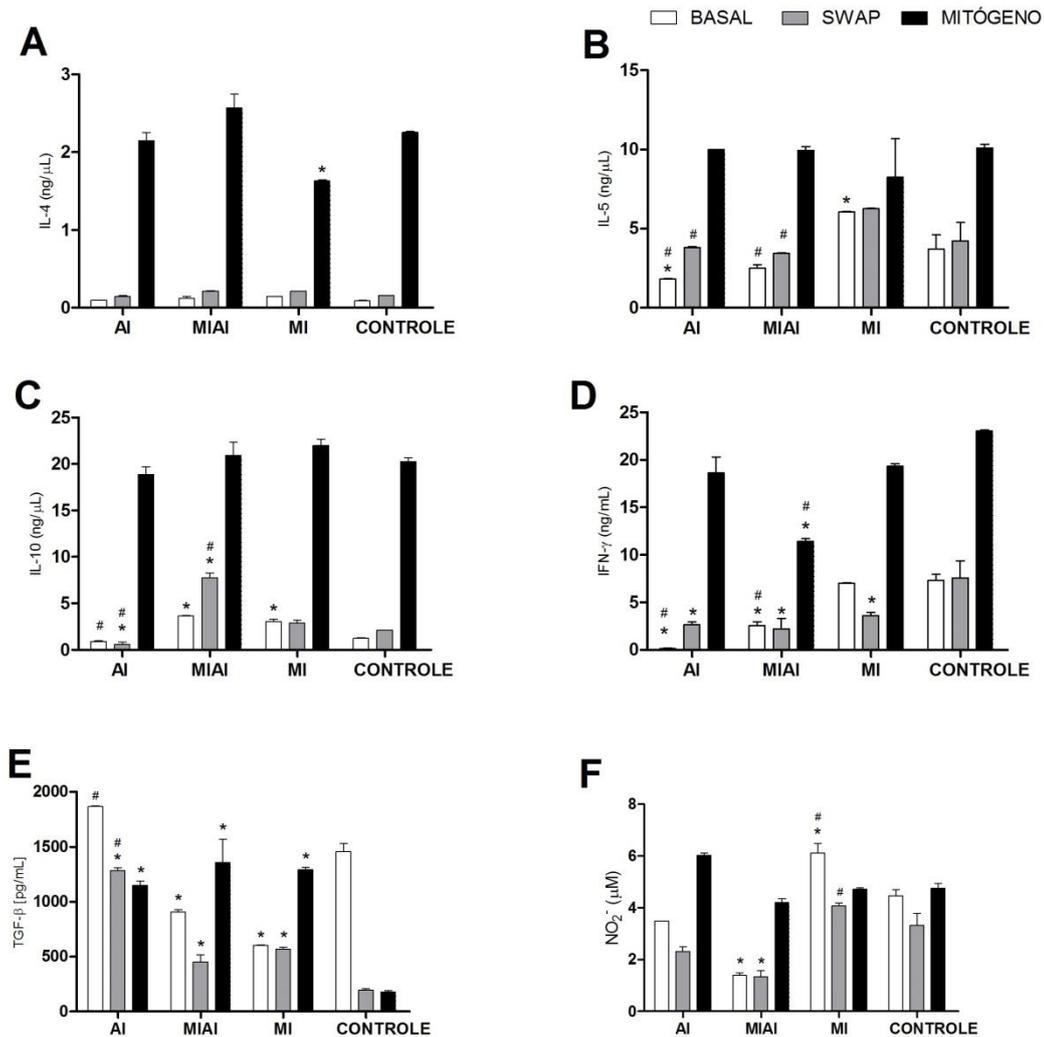
Com relação à produção de IL-10 (FIGURA 3C), foi observado que os grupos MIAI e MI apresentaram níveis basais aumentados quando comparados com o grupo CONTROLE. O grupo AI apresentou nível basal semelhante ao grupo Controle, porém em relação ao grupo

MI, a produção de IL-10 mostrou-se diminuída. O estímulo em cultura com o SWAP levou à produção diminuída de IL-10 pelas células do grupo AI, porém aumentou a produção no grupo MIAI, em relação ao grupo CONTROLE. O mesmo foi observado quando a comparação foi feita em relação ao grupo MI. Sob estímulo com ConA não foi verificada diferença entre os grupos de estudo.

Quando avaliada a dosagem de IFN- $\gamma$  (Figura 3D), houve menor produção basal nos grupos AI e MIAI em relação aos grupos CONTROLE e MI. Na presença do SWAP, todos os grupos tiveram níveis menores do que o grupo CONTROLE. O cultivo das células com estímulo da ConA levou a níveis diminuídos, em relação ao Controle, no grupo de MIAI.

Ao nível basal, a produção de TGF- $\beta$  nos grupos MIAI e MI foi menor quando comparado aos grupos CONTROLE e AI (FIGURA 3E). Quando a cultura foi estimulada com o SWAP houve um aumento da produção desta citocina por todos os grupos experimentais, em relação ao Controle. Contudo, em maior nível para o grupo AI. Quando a cultura foi estimulada com o mitógeno, houve aumento da produção desta citocina por todos os grupos experimentais, em relação ao CONTROLE.

A dosagem de NO (FIGURA 3F) no sobrenadante de cultura de células esplênicas mostrou que, ao nível basal, o grupo MIAI tiveram produção diminuída desta molécula em comparação ao grupo CONTROLE. O grupo MI produziu níveis elevados quando comparado com os grupos CONTROLE, AI e MIAI. Quando estimuladas com SWAP, o MIAI produziu menos NO em relação ao CONTROLE e o grupo MI produziu mais NO, em relação apenas ao grupo AI. Quando estimuladas com ConA, as células dos diferentes grupos experimentais não apresentaram diferença em relação ao grupo CONTROLE.



**Figura 3.** IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C), IFN- $\gamma$  (D), TGF- $\beta$  (E) e NO (F) secretados por esplenócitos. Camundongos *Swiss webster* infectados (80 cercárias) nascidos de mães infectadas (MI), amamentados em mães infectadas (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI), com sete semanas de vida, tiveram os esplenócitos cultivados por 24 h para dosagem de IL-4 e IL-5 e 72 h para dosagem das demais citocinas e NO em diferentes condições: Ausência (BASAL), presença do SWAP (12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou presença de Concanavalina A (MITÓGENO) (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As citocinas foram quantificadas nos sobrenadantes da cultura celular por ELISA sanduíche e o NO pelo método de Griess. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão para sete animais/grupo. O limite de detecção foi de 0,076 ng/mL para IL-4, 0,15 ng/mL para IL-5, 0,61 ng/mL para IFN- $\gamma$ , 0,31 ng/mL para IL-10, 62,5 pg/mL para TGF- $\beta$  e de 1,56  $\mu\text{M}/\text{mL}$  para NO. Os resultados apresentados são de um estudo representativo dos três estudos independentes. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo CONTROLE. # $p < 0,05$  comparado aos demais grupos experimentais.

## DISCUSSÃO

Neste estudo de infecção experimental pelo *S. mansoni*, como esperado, houve evolução para formação de granuloma no fígado (animais CONTROLE), acompanhado de mais macrófagos produtores de IL-10, do que produtores de NO. Apesar de não poder afirmar serem M1 e M2, devido à necessidade de múltiplos marcadores, acreditamos ser esta relação

marcadora da fase crônica (WILSON et al., 2007; GORDON; MARTINEZ, 2010). Assim como, a produção de citocinas que mostra um perfil misto Th1 (IFN- $\gamma$ ;NO) e Th2 (IL-4;IL-5), porém na presença de IL-10, TGF- $\beta$  e células FoxP3+ (SOUZA et al., 2011; BARSOUM et al., 2013). Embora, tenhamos utilizado reestímulo *in vitro* com SWAP por compartilhar de antígenos larvários que são candidatos ao estudo de vacinação (GABER et al., 2010), estes achados podem ser devido a ambos os efeitos imunomodulatórios *in vivo* de antígenos do verme GUSTAVSON et al., 2002; CARDOSO et al., 2010) e dos ovos (McKEE; PEARCE, 2004; TAYLOR et al., 2006; ZHOU et al., 2015).

É sabido que à infecção materna pode modular negativamente o grau de competência imune dos descendentes, frente às infecções pós-natais (ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010; SANTOS et al., 2010; 2016). Corroborando estes dados, descendentes nascidos e amamentados em mães infectadas por *S. mansoni* apresentaram uma reação granulomatosa diminuída através de menor número e tamanho de granulomas, menor produção de citocinas IFN- $\gamma$  e óxido nítrico e maiores níveis de citocina e células de fenótipo regulatório. Contudo, esta dinâmica da resposta imune foi alterada em animais infectados que foram apenas gerados ou amamentados em mães esquistossomóticas.

Os animais que tiveram apenas o contato prévio *in utero* com componentes parasitários e/ou anticorpos (MI), apresentaram o número e o tamanho de granulomas hepáticos maiores que os animais nascidos/amamentados (MIAI). De fato, descendentes apenas gerados em mães esquistossomóticas tiveram modulados positivamente a reação granulomatosa (SANTOS et al., 2016). Aqui, este achado foi corroborado pelo aumento de macrófagos com NO sintetase e da produção NO e IL-5, basal e em resposta ao SWAP, nestes descendentes. Estas duas moléculas estão envolvidas na arquitetura celular do granuloma, na fase inicial o NO que é pró-inflamatório levando a injúria tissular, seguido do influxo de eosinófilos, IL-5 dependente.

