



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

EFEITO DA AMAMENTAÇÃO E GESTAÇÃO EM CAMUNDONGOS
SENSIBILIZADOS COM ANTÍGENO SOLÚVEL DO VERME DE
SCHISTOSOMA MANSONI (SWAP), NA RESPOSTA IMUNE DOS
DESCENDENTES ADULTOS.

MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

RECIFE-PE

2016

MARIA DA CONCEIÇÃO SILVA

EFEITO DA AMAMENTAÇÃO E GESTAÇÃO EM CAMUNDONGOS
SENSIBILIZADOS COM ANTÍGENO SOLÚVEL DO VERME DE
SCHISTOSOMA MANSONI (SWAP), NA RESPOSTA IMUNE DOS
DESCENDENTES ADULTOS.

ORIENTADORA: Dr^a Valdênia Maria Oliveira de Souza.

CO-ORIENTADORA: Dr^a Patrícia d'Emery Alves Santos.

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

RECIFE-PE

2016

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

S586e Silva, Maria da Conceição.
Efeito da amamentação e gestação em camundongos sensibilizados com antígeno solúvel do verme de *Schistosoma mansoni* (SWAP), na resposta imune dos descendentes adultos / Maria da Conceição Silva. – 2016.
149 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. *Schistosoma mansoni*. 2. Amamentação. 3. Gestação. 4. SWAP. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de. (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-114)

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 29 DE FEVEREIRO DE 2016.

Aos 29 (vinte e nove) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 9 horas, na Sala 13 do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Dissertação intitulada “EFEITO DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO, EM CAMUNDONGOS SENSIBILIZADOS COM ANTÍGENO SOLÚVEL DO VERME DE *Schistosoma mansoni* (SWAP), NA RESPOSTA IMUNE DOS DESCENDENTES ADULTOS” da aluna Maria da Conceição Silva, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza e coorientação pela Profa. Dra. Patrícia d’Emery Alves Santos. 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 23076.008443/2016-36 em 17/02/2016, composta pelos Professores: Vláudia Maria Assis Costa (Presidente da Banca), do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Iana Rafaela Fernandes, do Departamento de Medicina da UNINASSAU. 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, 29/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vláudia Maria Assis Costa

Profa. Dra. Iana Rafaela Fernandes Sales

Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

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

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André 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

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

DOCENTES COLABORADORES

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Marli Tenório Cordeiro

Aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram, e aos quais serei eternamente grata por todo amor, esforço e dedicação. E aos meus verdadeiros amigos, anjos em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Á Deus primeiramente pela dádiva da vida, e pela sabedoria e força concedida, para que assim pudesse vencer os diversos obstáculos ao longo dessa jornada, percebendo que o que eu chamo de problema, são apenas desafios.

Aos meus pais Joselma e Bonifácio, por me ensinarem o verdadeiro sentido do amor, por serem os melhores pais, por todos os anos de dedicação, amor, confiança, determinação e persistência, por me ensinarem o significado de humildade, lealdade, solidariedade, enfim por terem me tornado o ser humano que sou hoje, nada do que fale será o bastante para expressar o meu amor por vocês.

Aos meus avós, em especial a minha avó Severina (*in memorian*) que sempre foi um exemplo de garra e superação, e assim como todos sempre torceu pelo meu sucesso.

A todos os meus familiares que sempre apoiaram as minhas decisões, vibraram com as minhas conquistas.

Aos meus compadres Verônica e Jorge por terem me dado o privilégio de ser madrinha de um pequeno anjinho, Isabely, que veio para modificar a minha vida, com ela aprendi o valor de um sorriso verdadeiro, sincero e ingênuo, a melhor sensação dauque abraço inesperado e apertado.

A minha orientadora Prof^a Valdênia Souza, pela oportunidade oferecida, pela orientação desde a iniciação científica, pela confiança que sempre demonstrou no meu trabalho, por todos os ensinamentos repassados.

Á Dr^a Virgínia Lorena, com todo carinho, por tanta atenção e dedicação, pela sua disponibilidade e pelo privilégio de conviver com uma profissional exemplar.

A Dr^a Patrícia d'Emery, pela co-orientação durante a execução deste trabalho e pelos ensinamentos repassados.

A Rafaela e Erica, minhas primeiras co-orientadoras, por todo o conhecimento passado, pela ajuda em todos os momentos que precisei, pela compreensão, paciência atenção, dedicação e amizade.

As minhas queridas alunas de iniciação científica: Letícia, Patrícia Evelyn e Yeda, por toda ajuda, pelos momentos de descontração, pela companhia nos experimentos, mesmo nos momentos mais complicados, por além de ensinar-lhes o pouco que sei, me proporcionarem o privilégio de a cada dia aprender mais e mais.

A todos do setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami: Cássia, Erica, Patrícia Evelyn, Letícia, Yeda, Gabriela, Patrícia d'Emery, Roeckson,

Wheverton, André, Fabiana, Raul, Weverton, Amanda e Victor, pelo auxílio nos experimentos, pelos momentos de descontração.

As minhas melhores amigas: Marianne, Patrícia, Magda e Fabíola pelo apoio, por serem as melhores psicólogas, por acreditarem mais em mim do que eu mesma, pelas palavras ditas nos momentos de aflição onde tudo parecia sem sentido, por me fazerem acreditar que tudo passa.