A presença aumentada de IL-10 e TGF- $\beta$ , acompanhada de menos IL-4 e IFN- $\gamma$ , pode explicar a exacerbação parcial da reação granulomatosa (sem significância em relação ao grupo controle), no grupo MI. O microambiente uterino é de caráter supressor, rico em IL-10 e TGF- $\beta$ , que promove um perfil Th2/Treg durante a gestação (MICHELON et al., 2006; SVENSSON et al., 2014). Na esquistossomose esta característica parece ser amplificada, visto que animais que tiveram o contato *in utero* apresentaram níveis de IL-10 superiores aos animais nascidos e amamentados em mães não infectadas e aos animais apenas amamentados em mães infectadas (SANTOS et al., 2010; 2014). Embora estes animais tenham uma maior

reação granulomatosa em relação ao grupo MIAI, a produção de citocinas regulatórias podem levar à sobrevida destes animais.

Em relação ao contato prévio com o leite de mães esquistossomóticas, é sabido do seu potencial em alterar o grau de competência imune dos seus descendentes devido à presença de antígenos parasitários ou de anticorpos antiparasito e citocinas modulatórias (LENZI et al., 1987; COLLEY et al., 1999; BLEWETT et al., 2008; BHARGAVA et al., 2012). Aqui, animais apenas amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram um maior número de macrófagos com NO sintetase, em relação ao grupo CONTROLE, com maior tamanho da reação granulomatosa em relação aos animais MIAI. Apesar disto, nos animais do grupo AI não houve produção elevada de NO, IL-4 ou IL-5 e houve produção reduzida de IFN- $\gamma$ . Estes dados sugerem um controle nos mediadores da resposta granulomatosa nestes descendentes, que parece ser TGF- $\beta$ , mas não IL-10, dependente. De fato, a produção basal de TGF- $\beta$  nestes animais é acompanhada de menos IL-5 e IFN- $\gamma$ . Além disso, a amamentação em mães esquistossomóticas foi a condição que melhor induziu a produção de TGF- $\beta$  em resposta ao SWAP.

Em conjunto, é possível inferir que a amamentação possui um efeito modulador capaz de controlar a resposta imune frente à reação granulomatosa. Este efeito foi melhor observado nos animais gerados, mas que em seguida receberam o leite de mães infectadas, o grupo MIAI. Neste grupo, a diminuição do tamanho e número do granuloma foi evidente e houve maior síntese de IL-10, TGF- $\beta$  e a presença de células CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>. Este fenômeno também foi encontrado por Santos et al. (2016) nos animais MIAI, porém não foi observada presença de células CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>. Estes autores interviram com imunização com antígeno proteico em adjuvante completo de Freund, que contém o muramil dipeptídeo que quando ligado às moléculas de reconhecimento padrão associados a patógenos (PRRs) em APCs induzem cascata de sinais resultando na ativação de APCs e promovendo uma resposta imune efetora otimizada (KENSIL et al., 2004; GUY, 2007), em detrimento à contrarregulação das Tregs.

Os dados indicam que o aumento da IL-10 e TGF- $\beta$  nos animais MIAI, são respectivamente dependentes da gestação e da amamentação e trazem à tona um efeito epigenético nos descendentes de mães esquistossomóticas. Sabendo que marcadores epigenéticos podem ser remodelados durante o período de desenvolvimento (ATTIG et al., 2010; FALL 2013), estudos serão realizados a fim de obter informações sobre potenciais alvos terapêuticos, para melhoramento da resposta imune de indivíduos que tiveram contato prévio com antígenos parasitários durante a amamentação e/ou *in utero*.

Em conclusão, a gestação seguida pela amamentação em mães infectadas é mais

eficiente em controlar a reação granulomatosa nos descendentes. Apenas a amamentação foi capaz de prejudicar as respostas Th1 e Th2, com altos níveis de TGF- $\beta$ , de maneira que células Treg parecem desempenhar um papel crucial neste fenômeno. Estes achados auxiliam no esclarecimento dos efeitos da infecção esquistossomótica materna sob a imunomodulação da reação granulomatosa em indivíduos de áreas endêmicas. Além disso, ressaltam o uso de antígenos parasitários como ferramentas imunomodulatórias, no início da vida, junto com a amamentação na modulação de respostas inflamatórias crônicas.

## REFERÊNCIAS

- AMU, S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **J. Allergy Clin. Immunol.**, n. 125, n. 5, p. 1114-1124, 2010.
- ATTALLAH, A. M. et al. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. **Parasitol. Res.**, New Damietta City, v. 99, n.2, p.137-145, 2006.
- BAGHERI, M.; DONG, Y.; ONO, M. Molecular Diversity of Macrophages in Allergic Reaction: Comparison between the Allergic Modes; Th1- and -Th2-Derived Immune Conditions. **Iran J. Allergy Asthma Immunol.**, June, v. 14, n. 3, p. 261-272, 2015.
- BARRIE, J. A.; GRANT, A. R.; DONALD, P. M. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 28, p. 572-579, 2012.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **J. Advanc. Res.** v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013.
- BHARGAVA, P. et al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. **Nat. Med.** v. 18, n. 11, p. 1665-1672, 2012.
- BLEWETT, H. J. H. et al. The immunological components of human milk. **Adv. Food Nutr. Res.** v. 54, p. 45-80, 2008.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Paras. Immunol.** v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009.
- CARDOSO, L. S. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 160, n. 2, p. 266-274, 2010.
- CHENG, F. et al. Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells. **Mol. Immunol.**, v. 60, n. 1, p.44-53, 2014.
- COLLEY, D. G. et al. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. **Microbes infect.** v. 1, n. 7, p. 517-524, 1999.
- COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs

- induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. **J. Exp. Med.** v. 204, n. 8, 1757-1764, 2007.
- EL-AHWANY, E. et al. Regulatory cell responses to immunization with a soluble egg antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **The Korean Journal of Parasitology**, v 50, n. 1, p. 29-35, 2012.
- FAIRFAX, K. et al. Th2 responses in schistosomiasis. **Semin Immunopathol.**, Nov; v. 34, n. 6, p. 863-871, 2012.
- GABER, H. M. et al. Immune Responses in Mice after Immunization with Antigens, from Different Stages of the Parasite *Schistosoma mansoni*. **Z. Naturforsch**, v. 65 c, p, 289-302, 2010.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages: mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (<sup>15</sup>N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GUSTAFSSON, C. et al. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. **J. Reprod. Immunol.**, v. 71, n. 1, p. 41-56, 2008.
- GUSTAVSON, S. et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol. Int.**, Sep, v. 51, n. 3, p.259-269, 2002.
- GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Rev.**, v. 5, n. 7, p. 505-516, 2007.
- HERBERT, D. R. et al. Arginase I suppresses IL-12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 184, n. 11, p. 6438-6446, 2010.
- HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism. **J. Immunol.**, v 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.
- HIRSCH, C. et al. Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. **Parasitology**, Jul, v. 115 (Pt 1), p. 21-28, 1997.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 14, n. 6, p.397-400, 1972.
- KENSIL, C. R.; MO, A. X.; TRUNEH, A. Current vaccine adjuvants: an overview of diverse class. **Front. in Biosc.**, v. 1, n. 9, p. 2972-2988, 2004.
- LA FLAMME, A. C, et al. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 166, n. 3, p. 1903-1911, 2001.
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.
- LENZI, J. A. et al. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, supl. 4, p. 257-267, 1987.
- LOKE, P. et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4<sup>+</sup>T cells to be sustained during chronic infection. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 3926-3936,

- 2007.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.**, v. 229, n. 2, p. 176-185, 2013.
- MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 13, p. 453-461, 2008.
- McKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 1224-31, 2004.
- MICHELON, T. et al. Imunologia da gestação. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2, p. 145-151, 2006.
- OTHMAN, A. A.; SHOHEIB, Z. S.; SAIED, A. M. Congenital exposure to *Shistosoma mansoni* infection: Impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiol.**, v. 215, n. 2, p. 101-112, 2010.
- PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Exp. Medicine**, v. 173, n. 1, p. 159-166, 1991.
- RUTITZKY, L. I.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 23p. 13243-13248, 2001.
- SANTOS, P. A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomotic mothers differently modulate the immune response of adult offspring to postnatal *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 2, p. 83-92, 2016.
- SANTOS, P. A. et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. **Experimental Parasitol.**, v. 141, p. 62-67, 2014.
- SANTOS, P. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **Parasitol. Res.**, v. 101, n. 1, p. 95-102. 2010.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.
- SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clín. Med.**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.
- SVENSSON, J. et al. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. **J. Immunol.**, v. 187, n. 7, p. 3671-3682, 2011.
- TAYLOR, J. J., MOHRS, M.; PEARCE, E. J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J. Immunol.**, n. 176, n. 10, p. 5839-5847, 2006.
- WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 241, n. 1, p. 241-259, 2011.
- WHO - World Health Organization 2015. Schistosomiasis. Disponível em: <[who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/)>. Acessado em: 04 Fe. 2016.
- WOLFS, I. M. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. **FASEB J.**, v. 28, n. 1, p. 288-299,

- 2014.
- WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**. v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013.
- XU, D. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice. **J. Immunol.**, v. 170, n. 1, p. 394-399, 2003.
- YANG, J. et al. Schistosoma japonicum egg antigens stimulate CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. **Immunol.** v. 120, n. 1, p. 8-18, 2007.
- ZHOU, S. et al. Heat Shock Protein 60 in Eggs Specifically Induces Tregs and Reduces Liver Immunopathology in Mice with Schistosomiasis Japonica. **PLoS One**. v. 10, n. 9, p. 1-17, doi: e0139133, 2015.
- ZHU, J. et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during Schistosoma japonicum infection in mice. **Parasit. Vectors**, v. 7, n. 122, p. 122-131, doi: 10.1186/1756-3305-7-122, 2014.