A todos os profissionais que passaram ao longo da minha vida acadêmica, pois sempre estiveram ao meu lado ajudando a subir cada degrau e a vencer cada etapa neste longo trajeto.

A todos do biotério de experimentação do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, pela disponibilidade, e pelo cuidado com os meus camundongos, tornando o meu trabalho mais fácil.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Marthin Luther King

RESUMO

Descendentes adultos de mães esquistossomóticas demonstraram alteração da imunidade para antígenos homólogos e heterólogos, devido à gestação ou amamentação nestas mães. A gestação em descendentes, sob infecção pós-natal concomitantemente imunizados com OA(ovalbumina)+adjuvante, demonstrou maior número de granulomas e alta deposição de colágeno enquanto que a amamentação diminuiu o tamanho. Para o antígeno heterólogo, ambas a gestação e a amamentação levaram à imunossupressão anti-OA. Contudo, sabe-se pouco sobre os efeitos da sensibilização materna com antígenos parasitários do verme do *S. mansoni* (SWAP). Aqui, as mães foram sensibilizadas com SWAP e foi avaliada a imunidade em descendentes nascidos e/ou amamentados. Para isto, descendentes adultos foram divididos em: animais nascidos de mães sensibilizadas e amamentados em mães não-sensibilizadas (MI), animais nascidos em mães não-sensibilizadas e amamentados em mães sensibilizadas (AI) ou nascidos e/amamentados (MIAI) em mães sensibilizadas e mães não-sensibilizadas (Controle). Estes descendentes foram infectados (80 cercárias de *S. mansoni*) e uma parte foi imunizada com OA+adjuvante. Realizou-se a dupla marcação para linfócitos T e coestimulatórias (CD4 e CD28, CD154 ou CTLA-4) e macrófagos (CD14 e CD40) em esplenócitos, sob estimulação com OA ou mitógeno (ConA). Foi realizada a dosagem das citocinas (IL-4, IL-10, IL-5 e IFN- γ), e anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP e antiOA, bem como a histomorfometria do granuloma hepático. Em relação ao Controle, os grupos AI e MIAI, sob infecção pós-natal apresentaram menor grau de fibrose e não houve diferença no grupo MI. Houve maior produção de IL-10 nos grupos MIAI, AI e MI, com diminuição de IL-5 e maior frequência de células CD14+CD40+ no primeiro e menor produção de IFN- γ e maior frequência de células CD4+CD28+ no segundo. No grupo MI, houve maior frequência basal de células CD4+CD28+ e CD14+CD40+, porém estiveram diminuídas em resposta ao mitógeno. Houve maior produção de isótipo IgG2a anti-SWAP em todos os grupos experimentais e de IgG1 anti-SWAP apenas no grupo AI. Para a imunidade anti-OA, no grupo MIAI, houve maior frequência de células CD14+/CD40, menor produção de IL-5 sem diferença na produção de anticorpos anti-OA. Amamentação induziu maior frequência de células CD4+/CD28, CD4+/CTLA-4, CD14+/CD40, maiores níveis de IL-4 e menos IFN- γ basal e em resposta à OA e maior produção de IgG1 anti-OA. A gestação induziu maior frequência basal de células CD14+/CD40+ e menor frequência em resposta à OA e ConA, maiores níveis de IL-4, em resposta à OA, sem diferença para IFN- γ . Em resposta ao mitógeno, menos células CD4+CD28+, alta frequência de células CD40/CD154, e altos níveis de IL-10. Assim, a amamentação, e não a gestação, em mães sensibilizadas com SWAP, seguida de infecção pós-natal ameniza a inflamação granulomatosa. Para o antígeno heterólogo, ambas gestação e amamentação desviam a resposta para Th2, porém a amamentação melhora o status de ativação de linfócitos e macrófagos, acompanhada de melhor resposta de anticorpos anti-OA.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. SWAP. Amamentação. Gestação.

ABSTRACT

Descendants adult schistosome mothers had alterations of immunity to homologous and heterologous antigens due to pregnancy or breastfeeding these mothers. The pregnancy in offspring in postnatal infection concomitantly immunized with OA (ovalbumin) + adjuvant, demonstrated great number of granulomas and high deposition of collagen, while suckled decreased size. For the heterologous antigen, both pregnancy and breastfeeding led to anti-OA immunosuppression. However, little is known about the effects of maternal sensitization with worm parasite antigens of *S. mansoni* (SWAP). Here, mothers were sensitized with SWAP and immunity was evaluated in born and / or breastfed offspring. For this, adult descendants were divided into animals born sensitized mothers and breastfed in non-sensitized mothers (BIM), animals born in nonsensitized and breastfeeding mothers sensitized mothers (SIM) or born and / breastfed (BSIM) in mothers sensitized mothers and non-sensitized (CONTROL). These offspring were infected (80 cercariae of *S. mansoni*) and a part was immunized with adjuvant + OA. Was performed for double labeling T lymphocytes and co-stimulatory (CD4 and CD28 or CTLA-4 CD154) and macrophages (CD14 and CD40) in splenocytes, OA or upon stimulation with mitogen (ConA). the dosage of cytokines was performed (IL-4, IL-10, IL-5 and IFN- γ) and IgG1 and IgG2a anti-SWAP and anti-OA and histomorphometry of hepatic granuloma. In relation to control, SIM and BSIM groups under postnatal infection had lower degree of fibrosis and no difference in BIM group. There was a greater IL-10 production in BSIM groups, SIM and BIM, with decreased IL-5 and increased frequency of CD14⁺ CD40⁺ in the first and lowest IFN- γ and increased frequency of CD4⁺ CD28⁺ in the second. In the BIM group had higher baseline frequency of CD4⁺CD28⁺ and CD14⁺CD40⁺ cells, but were reduced in response to mitogen. There was a higher production of isotype IgG2a anti-SWAP in all experimental groups and anti-IgG1 SWAP only in the SIM group. For the anti-OA immunity in BSIM group had a greater frequency of CD14⁺/ CD40 cells, decreased production of IL-5 with no difference in the production of anti-OA antibodies. Breastfeeding induced higher frequency of CD4⁺/CD28⁺ CD4⁺/CTLA-4⁺, CD14⁺/ CD40⁺ increased IL-4 levels under basal and IFN- γ and in response to OA and increased production of anti-OA IgG1. Pregnancy induced basal frequency of CD14⁺/ CD40⁺ and lower frequency in response to OA and Con-A, increased IL-4 levels in response to OA was no difference for IFN- γ . In response to mitogen less CD4⁺ CD28⁺ cells, CD40 high-frequency cells CD154, and high IL-10 levels. Thus, breastfeeding, and not pregnancy in mothers sensitized with SWAP, followed by postnatal alleviates granulomatous inflammation infection. For the heterologous antigen, both pregnancy and breastfeeding divert the response towards Th2, but breastfeeding enhances activation status of lymphocytes and macrophages, together with better anti-OA antibody response.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. SWAP. Breastfeeding. Gestation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imunização, acasalamento, formação dos grupos, infecção dos descendentes.....	34
Figura 1. Frequência de células esplênicas CD4+CD28+, CD4+CD154+, CD4+CTLA-4+ e CD14+CD40+ em descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal.....	51
Figura 2. Níveis das citocinas IL-5, IFN- γ , IL-4 e IL-10 secretadas por descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal.....	52
Figura 3. Títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP nos soros de descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal.....	53
Figura 1. Frequência de células esplênicas CD4+CD28+, CD4+CD154+, CD4+CTLA-4+ e CD14+CD40+ em descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal e imunização com OA.....	67
Figura 2. Frequência de células esplênicas CD14+CD40+, em descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal e imunização com OA.....	68
Figura 3. Níveis das citocinas IL-5, IFN- γ , IL-4 e IL-10 secretadas por descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal e imunização com OA.....	69
Figura 4. Títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OA nos soros de descendentes adultos de mães sensibilizadas com SWAP, submetidos a infecção pós-natal e imunização com OA.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Quantidade de ovos/g de fezes, recuperação de vermes, número e tamanho dos granulomas hepáticos e deposição de colágeno observados em camundongos nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos/amamentados (MAI) em mães sensibilizadas com SWAP, infectados com 80 cercárias de <i>S. mansoni</i>	50
--	----

.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CD	Cluster of differentiation (Grupo de diferenciação)
Cepa BH	Cepa Belo Horizonte
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IFN- γ	Interferon gama
LNFP-III	Lactofucopentose III
M1	Macrófagos classicamente ativados
M2	Macrófagos alternativamente ativados
OA	Ovalbumina
PIII	Fração do SWAP (Antígeno purificado solúvel do verme)
P24	Fração do PIII
SEA	Soluble egg antigen (Antígeno Solúvel do Ovo de <i>S. mansoni</i>)
SWAP	Soluble worm antigen purification (Antígeno purificado solúvel do verme de <i>S. mansoni</i>)
TGF- β	Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Tregs	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Imunomodulação na esquistossomose.....	21
2.2 Relação materno fetal e esquistossomose para antígeno homólogo.....	24
2.3 Relação materno fetal e esquistossomose para antígeno heterólogo.....	26
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Desenho de estudo.....	32
4.2. Local de estudo.....	32
4.3. Animais	32
4.4. Sensibilização subcutânea com SWAP.....	33
4.5. Sangria parcial para obtenção do plasma das mães sensibilizadas.....	33
4.6 Operacionalização e formação dos grupos de estudo.....	33
4.7. Infecção dos descendentes.....	33
4.8. Imunização com ovalbumina.....	34
4.9. Cultura de células esplênicas.....	34
4.10 Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem	35
4.11 Dosagem das citocinas nos sobrenadantes.....	36
4.12. Dosagem das imunoglobulinas.....	36
4.13 Estudo histomorfométrico do tecido hepático.....	37
4.14. Variáveis.....	37
4.14.1 Variáveis Independentes.....	37
4.14.2 Variáveis Dependentes.....	37
4.15 Análise estatística.....	37
5.RESULTADOS.....	39
Efeito da amamentação e gestação em mães sensibilizados com antígeno do verme de <i>Schistosoma mansoni</i> na resposta granulomatosa dos descendentes.....	40
Sensibilização materna com antígeno solúvel do verme de <i>Schistosoma mansoni</i> (SWAP) e a influência da gestação e amamentação, em resposta à ovalbumina, nos descendentes adultos.....	59
6CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICES.....	83
APÊNDICE A- VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	84
APÊNDICE B- VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS	105