***CONCLUSÕES***

## 6 CONCLUSÕES

- A gestação seguida da amamentação foi capaz de modular negativamente a reação granulotomosa, através de número e tamanho de granulomas hepáticos reduzidos, não havendo diferença na deposição de colágeno.
- A gestação causou aumento dos níveis de IL-5 e IL-10 e a amamentação levou ao aumento de TGF- $\beta$ , com diminuição de IL-5 e IFN- $\gamma$ . Os níveis de IL-4 não sofreram alterações.
- A gestação provocou maior produção de óxido nítrico e a amamentação uma diminuição nos níveis desta molécula.
- A gestação seguida da amamentação gerou nos descendentes níveis elevados de células CD4+FoxP3+. A gestação e a amamentação, separadamente, levaram ao aumento de células CD16/CD32+NOS-2+. A frequência de células CD14+/IL-10+ foi mantida.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. **Acta Trop.**, v. 108, n. 2-3, p. 79-82, 2008.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunol.** v. 31, n.11, p. 656-663, 2009.
- ATTALLAH, A. M. et al. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. **Parasitol. Res.**, v. 99, p. 137-145, 2006.
- ATTALLAH, A. M. et al. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 6, p. 647-651, 2003.
- BARRIE, J. A. et al. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 28, p. 572-579, 2012.
- BARRON, L.; WYNN, T. A. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, p. 2509-2514, 2011.
- BARTLEY, P. B.; RAMM, G. A.; JONES, M. K.; RUDDELL, R. G.; LI, Y.; MCMANUS, D. P. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. **Int J. Parasitol.** v. 36, n.9, p. 993-1001, 2006.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 209-918, 2005.
- BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M.; WEINER, H. L.; KUCHROO, V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **Nature**. v. 441, n. 7090, p. 235-238. doi:10.1038/nature04753, 2006.
- BLOIS, S. M. et al. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. **Biol Reprod.** v. 70, n. 4, p. 1018-23, 2004.
- BROWN, B. et al. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. **Tissue Eng.**, v. 12, p. 519-526, 2006.
- BROWN, M. Schistosomiasis. **Clinical medicine**, v. 11, n. 5, p. 479-482, 2011.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Paras. Immunol.**, v.31, p. 163-176, 2009.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Paras. Immunol.**, v.31, p. 163-176, 2009.
- BURT, A. D. Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. **J. Pathol.**, v. 170, p. 105-114. 1993.
- CABALLERO-MENDONZA, E. et al. La célula estelar hepática (célula de Ito). **Patología**, v. 37, p. 307-314, 1999.
- CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop.**, v.108, p. 3109-3117, 2008.
- COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264. doi:

10.1016/S0140-6736(13)61949-2, 2014.

COLLEY, D. G. et al. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. **Microbes infect.** v. 1, n. 7, p. 517-524, 1999.

DIAZ, A.; ALLEN, J. E. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. **Eur. J. Immunol.** v. 37, n. 12, p. 3319-3326, 2007.

FRIEDMAN, J. F. et al. Schistosomiasis and pregnancy. **Trends Parasitol.**, v. 23, n. 4, p. 159-164, 2007.

FRIEDMAN, S. L. Cytokines and Fibrogenesis. **Semin. Liver Dis.**, v. 19, p. 129-137, 1999.

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

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 26 n. 2, p. 383-397, 2012.

GRYSEELS, B. Human Schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Front Immunol.** 2013 Apr 15; 4: 89. doi: 10.3389/fimmu.2013.00089. eCollection 2013.

HANG, L. M. et al. Induction of immunological hyporesponsiveness to granulomatous hypersensitivity in *Schistosoma mansoni* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 130, n. 5, p. 515-522, 1974.

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

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

HERBERT, D. R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, v. 20, p. 623-635, 2004.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 6, p. 425-56, 2011.

HERZ, U. et al. Prenatal sensitization in a mouse model. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, n. 3, p. 62-65, 2000.

IWAISAKO, K. et al. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. **J. Gastroenterol Hepatol.**, suppl. 27, v. 2, p. 65-68, 2012.

JOSHI, A. D. et al. A systemic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs alters responsiveness of bone-marrow-derived macrophages to Toll-like receptor agonists. **Journal of Leukocyte Biology.**, v. 83. p.314-324, 2008.

KRAUSGRUBER, T. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. **Nat. Immunol.**, v. 12, p. 231-238, 2011.

KREIDER, T. et al. Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, p 448-453, 2007.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem.**

**Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 105, p. 422-435, 2010.

LAYLAND L. E.; MAGES, J.; LODDENKEMPER, C.; HOERAUF, A.; WAGNER, H.; LANG, R. et al. Pronounced phenotype in activated regulatory T cells during a chronic helminth infection. **J. Immunol.**, v. 184, n. 2, p. 713-724, 2010.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 2, p. 195-206, 2011.

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

MANTOVANI, A.; BISWAS, S. K.; GALDIERO, M. R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.** v. 229, n.2, p. 176-185, 2013.

MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 453-461, 2008.

MCDONALD, C. J.; JONES, M. K.; WALLACE, D. F.; SUMMERVILLE, L.; NAWARATNA, SUBRAMANIAM V. N. Increased Iron Stores Correlate with Worse Disease Outcomes in a Mouse Model of Schistosomiasis Infection. **PLoS One**. v. 5, n. 3, e9594, doi: 10.1371/journal.pone.000959, 2010.

MCKEE, A. S., PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 1224-1231, 2004.

MELO, A. L. ; COELHO, P. M. Z. **Parasitologia Humana**, 11. ed. (193-212), São Paulo: Atheneu, 2010.

MONTESANO, A. M. et al. Humoral Immune Responses Antigen-Specific Cellular and Egg *Schistosoma mansoni* Induces Neonatal Exposure to Idiotype. **J. Immunol.**, v. 163, n. 2, p. 898-905, 1999.

MOREIRA, A. P., HOGABOAM, C. M. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. **J. Interferon Cytokine Res.** v. 31, n, 6, p. 485-491, 2011.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Association of *Schistosoma mansoni*-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 2, doi: 10.1371/journal.pone.0088042, 2014.

NOUR, N. M. Schistosomiasis: Health effects on women. **Rev. Obstet. Gynecol.**, v. 3, n.1, p. 28-32, 2010.

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

OKANO, M. et al. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. **J. Immunol.**, v. 163, n. 12, p. 6712-6717, 1999

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

PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Medicine**, v. 173, n. 1,

p. 159-166, 1991.

PEREIRA, T. A. et al. Macrophage-derived Hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni. **Liver Int.**, v. 33, n.1, p. 149-61, 2013.

PESCE, J. T. et al. Retnla (Relma/Fizz1) Suppresses Helminth-Induced Th2-Type Immunity. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, e1000393, doi: 10.1371/journal.ppat.1000393, 2009.

PORDEUS, L. C. et al. The occurrence of acute and chronic forms of the schistosomiasis mansoni in Brazil from 1997 to 2006: A revision of literature. **Epidemiol. Serv. Saúde Sept.**, v.17, n.3, p.163-175, 2008.

REIS, L.F. et al. Quantitative and qualitative interferences of pentoxifillyne on hepatic *Schistosoma mansoni* granulomas: effects on extracellular matrix and eosinophil population. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, supl., p. 107-112, 2001.

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

SADLER, C. H.; RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J.; WILSON, R. A. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 4, 880-888, 2003.

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

SANTOS, P. A., LORENA, V. M., FERNANDES, E., SALES, I. R., NASCIMENTO, W. R. C., GOMES, Y., ALBUQUERQUE, M. C., COSTA, V. M., SOUZA, V. M. Gestation and breastfeeding in schistosomal mothers differently modulate the immune response of adult offspring to postnatal *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 2, p. 82-93. 2016.

SATOH, T. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 10, p. 936-944, 2010.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.

SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20. n. 3, p. 327-336, 2011.

SOUZA, F. P. C. et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clin. Med.**, São Paulo, v. 9, n.4, p. 300-307, 2011.

STRAUBINGER, K.; SABINE, P.; COSTA, O. P. da; RITTER, M.; BUCH, T.; BUSCH, D. H.; LAYLAND, L. E.; COSTA, C. U. P. da. Maternal immune response to helminth infection during pregnancy determines offspring susceptibility to allergic airway inflammation. **J. Allergy Clin Immunol.**, v. 134, n. 6, p. 1271-1279.e10, 2014.

TAYLOR, J. J. et al. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J. Immunol.**, n. 176, p. 5839-5847, 2006.

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

TIAN, F. et al. Effects of soluble egg antigen and adult worm antigen of *Schistosoma japonicum* on differentiation of effector B cells of mice. **Chinese J. Schistosomiasis Control.**, n. 25, n.5, p. 488-492, 2013.

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

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

WOLFS, I. M. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. **FASEB J.**, v. 28, n.1, p. 288-299, 2014.

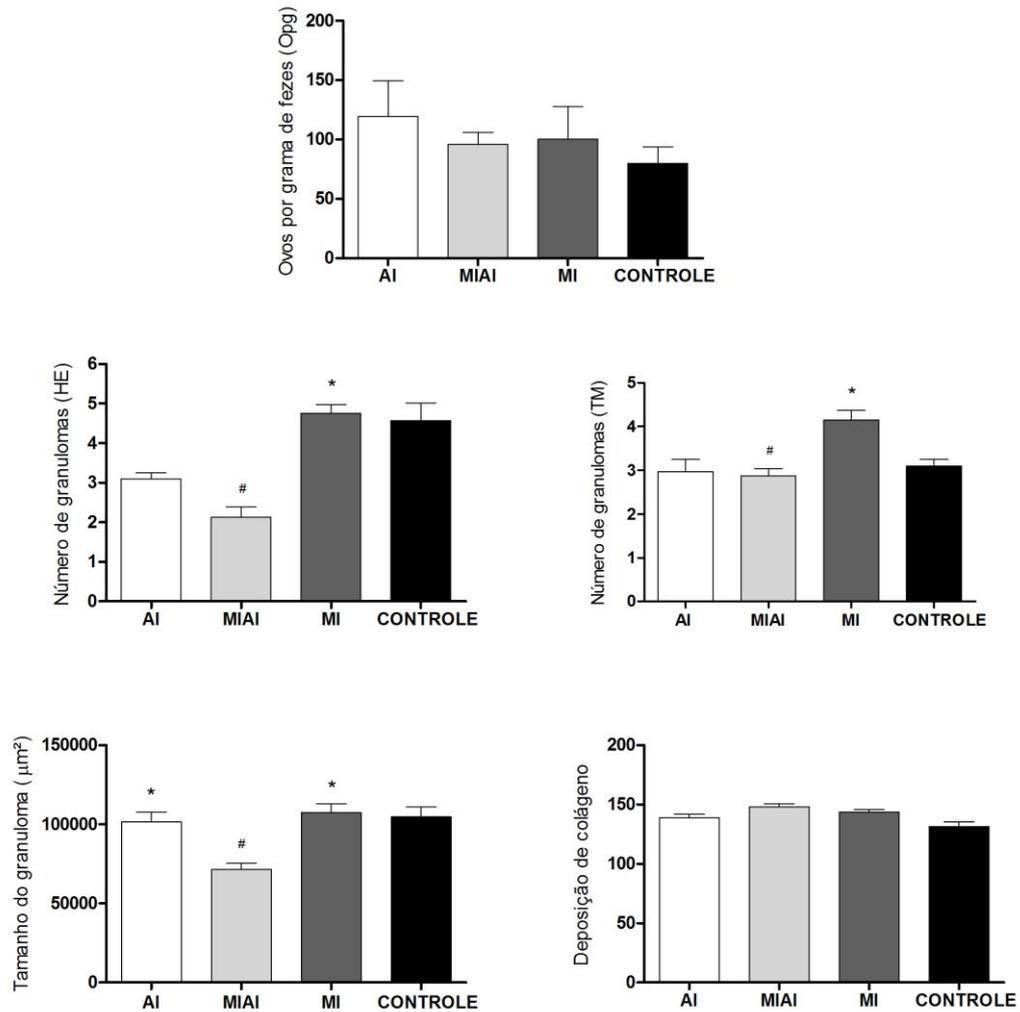
WYNN, T. A., CHAWLA, A., POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature.** v. 496, n. 7446, 445-455, 2013.

ZHU, J. et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 122-131, 2014.

***APÊNDICE***

## APÊNDICE A

Gráficos utilizados na construção da Tabela 1. que demonstra o número e tamanho de granulomas e fibrose hepática desenvolvida em camundongos infectados por *S. mansoni* (80 cercárias) nascidos de mães infectadas (MI), amamentados em mães infectadas (AI) e nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI).



**APÊNDICE B***Mem Inst Oswaldo Cruz* (Qualis B2)

ORIGINAL ARTICLE

**EFFECT OF PREGNANCY AND BREASTFEEDING IN SCHISTOSOMOTIC MICE IN GRANULOMATOUS REACTION OF ADULT OFFSPRING IN POSTNATAL INFECTION**Holanda, G. C. R.<sup>1</sup>Lorena, V. M. B.<sup>2</sup>Aires, A. L.<sup>1</sup>Silva, M. C.<sup>1</sup>Santos, P. E. A.<sup>1</sup>Costa, V. M.A.<sup>1</sup>Albuquerque, M. C. P. A.<sup>1</sup>Souza, V. M. O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco - LIKA/UFPE – Recife – Pernambuco - Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz - CPqAM/Fiocruz - Recife – Pernambuco - Brasil.

\*Endereço para correspondência: Valdênia Maria Oliveira de Souza

Campus Universitário, Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil. CEP: 50670-901.

Tel.: + 55 81 2101 2515; Fax: + 55 81 2126 8485. E-mail: valdenia.souza@gmail.com

Normas da revista: <http://memorias.ioc.fiocruz.br/instructions-to-authors>

## ABSTRACT

Maternal infections by *Schistosoma mansoni* modulate adult offspring immunity in postnatal infections. Here, was evaluated separately the effect of breastfeeding and pregnancy in this phenomenon by the degree of hepatic fibrosis, the production of Th1, Th2 and regulatory cytokines, the expression of macrophages producing NO and IL-10, and regulatory T lymphocytes in adult offspring from schistosomotic mothers when subjected to post-natal infection. *Swiss webster* females were subjected to infection with *S. mansoni* (20 cercariae), synchronization of estrus and mating. After birth, adoptive breastfeeding was held in which offspring of infected mothers breastfed in uninfected mothers (BIM) and offspring of uninfected mothers were breastfed by infected mothers (SIM). Another group of animals born in schistosomotic mothers breastfeeding remained in their mothers (BSIM). To control group was used animals born and breastfed in uninfected mothers. Male offsprings were infected when adults (80 cercariae) and 60 days post-infection animals splenocytes were cultured with medium alone or added with SWAP (12.5 µg/ml) and ConA (5 µg/ml). After 24 h and 72 h the supernatants were assayed for IL-4; IL-5; IL-10; INF-γ; TGF-β; NO and the cells used for immunophenotyping with monoclonal antibodies bound to fluorochromes for CD4+FoxP3+, CD16/CD32+NOS2+, CD14+IL-10+. The liver tissue were subjected to histomorphometry. Compared to control, the BIM group showed increased frequency of CD16/CD32+NOS2+, increased production of NO, IL-5 and IL-10, a reduction of IFN-γ and compared to BSIM group, the greater number and size of granulomas. The SIM group compared control, had a higher frequency of CD16/CD32+NOS2+, higher TGF-β levels, less IL-5, NO and IFN-γ. Regarding BSIM, greater granuloma size. The BSIM group showed smaller number and size of granulomas with lower production of IFN-γ and NO, increased IL-10 and TGF-β, as well as higher frequency of CD4+/FoxP3+ cells. There was no difference in the levels of CD14+/IL-10+ cells. In conclusion, gestation followed by breastfeeding in schistosomotic mothers provided a reduction in granulomatous reaction, and besides the production of IL-10 (dependent on gestation) and TGF-β (dependent breast feeding) T cells with regulatory phenotype are required to this phenomenon.

**Keywords:** Granuloma. Immunomodulation. Maternal-fetal relation. Mice. Schistosomiasis.

## Introduction

Schistosomiasis is endemic in 78 countries and it is estimated and at least 261 million people are infected worldwide (WHO, 2015). Granulomas rich in macrophages and eosinophils induced by eggs retained especially in liver tissue, characterized infection. At this stage, there is a predominance of Th2 response with increased levels of IL-4, IL-5, IL-13 that negatively regulates Th1 response induced by adult worms (PEARCE et al., 1991; BURKE et al., 2009; FAIRFAX et al., 2012). This response is also associated with the stimulation of regulatory T cells (Tregs) and IL-10, which controls the granulomatous reaction around the eggs in the host (MCKEE; PEARCE 2004; TAYLOR et al., 2006).

Despite the induction of granulomatous response, severe cases are less frequent in endemic areas (CALDAS et al., 2008) and this phenomenon has been attributed to maternal schistosome infection that seems to negatively modulate postnatal infections. Attallah et al. (2006) reported a reduction in granulomatous reactions in animals born and breastfed in massively infected mothers and Othman et al. (2010) corroborate these findings and showed increased gene expression of IL-12 and TGF- $\beta$ .

The study of the effect of milk from infected mothers and gestation separately showed that breastfeeding enhances antibody production, IL-2 and improves the ability to activate B lymphocyte and T lymphocyte under antigenic activation (COLLEY et al., 1999; SANTOS et al., 2010; SALES et al., 2012). However, breastfeeding predisposed to higher frequency of regulatory T cells (CD4+CD25+FoxP3+) and suppressed the inflammatory response in a model of allergic asthma (SALES et al., 2012; SANTOS et.al., 2014; SANTOS et al., 2016;). This data highlights the dichotomous character of milk from schistosomotic mothers.

Regarding pregnancy in schistosomotic mothers, the gestational suppressor microenvironment (BLOIS et al., 2004; SVENSSON et al., 2011) is amplified by the intrinsic property of the egg and adult worms in inducing IL-10 production by dendritic cells (DCs) and B lymphocytes. (THOMAS; HARN 2004; AMU et al., 2010). Together, pregnancy in infected mothers seems to promote IL-10 and a suppressor status that is maintained long term, since in offspring was generated only high production of IL-10, and decreases the stimulatory capacity of antigen presenting cells (APCs).