APÊNDICE C Análise histomorfométrica, carga parasitária e recuperação de vermes.....	122
APÊNDICE D- Títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP em mães sensibilizadas antes e durante a gestação.....	123
ANEXOS	
ANEXO A- Parecer da Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA CPqAM- FIOCRUZ PE).....	125
ANEXO B- Normas de submissão do artigo a revista Parasite Immunology.....	127
ANEXO C- Normas de submissão do artigo a revista Brasileira da Sociedade de Medicina Tropical.....	141

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é considerada uma doença de curso crônico, tendo como característica marcante a reação granulomatosa. Os ovos não eliminados se alojam nos tecidos hepático e intestinal e liberam antígenos solúveis, que induzem uma forte resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 e eosinófilos), modulam negativamente a resposta Th1, além de induzirem a fibrose (KULLBERG et al. 1992; PEARCE e MacDonald 2002; CHENSUE et al. 1994). Associada a resposta do perfil Th2, temos a estimulação dos linfócitos T regulatórios (Tregs) e IL-10, que auxiliam no controle do granuloma (MCKEE AND PEARCE, 2004; WINN 2007; CHUAH et al. 2013).

Nas áreas endêmicas, a prevalência de mulheres em idade fértil e gestantes cronicamente infectadas por *Schistosoma* é alta (FRIEDMAN et al., 2007, SALAWU; ODAIBO, 2013). Exposição materna a componentes parasitários do *S. mansoni* no período gestacional e via amamentação, modulam a resposta imune dos descendentes para antígenos homólogos e heterólogos (ATTALAH et al. 2006; OTHMAN et al. 2010; SANTOS et al. 2010; 2014; 2016; STRAUNBINGER et al. 2014). Neste contexto, Santos e colaboradores (2016), num modelo experimental de infecção pós-natal pelo *S. mansoni* seguida de imunização com OA+CFA observaram que a gestação resultou em exacerbada resposta granulomatosa, (maior número de granulomas e alta deposição de colágeno) e para o antígeno heterólogo levou a supressora da imunidade anti-OA. Do contrário, a amamentação controla a reação granulomatosa (menor tamanho dos granulomas), acompanhada de supressão da imunidade anti-OA, com notável presença de células CD4+CD25+FoxP3+.

Muitos são os estudos utilizando antígenos parasitários do *Schistosoma*, a fim de demonstrar seu potencial como ferramenta imunomodulatória, tendo destaque o uso do antígeno solúvel do verme (SWAP). Recentemente, foi demonstrado que a imunização com o SWAP e suas frações levam à uma forte resposta imune humoral e são capazes de reduzir a reação granulomatosa (menor número e tamanho do granuloma). Além disso, houve redução da proliferação celular, indução de baixos níveis de INF- γ e altos níveis de IL-10, que são possíveis mecanismos para a modulação do granuloma (SULBARAN et al. 2013; ZOUAIN et al. 2004; HIRSCH et al. 1996; REZENDE et al. 2011).

Em relação aos antígenos heterólogos, camundongos parasitados ou tratados com antígenos parasitários do verme, desafiados para ovalbumina (OA), demonstraram supressão

de resposta alérgica anti-OA, com menores níveis de citocinas Th2, maior indução de células T CD4+CD25+ e IL-10 e modulação negativa das respostas Th1 e Th2 (AMU et al. 2010; NASSEF et al. 2015; PACÍFICO et al. 2009).

Todavia o perfil de resposta desencadeada em descendentes de mães imunizadas com antígenos parasitários ainda não é bem esclarecido, tanto para antígenos homólogos quanto heterólogos.

Sendo assim, o presente trabalho se propôs a avaliar a resposta imune de descendentes, submetidos a infecção pós-natal e/ou imunizados com OA+adjuvante, que foram previamente gerados ou amamentados em mães sensibilizadas com SWAP, quando comparados aos descendentes de mães não-sensibilizadas. Para isso, avaliamos o status de ativação dos linfócitos T auxiliares, a capacidade de apresentação antigênica dos macrófagos, a quantificação e determinação do tamanho dos granulomas, a produção de citocinas e anticorpos.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença negligenciada e subnotificada, é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma*. É endêmica em 78 países distribuídos nos continentes Africano, Asiático e Americano, estatísticas globais demonstram que em média 600 - 780 milhões de indivíduos estão sobre risco de adquirir a infecção, sendo a maioria crianças, e aproximadamente 200-250 milhões de indivíduos estão infectados por alguma das espécies do gênero *Schistosoma* e, destes, 120 milhões apresentam os sintomas clínicos e 20 milhões a doença grave (STEINMANN et al. 2006; TALLIMA et al. 2009; UTZINGER et al. 2010; WHO, 2013, 2014; CARVALHO et al. 2008).

No Brasil a única espécie encontrada é o *Schistosoma mansoni* e aproximadamente 25 milhões de indivíduos vivem em área de risco, dos quais 4-6 milhões são infectados (LAMBERTUCCI, 2010), e a região Nordeste, principalmente o estado de Pernambuco, exibem as maiores prevalências, tendo 46 municípios da zona da mata como regiões endêmicas (BARBOSA et al. 2006, 2013).