Among the mechanisms of cellular immune response, there is the action of macrophages. Upon activation status, macrophages presents in two subpopulations: the first, has a high capacity for antigen presentation and high production of NO involved in Th1 immune response, and the second subpopulation of macrophages in stimulated in the presence

of IL-4, having higher production of IL-10 (BARRIE et al., 2012; GORDON; MARTINEZ, 2010; SICA; MANTOVANI, 2012). These cells promotes extracellular matrix remodeling, tissue repair, angiogenesis, immunoregulatory and anti-inflammatory activity. In schistosomiasis, nitric oxide synthase-2, IFN- $\gamma$  and IL-12 has been associated with increases in severity of immunopathology in mice deficient in IL-4 (La FLAMME et al., 2001; RUTIZKY et al., 2001; HERBERT et al., 2010). Furthermore, during *S. mansoni* infection occurs the activation of Treg cells producing IL-10 and TGF- $\beta$ . These cells are generated to regulate/modulate Th1 and Th2 responses and reduce pathology in schistosomiasis, ensuring the survival of the host as the infection takes a chronic course (MCKEE; PEARCE 2004; TAYLOR et al., 2006). Amu et al. (2010) demonstrated that in mice infected only with male worms of *S. mansoni* was recruitment of Treg cells to the lung and consequent suppression of anti-OA allergic response. Cardoso et al. (2010) have shown that when mice were immunized with Sm 22.6, Sm 29 and PIII (derived antigen adult worm) antigens it was observed a reduction in the number of inflammatory cells, eosinophils and IgE anti-OA in infected and asthmatic animals. Furthermore, the levels of Th2 cytokines in these animals were decreased with increase in IL-10 levels and increased frequency of Treg cells. In fact, it has been observed that animals immunized with macrophages pulsed with PIII showed less granulomatous reaction associated with a decrease in cell-mediated immune response (GUSTAVSON et al., 2002).

Based on the exposed, it was evaluated in adult mice born and/or breastfeeding in schistosomotic mothers when subjected to post-natal infection the number and size of hepatic granulomas, deposition of collagen, the level of Th1 cytokines (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 and IL-5) and regulatory (TGF- $\beta$  and IL-10) and NO, as well as the frequency of macrophage producing NO and IL-10 and the presence of Treg cells. Thus, it was observed that the breastfeeding after pregnancy in schistosomotic mothers is more efficient in controlling the granulomatous reaction. Breastfeeding only was able to affect the Th1 and Th2 responses, with high levels of TGF- $\beta$ , so that Treg cells appear to play a crucial role in this phenomenon.

## **Materials and Methods**

*Animals and Schistosoma mansoni infection* - Swiss webster four-week-old female mice were infected, subcutaneously, with 20 *S. mansoni* cercarie, Belo Horizonte (BH) strain. On the 45<sup>th</sup> day the infection was confirmed by Kato-Katz method (Katz et al., 1972). On the 60<sup>th</sup> day post-infection, estruses were synchronized by administration of 5 UI (100  $\mu$ L) of

eCG (equine chorionic gonadotrophin) hormone plus, after 48 h, injection of an additional 5UI (100  $\mu$ L) of hCG (human chorionic gonadotrophin). 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. 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.

*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 breastfeeding, 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, BH strain (confirmed by Kato-Katz method).

*Cell Culture* - 60 days after infection, 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 from each group ( $n=7$ ) were cultivated at a final concentration of  $5 \times 10^6$  (24 h) or  $12 \times 10^6$  (72 h) cells/tube in 8 mL culture tubes and subsequently stimulated with SWAP (12,5  $\mu$ g/ml) or concanavalin A (Con-A) (5  $\mu$ g/ml) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were harvested after 24 or 72 h and assayed for cytokine content: IL-4 and IL-5 (24 h), IFN- $\gamma$ , IL-10, TGF- $\beta$  and NO (72 h). Cells cultured for 24 h were collected and labeled for CD4 and FoxP3, CD16/CD32 and NOS-2 and CD14 and IL-10 detection.

*Cytokine and nitric oxide 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-5 39D10 and biotinylated 5A10; for IFN- $\gamma$ , XMG 1.2 and biotinylated AN18; and for IL-10, C252-2A5 and biotinylated SXC-1 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. TGF- $\beta$  assay was performed using Invitrogen™ kit with monoclonal antibodies: 6L8/1 and biotinylated 7B8/1 (Invitrogen™). The TGF- $\beta$  activation was taken according to the manufacturer's specifications. 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, rIFN- $\gamma$ , rIL-5, rIL-10 ou rTGF- $\beta$ ), with resulting detection limits of 0,076 ng/mL for IL-4, 0,15 ng/mL for IL-5, 0,61ng/mL for IFN- $\gamma$ , 0,31ng/mL for IL-10 and 62,5 pg/mL for TGF- $\beta$ .

As a measure of nitric oxide, nitrite assay was performed by Griess reaction (Green et al., 1982). The plates were read (550 nm) in an automated ELISA reader. The samples were quantified by comparison with the standard curves with resulting detection limit of 1,56  $\mu$ M/mL.

*Cell labeling* - Spleen cells were subjected to double-labeling with fluorochrome-labeled antibody solutions at a concentration of 0.5 mg/10<sup>6</sup> cells: FITC anti-mouse CD4 plus PE-Cy5 anti-mouse FoxP3; FITC anti-mouse CD16/CD32 plus APC anti-mouse NOS-2; FITC anti-mouse CD14 plus PE anti-mouse IL-10 (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 for lymphocytes and 5.000 events per sample for macrophages. 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.

*Histomorphometric study of liver tissue* - On the 60<sup>th</sup> day post-infection, animals from BIM, SIM, BSIM and CONTROL groups had their livers harvested after anesthesia and euthanasia, and were fixed in 10% buffered formalin. Three fragments of liver tissue in transverse sections from three distinct lobes were collected from each animal. Horizontal histological sections (4 $\mu$ m) were cut using a microtome Yamato (Japan) and the slides were

stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome (MT; selective for collagen) for morphometric study. The study was performed using ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) for measuring the average diameter (micrometer -  $\mu\text{m}$ ) of granulomas, with subsequent calculation of the area ( $\mu\text{m}^2$ ), and intensity of blue stain (specific for collagen) in histograms. Analyses were performed on images randomly obtained in 10-20 fields/animal (100x). The histomorphometric study was performed in seven animals/group.

*Statistical analysis* - For histomorphometric analysis of liver sections the Kruskal-Wallis test was used followed by Dunn's multiple comparison test. For cytokine and nitric oxide analysis and flow cytometric, a one-way analysis of variance followed by Tukey's method were used. For statistical analysis, we used GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and all findings were considered significant at  $p < 0.05$ . All procedures were repeated three times to evaluate the reproducibility of the results and it was showed one representative of three independent studies.

### **Ethics**

The animal protocol was approved by the Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of the Oswaldo Cruz Foundation (No 70/2014) and are in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

### **Results**

*Animals born and breastfed in infected mothers had reduced number and size of hepatic granulomas*

To check the intensity of infection and granulomatous reaction in animals born (BIM) and suckled in infected mothers (SIM), the egg count in feces and histomorphometric analysis of liver tissue was carried out 60 days after infection. Analyses were also conducted in animals born/suckled in infected mothers (BSIM) ou uninfected (CONTROL) (Table 1, appendix A). Thus, it was observed that there was no difference in egg counts between groups. However, the BSIM group has significantly fewer granulomas and size, with a similar amount of collagen, compared to CONTROL. The BIM group had higher number and size of granulomas compared to BSIM group. The granuloma size in SIM group was higher compared to BSIM group.

**Table 1.** Number of eggs per gram of feces, number and size of hepatic granulomas and liver fibrosis in infected mice born and/or suckled in schistosomotic mothers.

Groups <sup>a</sup>	Kato-Katz (epg) <sup>b</sup>	Number of hepatic granulomas <sup>c</sup>		Size of hepatic granuloma <sup>d</sup> (MT)	Collagen (MT) <sup>e</sup>
		HE	MT		
Control	80 ± 13,86	4,56 ± 0,44	4,05 ± 0,15	97769 ± 6284	136,6 ± 3,78
BIM	100 ± 27,68	4,75 ± 0,22*	4,15 ± 0,23*	101688 ± 569*	143,4 ± 1,86
SIM	119,2 ± 30,39	3,10 ± 0,15	2,97 ± 0,28	94579 ± 6255*	138,7 ± 2,85
BSIM	96 ± 9,79	2,12 ± 0,25 <sup>#</sup>	2,87 ± 0,16 <sup>#</sup>	70015 ± 3645 <sup>#</sup>	146,3 ± 2,49

*a:* Swiss Webster mice infected with 80 *S. mansoni* cercariae, BIM, SIM or BSIM from *S. mansoni* infected mothers. 60 days post-infection had their liver subjected to morphometric study. Born and suckled mice from uninfected mothers (control) were also analyzed under the same conditions [haematoxylin-eosin (H&E) and Masson's trichrome (MT) stains]; *b:* median ± standard error (SE) of number of the eggs per gram (epg) feces. Analysis was conducted 48 days post-infection; *c:* median ± SE of number of hepatic granulomas per field; *d:* median ± SE of size (sectional area) of hepatic granulomas in  $\mu\text{m}^2$ . Analysis of 10 granulomas per animal ( $n = 7$ ) totaling 70 granulomas/group; *e:* proportion of collagen obtained from ImageJ<sup>®</sup> software; <sup>#</sup>  $p < 0,05$  compared with the control group; \*  $p < 0,05$  compared with the BSIM group. Using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

*Evaluation of NO and IL-10 producing macrophages of the infected descendants of schistosomotic mothers as adults*

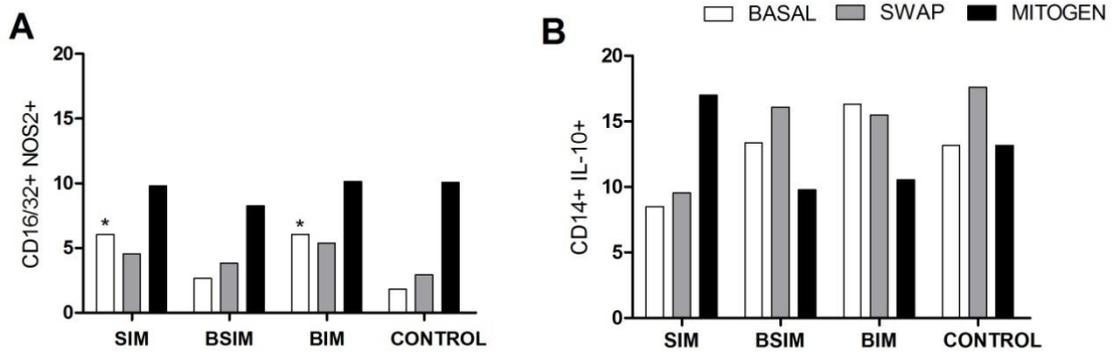
The evaluation of NO and IL-10 producing macrophages was carried out by marking CD16/CD32+/NOS-2+ and CD14+/IL-10+, respectively, against the challenge with SWAP or ConA. The analysis of the frequency of these cells in unstimulated culture was also performed (Basal).

By analyzing the CD16/CD32+ expressing NOS-2 when cultured without stimulation (Figure 1A), the frequency was three times higher of these cells in BIM and SIM groups in comparison to CONTROL and BSIM groups (SIM = 6,0%, BSIM = 2,7%, BIM = 6,0%, CONTROL = 1,8%).

For cells of experimental groups stimulated with SWAP, there was no difference in the frequency of these cells compared with the CONTROL group (SIM = 4,5%, BSIM = 3,8%, BIM = 5,5%, CONTROL = 2,9%). Under stimulation with mitogen, there was no significance in the frequency of CD16/CD32+/NOS-2+ of the experimental groups compared with the CONTROL group (SIM = 9,8%, BSIM = 8,3%, BIM = 10,2%, CONTROL = 10,0%).

The cells frequency expressing CD14+/IL-10+ in the adult offspring showed no difference between experimental groups and CONTROL group to different stimuli (Figure

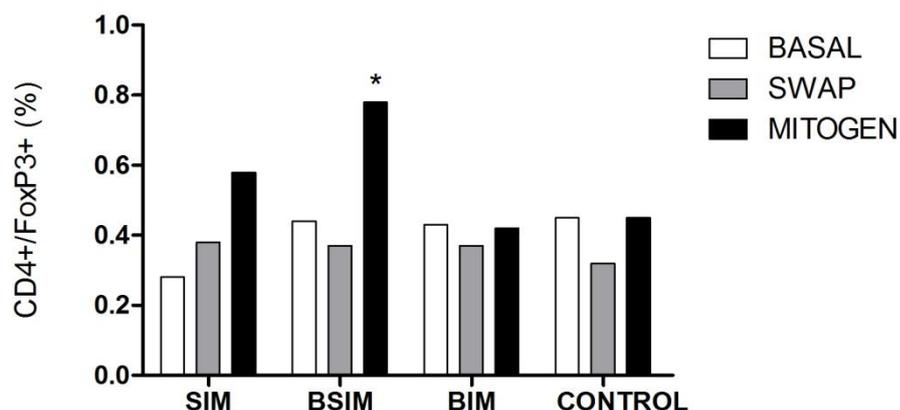
1B).



**Figure 1.** Splenic cells cultured for 24h expressing (A) CD16/32+NOS-2+; (B) CD14+IL-10+. *Swiss webster* infected mice (80 cercariae) BIM, SIM or BSIM from *S. mansoni* infected mothers. 60 days post-infection had their splenocytes cultured under different conditions: without stimulation (BASAL), presence of SWAP (12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or Concanavalin A (MITOGEN) (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cells were labeled with antibodies conjugated to fluorescent substances and analyzed by flow cytometry. The results represents the mean frequency of the dual-labeled spleen cells (n = 7). The results is one representative study from three independent studies.\*p<0,05 compared to CONTROL group.

*Cells frequency expressing CD4+/FoxP3+ of infected offspring of schistosomic mothers as adults*

It was labeled cells that express CD4+ and FoxP3+ and analysed by flow cytometry in experimental groups. In figure 2, it was observed a similar basal rate between experimental groups in comparison to CONTROL (SIM = 0,3%, BSIM = 0,4%, BIM = 0,4%, CONTROL = 0,4%). The same phenomenon was verified with SWAP stimulation (SIM = 0,4%; BSIM = 0,4%, BIM = 0,4%; CONTROL = 0,3%), but with ConA stimulation it was statistically higher frequency of these cells in BSIM group, two times higher compared to CONTROL group (SIM = 0,5%; BSIM = 0,8%; BIM = 0,4%; CONTROL = 0,4%) (Figure 2).



**Figure 2.** Splenic cells cultured for 24h expressing CD4+FoxP3+. *Swiss webster* infected mice (80 cercarie) BIM, SIM or BSIM from *S. mansoni* infected mothers. 60 days post-infection had their splenocytes cultured under different conditions: without stimulation (BASAL), presence of SWAP (12,5 µg/mL) or Concanavalin A (MITOGEN) (5 µg/mL). Cells were labeled with antibodies conjugated to fluorescent substances and analyzed by flow cytometry. The results represents the mean frequency of the dual-labeled spleen cells (n = 7). The results is one representative study from three independent studies.\*p<0,05 compared to CONTROL group.

*Production of cytokines and nitric oxide by cultured splenocytes of the infected descendants of schistosomotic mothers as adults*

The basal production of IL-4 between experimental groups and CONTROL was similar, as well as in response to SWAP antigenic stimulation. Otherwise, with mitogen stimulation there was lower production of this cytokine in BIM group in comparison to CONTROL and the other experimental groups (Figure 3A).

Regarding IL-5 production, was statistically less basal production in SIM group and higher production in BIM group in comparison to CONTROL. However, comparing this cytokine production between experimental groups, it was observed that SIM and BSIM groups had less production in relation to BIM group. The antigenic stimulation with SWAP in the different experimental groups showed no difference in comparison to CONTROL group, nevertheless it was observed decreased production in SIM and BSIM group in comparison to BIM group. The experimental groups, when cultured with ConA showed no difference in relation to CONTROL group (Figure 3B).

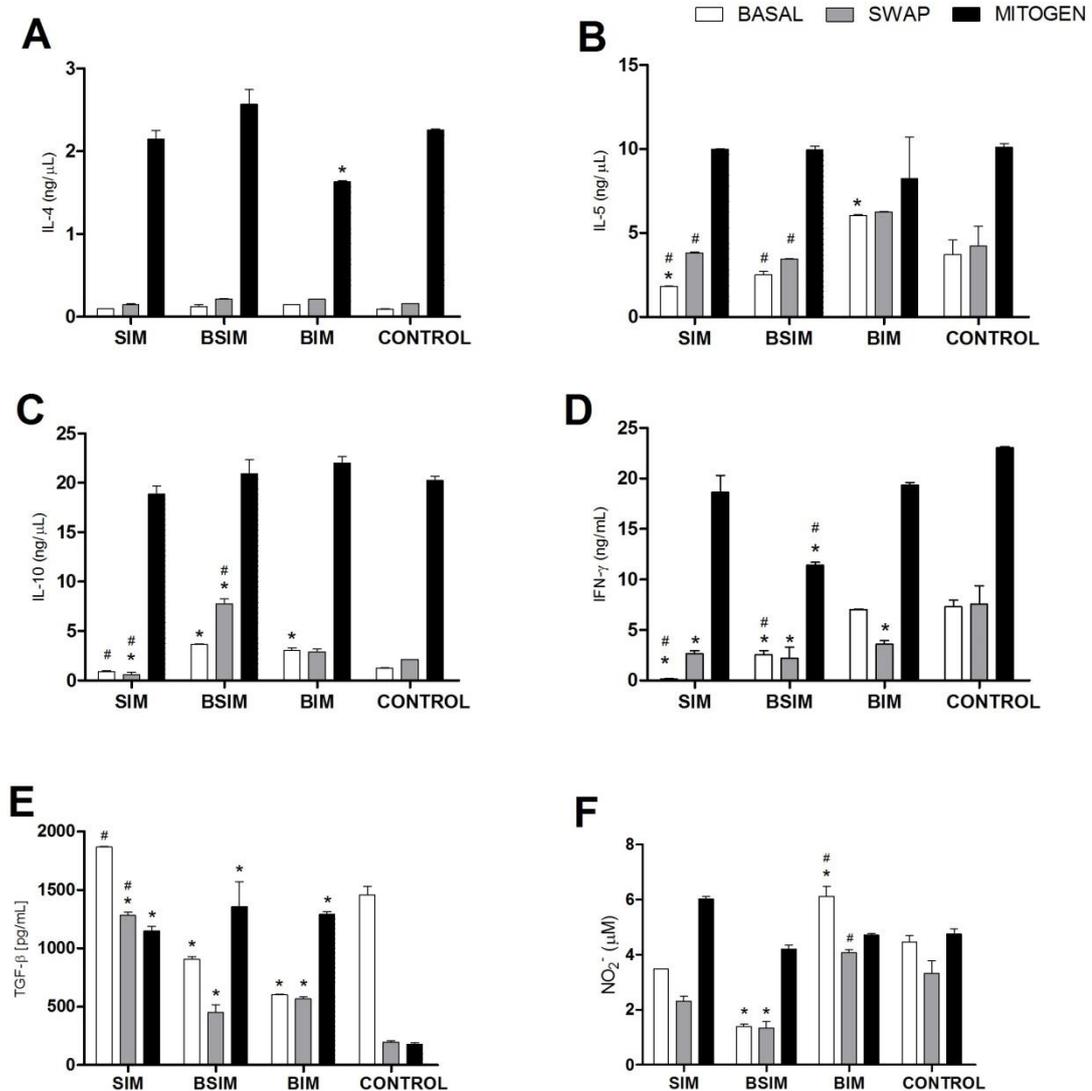
In the BSIM and BIM groups was observed that the basal production of IL-10 (Figure 3C) was higher when compared with CONTROL group. The SIM group showed basal production similar to CONTROL group, although in relation to BIM group the production was shown to be decreased. The SWAP stimulation in culture led to decreased production of IL-10 by SIM group, however, increased the production by BSIM group in comparison to CONTROL group. The same was observed when the comparison was made with BIM group. Under ConA stimulation it was not verified difference between groups of study.