A doença apresenta duas formas clínicas: uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda caracteriza-se por febre, dor de cabeça, mialgia, fadiga, tosse seca, leucocitose e eosinofilia denominando-se febre de Katayama, (CALDAS et. al. 2008; GRYSEELS, 2012). A fase crônica, tem como evento patogênico marcante da fase crônica, a formação do granuloma, com a oviposição. Os ovos não eliminados, se alojam nos tecidos, principalmente hepático e intestinal, e liberam antígenos solúveis, estimulando intensamente a resposta imunológica, acarretando a formação do granuloma, que ao mesmo tempo pode ser benéfica, ao controlar o dano ocasionado pela alta toxicidade dos antígenos, e prejudicial pois uma resposta exacerbada resulta na fibrose, processo fisiológico em resposta a injúria tecidual que consiste na excessiva deposição de matriz extracelular em substituição ao tecido danificado (HAMS et al. 2013).

Na infecção pelo *S. mansoni*, os mecanismos da imunidade inata são ineficazes, com o intuito de proteger o hospedeiro, a imunidade adaptativa é desencadeada, por duas populações principais: os linfócitos B que são os mediadores da resposta imune humoral e os linfócitos T que são os reguladores centrais da imunidade celular. Os linfócitos T são divididos em linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺ e linfócitos T auxiliares (Th) ou CD4⁺ que após serem ativados, pela interação com APCs e sob o estímulo de citocinas se diferenciam em subtipos distintos (Th1 e Th2) (ROCHA; TANCHOT, 2004; STOCKINGER; BOURGEOIS;

KASSIOTIS, 2004). Com o avanço nas pesquisas experimentais, outros tipos de linfócitos T foram descritos: as células T regulatórias (Tregs), e as células Th17, bem como Th9 e Th22.

Estudos com camundongos infectados pelo *S. mansoni*, verificaram que durante a fase aguda (antes da oviposição) ocorre a ativação e predominância de um perfil de resposta Th1, induzido contra os esquistossômulos e formas imaturas adultas, caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ e IL-12 (SOUZA et al. 2011; PEARCE et al. 1991). Neste ambiente com uma forte resposta Th1, é favorável a indução de ativação clássica de macrófagos (M1), subtipo que apresenta uma alta capacidade microbicida, secretam citocinas pró-inflamatórias como IL-12, ativam células da imunidade adaptativa, e são importantes durante a reação granulomatosa, ao inibirem a atividade fibrótica, por intermédio da liberação de fatores pró-fibróticos e anti-fibrogênicos, como as metaloproteinasas. (ANTONNY et al. 2012; XU, 2014). Após a oviposição, ocorre uma imunomodulação e a resposta Th1 torna-se diminuída com queda dos níveis de mediadores pró-inflamatórios (IFN- γ e IL-2) e aumento de citocinas de perfil Th2, por exemplo, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. Estas citocinas são induzidas principalmente pelos antígenos dos ovos e são fundamentais na formação do granuloma, no recrutamento de eosinófilos e no processo de fibrogênese (BURKE et al. 2009; CALDAS et al. 2008).

Durante a formação do granuloma, diversas células participam, entre elas as células mononucleares, eosinófilos, neutrófilos, células B e macrófagos alternativamente ativados (M2). Os macrófagos M2 são ativados pelas citocinas IL-4 e IL-13, e estão totalmente envolvidos na fibrogênese, na remodelação tecidual e angiogênese, secretam citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β (ANTONNY et al. 2012; XU, 2014). Com a evolução da doença, o infiltrado eosinofílico iniciado ao redor dos ovos, vai sendo substituído gradativamente por depósitos fibróticos. Uma citocina fundamental no processo fibrogênico é a IL-13, pela sua capacidade de induzir a transdiferenciação das células estreladas hepáticas em miofibroblastos, principal fonte de deposição de matriz extracelular durante a esquistossomose. Chiaromonte e colaboradores (2001) em estudos experimentais com camundongos deficientes para IL-13, demonstraram ausência de fibrose e de deposição de colágeno, elucidando o papel desta citocina na fibrogênese. Associada a resposta do perfil Th2, temos a estimulação dos linfócitos T regulatórios e IL-10, que auxiliam no controle do granuloma, protegendo o hospedeiro do agravamento da doença (MCKEE AND PEARCE, 2004; WINN, 2007; CHUAH et al. 2013). Esta regulação via Th2/Treg, está associada a baixa prevalência do desenvolvimento da fase crônica e complicações mais severas nos indivíduos que habitam as áreas endêmicas (CALDAS et al. 2008).

Apesar da conhecida ação imunomodulatória do SEA, Jacobs e colaboradores (1997) demonstraram, em estudos com animais sensibilizados por vermes de um único sexo, que os antígenos do verme também participam do processo de formação do granuloma e deposição de colágeno. Foi demonstrado que a imunização com o SWAP e suas frações levam à uma forte resposta imune humoral e são capazes de reduzir a reação granulomatosa (menor número e tamanho do granuloma). Além disso, houve redução da proliferação celular, indução de baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-10, que possíveis mecanismos para a modulação do granuloma (SULBARAN et al. 2013; ZOUAIN et al. 2004; HIRSCH et al. 1996; REZENDE et al. 2011).