When performed the dosage of IFN- $\gamma$  (Figure 3D), there was lower basal production in SIM and BSIM groups in comparison to CONTROL and BIM groups. In culture with SWAP all groups had lower levels than the CONTROL group. The ConA stimulation led to decreased levels in BSIM group compared to CONTROL.

The TGF- $\beta$  production (Figure E) at basal level was lower in BSIM and BIM groups when compared to CONTROL and SIM groups. When cultured with SWAP there was an increase of the production of this cytokine by all experimental groups compared to

CONTROL group. However, had higher level in SIM group. With mitogen stimulation there was an increase of the production by all experimental groups in relation to CONTROL group.

The NO dosage (Figure 3F) in spleen cells culture supernatant showed that at basal production the BSIM group had lower level of this molecule compared to CONTROL group. The BIM group produced high levels in comparison to CONTROL, SIM and BSIM groups. Stimulated with SWAP, the culture of BSIM group had less NO produced compared to CONTROL and the BIM group had more production of NO only when compared to SIM group. With ConA, the NO production from all experimental groups showed no difference with CONTROL group.



**Figure 3.** IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C), IFN- $\gamma$  (D), TGF- $\beta$  (E) e NO (F) secreted by spleen cells. *Swiss Webster* infected mice (80 cercariae) BIM, SIM or BSIM from *S. mansoni* infected mothers. 60 days post-infection had their splenocytes cultured for 24h to IL-4 and IL-5 production and for 72h to IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and NO

production under different conditions: without stimulation (BASAL), presence of SWAP (12,5 µg/mL) or Concanavalin A (MITOGEN) (5 µg/mL). Cytokines were quantified in supernatants harvested by sandwich ELISA. The results represent the mean ± standard deviation for 7 animals/group. With resulting detection limits of 0,076 ng/mL for IL-4, 0,15 ng/mL for IL-5, 0,61 ng/mL for IFN-γ, 0,31 ng/mL for IL-10, 62,5 pg/mL for TGF-β and 1,56 µM/mL for NO. The results are showing one representative of three independent experiments. \*: p < 0.05 compared with control group. #: p < 0.05 compared with the other experimental groups.

## Discussion

In this study of experimental infection with *S. mansoni*, as expected, there was evolution to granuloma formation in the liver (CONTROL animals) accompanied with more IL-10 producing macrophages than NO producing macrophages. Although we can not claim to be M1 and M2 macrophages due to the need for multiple markers, we believe that this marks the chronic phase. (WILSON et al., 2007; GORDON; MARTINEZ, 2010). As the cytokine production profile showing a mixed Th1 (IFN-γ;NO) and Th2 (IL-4; IL-5), but in the presence of IL-10, TGF-β and FoxP3+ cells (SOUZA et al., 2011; BARSOUM et al., 2013). Although we have used *in vitro* stimulation with SWAP for sharing larval antigens that are candidates for vaccination study (GABER et al., 2010), these findings may be due to both immunomodulatory effects of worms (GUSTAVSON et al., 2002; CARDOSO et al., 2010) and eggs antigens (McKEE; PEARCE, 2004; TAYLOR et al., 2006; ZHOU et al., 2015) *in vivo*.

It is known that maternal infections can negatively modulate the degree of immune competence of offspring in postnatal infections (ATTALLAH et al., 2006; OTHMAN et al., 2010; SANTOS et al., 2010; 2016). Corroborating these data offspring born and suckled in mothers infected with *S. mansoni* showed a granulomatous reaction decreased by smaller number and size of granulomas, lower IFN-γ and nitric oxide and increased levels of cytokines and cells with regulatory phenotype. However, the dynamics of the immune response has changed in infected animals there were only generated or breastfed in schistosomotic mothers.

Animals that only had previous contact *in utero* with parasitic components and/or antibodies (BIM group), presented the number and size of hepatic granulomas larger than those born and suckled animals (BSIM group). In fact, descendants only born from schistosomotic mothers were positively modulated the granulomatous reaction (SANTOS et al., 2016). Here, this findings was confirmed by the increase of NO synthase in macrophages and the production of NO, IL-5, in basal and in response to SWAP in the BIM group. These two molecules are involved in cellular architecture of granuloma, at the initial stage NO is proinflammatory leading to tissue injury, followed by the influx of eosinophils, IL-5

dependent.

The increased presence of IL-10 and TGF- $\beta$  accompanied by less IL-4 and IFN- $\gamma$  can explain the partial exacerbation of granulomatous reaction (no significance to the CONTROL group), in the BIM group. The uterine suppressor microenvironment character is rich in IL-10 and TGF- $\beta$ , which promotes Th2/Treg during pregnancy (MICHELON et al., 2006; SVENSSON et al., 2014). In schistosomiasis this characteristic seems to be amplified, since animals that had contact in utero showed IL-10 levels higher than animals born and suckled in uninfected mothers (CONTROL) and animals only suckled in infected mothers (SIM) (SANTOS et al., 2010; 2014). Although the BIM group has a greater granulomatous reaction than the BSIM group, the production of regulatory cytokines may lead to survival of these animals.

In relation to the prior contact with schistosomotic mothers milk is known of its potential to change the degree of immune competence of their offspring because of the presence of parasite antigens or antibodies antiparasite and modulatory cytokines (LENZI et al., 1987; COLLEY et al., 1999; BLEWETT et al., 2008; BHARGAVA et al., 2012). Here, animals only breastfed in schistosomotic mothers have a greater number of producing NO synthase macrophages in relation to CONTROL group, with larger size of the granulomatous reaction compared to BSIM group. Nevertheless, the SIM group has increased production of NO, IL-4 or IL-5 and reduced IFN- $\gamma$ . These data suggest a control in the granulomatous response mediators of these descendants, that appears to be TGF- $\beta$ , but not IL-10 dependent. In fact, the basal production of TGF- $\beta$  in these animals is accompanied by less IL-5 and IFN- $\gamma$ . In addition, breastfeeding in schistosomotic mothers was the best condition that induce the production of TGF- $\beta$  in response to SWAP.

Together, its possible to infer that breastfeeding has a modulating effect that is able to control the immune response to granulomatous reaction. This effect was best observed in animals born and suckled in infected mothers (BSIM group).

In BSIM group the reduction of granuloma size and number was evident and there was a higher IL-10 synthesis, TGF- $\beta$  and the presence of CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> cells. This phenomenon was also observed by Santos et al. (2016) in BSIM group, but was not observed the presence of CD4<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> cells. These authors intervened with immunization with protein antigen in complete Freund's adjuvant, which contains muramyl dipeptide that when connected to the pattern recognition molecules associated with pathogens (PRRs) on APCs induce signal cascade resulting in APC activation and promoting an immune response effectors optimized

(KENZIL et al., 2004; GUY, 2007), over the counterregulation of Tregs.

This data indicate an increase of IL-10 and TGF- $\beta$  in BSIM group and they are respectively dependent on pregnancy and breastfeeding and raise an epigenetic effect in the offspring of schistosomotic mothers.

It is known that epigenetic markers can be refurbished during the period of development (ATTIG et al., 2010; FALL 2013), studies will be conducted to obtain information on potential therapeutic targets for improving the immune response of individuals who have had prior contact with parasite antigens during breastfeeding and/or *in utero*. In conclusion, gestation followed by breastfeeding in schistosomotic mothers is more efficient in control granulomatous reaction in the offspring. Breastfeeding only was able to impair both Th1 and Th2 responses, with high levels of TGF- $\beta$ , so that Treg cells seem to play a crucial role in this phenomenon. These findings help to clarify the effects of maternal infection by *S. mansoni* in the immunomodulation of granulomatous reaction in individuals from endemic areas. Also emphasize the use of parasite antigens and immunomodulatory tools, early in life, together with breastfeeding in the modulation of chronic inflammatory responses.