O PIII, antígeno derivado do SWAP, medeia a imunidade anti-parasita e diminui a hipersensibilidade granulomatosa para ovos de *S. mansoni* (HIRSCH, 1996). Gustavson e colaboradores (2002) em estudos *in vivo* e *in vitro*, avaliando a influência da transferência de macrófagos pulsados com frações antigênicas do SWAP, demonstraram regressão na resposta granulomatosa, com redução em torno de 60% no tamanho do granuloma, além de altos níveis de IFN- γ e IL-2 e baixos níveis de IL-4.

Outros estudos com as mais variadas frações antigênicas, tem demonstrado que além do PIII, ser capaz de diminuir a reação granulomatosa, reduz a proliferação celular, induz baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-10. Outro antígeno oriundo do PIII, é o P24, o mesmo desempenha funções semelhantes ao PIII, tendo como possíveis mecanismos para a modulação do granuloma, os altos níveis de IL-10 e a produção de IgG1 (ZOUAIN et al. 2004; HIRSCH et al. 1997). Quanto a resposta imune humoral, a imunização com SWAP, apesar de demonstrar baixos níveis de imunoglobulinas de todas as classes, promovem uma proteção parcial, com uma modulação do granuloma. (GABER et al. 2010). No entanto, quando são usadas frações do SWAP, como 30-kDa, 31-kDa e 32- kDa foi observada uma melhor resposta humoral com significativa proteção contra uma posterior infecção (ATTALAH et al. 2004; CHLICHLIA et al. 2001).

No entanto, Rezende e colaboradores (2011) sugeriram que apesar do efeito gerado pela imunização com uma única fração, o maior efeito protetor, pode não está associado a uma fração isolada. De fato, Cardoso e colaboradores (2006) demonstraram que antígenos do verme são hábeis em induzir IL-10 pelas células de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Interessantemente, Amu e colaboradores (2010) relataram que células B regulatórias (CD5+/CD1d+/IL-10+), em camundongos adultos infectados apenas pelos vermes machos do *S. mansoni*, foram relacionadas com o recrutamento de células Tregs para o pulmão e consequente supressão de resposta alérgica anti-ovalbumina (OA).

Durões e colaboradores (2009) observaram que durante a fase inicial de infecção pelo *S. mansoni*, contato com antígenos parasitários do verme, desencadearam ativação de células dendríticas, regulação positiva na expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40 e CD86) e indução na produção de citocinas como IL12p40 e TNF- α . Imunização com antígenos do tegumento do *S. mansoni*, além de reduzir a carga parasitária e a eliminação dos ovos, demonstra uma elevação nos níveis de anticorpos IgG2c específicos, aumento na frequência de células CD4+CD25+, CD19+, ativação dos macrófagos demonstrada pelo aumento na frequência de células F4+80+ e F4+86+, e altos níveis de IFN- γ e IL-4 e baixos níveis de IL-10 (MELO et al, 2013).

Estudo com a sensibilização dos camundongos com o SWAP demonstram a indução de uma forte resposta imune humoral, com redução na recuperação de vermes e consequentemente nos ovos alojados no tecido hepático, redução no tamanho e no peso dos fígados, menor número e tamanho do granuloma, bem como uma redução do infiltrado inflamatório (SULBARAN et al 2013).

Diante destes dados e sabendo do potencial modulador do SWAP, aqui nos perguntamos sobre a influência da sensibilização materna com SWAP na resposta imune homóloga em descendentes infectados na vida adulta.

2.2. RELAÇÃO MATERNO FETAL NA ESQUISTOSSOMOSE PARA HOMÓLOGO

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

Devido à alta prevalência de mulheres grávidas e lactantes cronicamente infectadas (FRIEDMAN et. al., 2007), diferentes estudos têm sugerido que a exposição a anticorpos e antígenos, durante o período pré-natal ou a amamentação, estão associadas com a modulação da resposta imune dos descendentes para antígenos homólogos (HANG; BOROS; WARREN, 1974; MONTESANO et. al. 1999; ATTALLAH et. al. 2003; CALDAS et. al. 2008).

Os estudos experimentais com *Schistosoma* sugerem que tanto a exposição de antígenos do parasita, como a de anticorpos durante o período pré-natal e amamentação, podem modular a resposta imune, demonstrada por uma resposta granulomatosa menor ou até mesmo ausente, (ATTALLAH et al. 2006; COLLEY et. al. 1999; HANG et. al., 1974; LENZI et. al. 1987).

Othman e colaboradores (2010) estudando a progressão da esquistossomose mansônica em camundongos provenientes ou não de mães infectadas, observaram que a intensidade da infecção (número de granulomas e fibrose hepática) foi menor em descendentes de mães esquistossomóticas, com maior expressão do gene da IL-12 e do TGF- β , citocinas reguladoras para o perfil Th2, nos animais nascidos e amamentados em mães infectadas.

Sabendo da possibilidade de infecção pós-natal, em indivíduos de áreas endêmicas. Santos e colaboradores (2016), num modelo experimental de infecção pelo *S. mansoni* observaram que a gestação resultou em exacerbada resposta granulomatosa, com maior número de granulomas e alto grau de fibrose, enquanto que a amamentação controla a reação granulomatosa com menor grau de fibrose.

O leite materno de mães esquistossomóticas tem potencial em alterar o grau de competência imune dos seus descendentes, devido ao seu caráter imunomodulatório dicotômico, com potencial tolerogênico e estimulador (FIELD, 2005; BLEWETT et al. 2008). Colley e colaboradores (1999) observaram que camundongos que receberam no período de amamentação, anticorpo específico para os antígenos dos ovos solúveis de *Schistosoma* (SEA) e foram, na vida adulta, infectados apresentaram aumento na produção de anticorpos anti-SEA e menor reação granulomatosa. Experimentalmente, foi observado que os descendentes adultos previamente amamentados em mães esquistossomóticas (amamentação adotiva) apresentaram uma potencialização da produção de anticorpos anti-OA e maior produção de IL-2 (SANTOS et al. 2010).

Estudos *in vitro*, com linfócitos B imaturos cultivados com o leite de mães esquistossomóticas, demonstraram uma maior expressão das moléculas CD40 e CD80, favorecendo o status de ativação. 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. Além disso, o contato prévio com o leite materno de mães esquistossomóticas, predispõe a uma frequência basal de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, e num modelo de asma alérgica experimental houve uma supressão da reação inflamatória (SALES et al. 2012; SANTOS et al. 2014, 2016).

É sabido que 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, além da indução de células Tregs (CD5+/CD1d+) (THOMAS; HARN, 2004; MANGAN, et al. 2004; TIAN, et al. 2015). Então, é provável que associação entre o microambiente supressor da mucosa intestinal e a presença de componentes parasitários no leite materno sejam responsáveis pela amplificação dessas

propriedades (WEINER et al. 2011; (EL-AHWANY et al. 2012).

Com relação a gestação, o microambiente gestacional é caracterizado como um compartimento imunoinibitório, principalmente pela produção de IL-10 por células dendríticas (DCs) e macrófagos *in útero*/tecidos de interação placentária (HEIKKINEN et al., 2003; BLOIS et al., 2004). A tolerância fetal é favorecida principalmente pela indução de macrófagos alternativamente ativados (M2) que atuam via IL-10 (GUSTAFSSON et al. 2006; SVENSSON et al. 2011).

Com relação ao microambiente uterino, o microambiente gestacional tem sido caracterizado como um compartimento imunossupressor, principalmente pela produção de IL-10 por células dendríticas (DCs) e macrófagos *in útero*/tecidos de interação placentária (HEIKKINEN et al. 2003; BLOIS et al. 2004). 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). Então, gestação em mães esquistossomóticas parece favorecer a produção de IL-10 e o status supressivo que é mantido a longo prazo na vida adulta. De fato, em descendentes apenas gerados houve grande produção de IL-10, além de diminuir a capacidade estimulatória de células dendríticas (SANTOS et al, 2010, 2014)

2.3. RELAÇÃO MATERNO FETAL NA ESQUISTOSSOMOSE PARA HETERÓLOGO

Do ponto de vista imunológico, outro aspecto importante do contato com antígenos parasitários do *S. mansoni* é o fenômeno imunomodulatório da resposta imune a antígenos não-relacionados ao parasito no hospedeiro (SABIN et al. 1996; ELIAS et al. 2005) e que parece ser perpetuado no descendente.

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

Estudo recente que avalia a proteção transferida para os descendentes em diferentes estágios da infecção pelo *Schistosoma*, demonstraram que gestação no estágio Th1 da

esquistossomose, é capaz de conferir proteção aos descendentes quando desafiados na vida adulta para inflamação das vias aéreas induzidas por ovalbumina (STRAUBNGER, et al. 2014). Nos descendentes adultos provenientes de mães esquistossomóticas, que foram amamentados houve modulação da resposta para os antígenos heterólogos, visualizada pela potencialização da resposta imune anti-OA e melhor capacidade de apresentação de antígenos pelos linfócitos B sob estimulação com OA. Do contrário, os animais que foram expostos *in utero* apresentaram uma resposta imune humoral heteróloga suprimida e uma fraca apresentação de antígenos pelas APCs (SANTOS et al, 2010, 2014)

Sabendo da possibilidade de infecção na vida adulta ao habitarem regiões endêmicas, avaliou-se a resposta para antígeno heterólogos em descendentes infectados pós-natalmente e imunizados com OA+CFA. Para a imunidade anti-OA, foi demonstrado que a gestação manteve a imunidade supressora anti-OA, frente a infecção pós-natal, com supressão da reação de hipersensibilidade imediata, presença de células Tregs e IL-10. A infecção nos animais que tiveram contato prévio com leite materno, levou à supressão da resposta anti-OA, intensificou o “background” supressivo via Tregs, acompanhado de diminuída produção de IFN- γ e uma supressão ainda maior da reação de hipersensibilidade imediata *in vivo* (SANTOS et al. 2016).

Estudos para antígenos heterólogos vem demonstrando o potencial imunomodulatório dos antígenos parasitários, o SWAP. Num modelo experimental de diabetes Tipo 1 e tipo 2, células T de camundongos diabéticos não obesos, imunizados com SWAP, produziram IL-10, que atua modulando e prevenindo o desenvolvimento da diabetes auto-imune, por intermédio da indução de células Tregs, bem como, do diabetes tipo 2, além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares (CARDOSO et.al. 2012; EBERLE et.al. 2012; ZACCONE et al. 2003).