### References

- AMU, S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **J. Allergy Clin. Immunol.**, n. 125, n. 5, p. 1114-1124, 2010.
- ATTALLAH, A. M. et al. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. **Parasitol. Res.**, New Damietta City, v. 99, n.2, p.137-145, 2006.
- BAGHERI, M.; DONG, Y.; ONO, M. Molecular Diversity of Macrophages in Allergic Reaction: Comparison between the Allergic Modes; Th1- and -Th2-Derived Immune Conditions. **Iran J. Allergy Asthma Immunol.**, June, v. 14, n. 3, p. 261-272, 2015.
- BARRIE, J. A.; GRANT, A. R.; DONALD, P. M. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 28, p. 572-579, 2012.
- BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human schistosomiasis: clinical perspective: review. **J. Advanc. Res.** v. 4, n. 5, p. 433-444, 2013.
- BHARGAVA, P. et al. Immunomodulatory glycan LNFPIII alleviates hepatosteatosis and insulin resistance through direct and indirect control of metabolic pathways. **Nat. Med.** v. 18, n. 11, p. 1665-1672, 2012.
- BLEWETT, H. J. H. et al. The immunological components of human milk. **Adv. Food Nutr. Res.** v. 54, p. 45-80, 2008.
- BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Paras. Immunol.** v. 31, n. 4, p. 163-176, 2009.
- CARDOSO, L. S. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a

- murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 160, n. 2, p. 266-274, 2010.
- CHENG, F. et al. Divergent roles of histone deacetylase 6 (HDAC6) and histone deacetylase 11 (HDAC11) on the transcriptional regulation of IL10 in antigen presenting cells. **Mol. Immunol.**, v. 60, n. 1, p.44-53, 2014.
- COLLEY, D. G. et al. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. **Microbes infect.** v. 1, n. 7, p. 517-524, 1999.
- COOMBES, J. L. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. **J. Exp. Med.** v. 204, n. 8, 1757-1764, 2007.
- EL-AHWANY, E. et al. Regulatory cell responses to immunization with a soluble egg antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **The Korean Journal of Parasitology**, v 50, n. 1, p. 29-35, 2012.
- FAIRFAX, K. et al. Th2 responses in schistosomiasis. **Semin Immunopathol.**, Nov; v. 34, n. 6, p. 863-871, 2012.
- GABER, H. M. et al. Immune Responses in Mice after Immunization with Antigens, from Different Stages of the Parasite *Schistosoma mansoni*. **Z. Naturforsch.**, v. 65 c, p, 289-302, 2010.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative Activation of Macrophages: mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (<sup>15</sup>N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.
- GUSTAFSSON, C. et al. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. **J. Reprod. Immunol.**, v. 71, n. 1, p. 41-56, 2008.
- GUSTAVSON, S. et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol. Int.**, Sep, v. 51, n. 3, p.259-269, 2002.
- GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Rev.**, v. 5, n. 7, p. 505-516, 2007.
- HERBERT, D. R. et al. Arginase I suppresses IL-12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 184, n. 11, p. 6438-6446, 2010.
- HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of l-arginine metabolism. **J. Immunol.**, v 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.
- HIRSCH, C. et al. Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. **Parasitology**, Jul, v. 115 (Pt 1), p. 21-28, 1997.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 14, n. 6, p.397-400, 1972.
- KENSIL, C. R.; MO, A. X.; TRUNEH, A. Current vaccine adjuvants: an overview of diverse

- class. **Front. in Biosci.**, v. 1, n. 9, p. 2972-2988, 2004.
- LA FLAMME, A. C, et al. IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 166, n. 3, p. 1903-1911, 2001.
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.
- LENZI, J. A. et al. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, supl. 4, p. 257-267, 1987.
- LOKE, P. et al. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4+T cells to be sustained during chronic infection. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 3926-3936, 2007.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **J. Pathol.**, v. 229, n. 2, p. 176-185, 2013.
- MARTINEZ, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 13, p. 453-461, 2008.
- McKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 1224-31, 2004.
- MICHELON, T. et al. Imunologia da gestação. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2, p. 145-151, 2006.
- OTHMAN, A. A.; SHOHEIB, Z. S.; SAIED, A. M. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: Impact on the future immune response and the disease outcome. **Immunobiol.**, v. 215, n. 2, p. 101-112, 2010.
- PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Exp. Medicine**, v. 173, n. 1, p. 159-166, 1991.
- RUTITZKY, L. I.; HERNANDEZ, H. J.; STADECKER, M. J. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 23p. 13243-13248, 2001.
- SANTOS, P. A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosome mothers differently modulate the immune response of adult offspring to postnatal *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 2, p. 83-92, 2016.
- SANTOS, P. A. et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression in antigen-presenting cells from adult offspring mice. **Experimental Parasitol.**, v. 141, p. 62-67, 2014.
- SANTOS, P. A. et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. **Parasitol. Res.**, v. 101, n. 1, p. 95-102. 2010.
- SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.
- SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras. Clín. Med.**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.
- SVENSSON, J. et al. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. **J. Immunol.**, v. 187, n. 7, p.

- 3671-3682, 2011.
- TAYLOR, J. J., MOHRS, M.; PEARCE, E. J. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J. Immunol.**, n. 176, n. 10, p. 5839-5847, 2006.
- WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 241, n. 1, p. 241-259, 2011.
- WHO - World Health Organization 2015. Schistosomiasis. Disponível em: <[who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/](http://who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/)>. Acessado em: 04 Fe. 2016.
- WOLFS, I. M. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. **FASEB J.**, v. 28, n. 1, p. 288-299, 2014.
- WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**. v. 496, n. 7446, p. 445-455, 2013.
- XU, D. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania major* infection, and colitis in mice. **J. Immunol.**, v. 170, n. 1, p. 394-399, 2003.
- YANG, J. et al. *Schistosoma japonicum* egg antigens stimulate CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. **Immunol.** v. 120, n. 1, p. 8-18, 2007.
- ZHOU, S. et al. Heat Shock Protein 60 in Eggs Specifically Induces Tregs and Reduces Liver Immunopathology in Mice with Schistosomiasis Japonica. **PLoS One**. v. 10, n. 9, p. 1-17, doi: e0139133, 2015.
- ZHU, J. et al. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Parasit. Vectors**, v. 7, n. 122, p. 122-131, doi: 10.1186/1756-3305-7-122, 2014.

## APÊNDICE C

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

**The Memórias' content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors.** The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz has decided to simplify the requirements regarding the format of submitted manuscripts. From now on, all manuscripts may be submitted in any text format as long as the common subdivision of scientific articles are followed, e.g. introduction, materials and methods, results, discussion and references. For Reviews, Perspectives and similar articles, authors may use the sections that best suit the structure and content of the proposed manuscript. All manuscripts should contain, besides the title and abstract, full details of authors and institutions, acknowledgements of any technical or financial assistance as well as state any conflicts of interest. This flexible text format will be used for the initial analysis and peer review. If the manuscript is accepted, authors will be requested to edit the text in accordance with the publication style of the Memórias."

Upon acceptance, the manuscript should be arranged in the following format:

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.

**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.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)

[Ex: **An. (Nyssorhynchus) atacamensis** González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)

[Ex: **An. pictipennis** of Rueda et al. (2008): 448.]

**Diagnosis** (or Description; all stages are described);

**Type host** (when it is the case);

**Site of Infection** (when it is the case);

**Type-locality;**

**Type data and depository;**

**Other material examined** (when it is the case);

**Distribution;**

**Host-parasite data** (such prevalence and other important data, when it is the same case);

**Bionomics;**

**Etymology;**

**Taxonomic discussion** (or simply DISCUSSION as internal title).

**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.**

## REFERENCES MUST BE CREATED IN WORD PROCESS

To assure your references is published as requested, please send archives without Mendeley Hyperlink or similar. References created with edition marks will cause improper corrections during editing process, causing delays.

---

### THE TITLE 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. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1922; 14(1): 05-61.

### Book and Thesis

Forattini OP. Entomologia médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose. Vol. IV. São Paulo: Edgard Blucher; 1973. 658 pp.

Morel CM. Genes and antigens of parasites. A laboratory manual. 2nd ed. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1983. xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC. 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. *hislopilii* N.E.B (Euphorbiaceae) [PhD Thesis]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2005. 85 pp.

### Chapter in book

Cruz OG. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In: Ross R, The prevention of malaria. London: John Murray; 1911. 390-8.

### Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [Internet]. 2002 [cited 2002 Aug 12]; 102(6). 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] [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 [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](http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html).

**Part of a database on the Internet**

MeSH Browser [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002. Meta-analysis; 2003 [cited 2003 Jun 10]; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

**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.

**Technical Notes:** Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be not divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as

supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

**Short communications:** should communicate rapidly single results or techniques. They 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 three key words must be provided.

**Genome Announcement and Highlights:** this section is dedicated to publish new genome information from eukaryote parasites, virus, bacteria and their respective vectors. Authors who wants a fast peer review and publication cycle for their research results covering new genome sequences, re-sequencing and comparative genome analysis as well as the expression pattern of genomes are invited to submitted papers under the short communication format.

**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/unifreq/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.

**In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.**

**A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.**

**ONCE A PAPER IS ACCEPTED FOR PUBLICATION, THE AUTHORS MUST PROVIDE:**

**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.

**Fonte:** <http://memorias.ioc.fiocruz.br/instructions-to-authors>

## ANEXO A

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


 Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Recife, 27 de abril de 2015

**Carta – Resposta**

**Projeto nº 70/2014**

Ao pesquisador (a): Virginia Maria Barros de Lorena

Informo que o projeto: **Avaliação de macrófagos (M1 e M2) e a capacidade estimuladora de linfócitos T de camundongos esquistossomóticos descendentes de mães esquistossomóticas em resposta a antígenos parasitários e à ovalbumina**, proposto por V.S. teve as suas respostas às pendências avaliadas pelos pareceristas e foi aprovado pela CEUA/CPqAM em 27/04/2015.

Dessa forma, segue, anexo o respectivo Certificado de Aprovação expedido pela Secretaria da CEUA/CPqAM.

Cordialmente,

  
 Dr<sup>a</sup> Sheila Andrade de Oliveira  
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Dr<sup>a</sup> Sheila Andrade de Oliveira  
 Coordenadora da Comissão de Ética  
 no Uso de Animais – CEUA  
 Mat. SIAPE 1554975  
 e-mail: sheila@cpqam.fiocruz.br  
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rêgo, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE  
 Recife - PE - CEP: 50.670-420  
 Telefone: (51) 3461-3800/3461-3805 Fax: (51) 3461-3806