Ainda neste contexto, os antígenos parasitários e suas frações em modelos *in vitro* são capazes de modular a resposta imune inflamatória induzida por antígenos de *Leishmania* em pacientes com Leishmaniose cutânea. Os antígenos PIII e SmTSP2 são hábeis para diminuir o status de ativação dos monócitos, regulam positivamente a expressão de moléculas modulatórias como o CTLA-4 em linfócitos T, expandem a frequência de células Tregs, baixos níveis de IFN- γ e TNF- α e altos níveis de IL-10, além de aumentarem a frequência de monócitos expressando IL-10 (ARAUJO et al. 2011; BAFICA, et al. 2012).

Cardoso e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos imunizados com diversos antígenos do parasita, como Sm 22-6, Sm 29 e o PIII, complexo proteico derivado do SWAP, quando desafiados para OA, apresentaram níveis baixos de IgE-OA específica, modulação da resposta inflamatória das vias aéreas e elevada frequência de células T CD4+ Foxp3+ de citocinas do perfil Th2. Além disso, camundongos parasitados ou tratados com

antígenos dos ovos do *S. mansoni* adquiriram uma maior resistência ao desenvolvimento da resposta alérgica pulmonar anti-ovalbumina, sendo evidenciado menores níveis de citocinas Th2, eosinófilos, anticorpos IgE anti-OVA e maior indução de células T regulatórias CD4+CD25+ (SMITS et al. 2007; PACÍFICO et al. 2009).

O estudo da influência da gestação e da amamentação, separadamente, em mães infectadas pelo *S. mansoni* na resposta imune dos seus descendentes, frente ao antígeno heterólogo, ovalbumina (OA), tem sido foco do nosso grupo de estudo. Todavia o perfil de resposta desencadeada em descendentes de mães imunizadas com antígenos parasitários ainda não é bem esclarecido, para antígenos homólogos e heterólogos.

Diante destes dados, o presente projeto se propôs, investigar o efeito imunomodulatório em descendentes previamente gerados ou amamentados em mães imunizadas com SWAP quando comparados aos descendentes de mães não-imunizadas. Para isso, avaliamos o status de ativação dos linfócitos T efetores, a capacidade de apresentação antigênica dos macrófagos, a quantificação e determinação do tamanho dos granulomas, a deposição de colágeno e os níveis de imunoglobulinas antígeno-específicas. Os resultados encontrados poderão fornecer melhor entendimento e uma revisão do impacto que a gestação e a amamentação em mães parasitadas provocam na resposta imune de indivíduos de área endêmica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Determinar nos descendentes adultos nascidos e/ou amamentados em mães sensibilizadas com SWAP (soluble adult worm antigen preparation), submetidos à infecção pós-natal e/ou imunização com ovalbumina, o status de ativação dos linfócitos T auxiliares, a capacidade de apresentação antigênica dos macrófagos, a quantificação e determinação do tamanho dos granulomas, a deposição de colágeno e os níveis de imunoglobulinas antígeno-específicas.

3.2 Objetivos específicos:

Comparar nos descendentes adultos infectados e/ou imunizados, nascidos e/ou amamentados em mães sensibilizadas com SWAP versus mães não-sensibilizadas:

3.2.1 A análise histopatológica dos fígados para quantificação e determinação do tamanho dos granulomas e avaliação da deposição de colágeno.

3.2.2 O perfil dos linfócitos T auxiliares (CD4, CD28, CTLA-4 e CD154), em resposta ao mitógeno e ovalbumina, nas células esplênicas.

3.2.3 A frequência de CD14, CD40 na população de macrófagos, em resposta ao mitógeno e ovalbumina, nas células esplênicas.

3.2.4 Os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OA e anti-SWAP.

3.2.5 A produção das citocinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ) *in vitro* nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos;

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho de estudo

Realizou-se um estudo experimental e intervencionista, onde o grupo de camundongos fêmeas sofreu a intervenção (sensibilização com SWAP) e o outro grupo que serviu para termos de comparação dos resultados. Temos como vantagens deste modelo de estudo, condições controladas de observação e a facilidade em mimetizar de maneira experimental esquistossomose humana, além da facilidade de realização devido as questões éticas serem menores. Entretanto, não será possível afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis em seres humanos.

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

4.2 Local do estudo

As etapas do estudo relacionadas à imunização, acasalamento, manutenção das mães sensibilizadas, foram realizadas no Biotério do Centro de Pesquisas 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 e Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). As análises por citometria de fluxo foram realizadas no Núcleo de Integração Tecnológica (NPT-1) do CPqAM/FIOCRUZ.

4.3 Animais

Foram utilizados 15 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss webster*, com 4 semanas de idade que foram sensibilizadas de maneira subcutânea com SWAP (soluble adult worm antigen preparation), 10 camundongos fêmeas não-infectadas que serviram como controle e 13 camundongos machos da mesma espécie foram utilizados para o acasalamento. Os animais foram fornecidos e mantidos em adequadas condições no biotério experimental do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

4.4 Sensibilização subcutânea com SWAP

Quinze camundongos fêmeas *Swiss Webster* foram injetados 100µg/camundongo de SWAP na proporção 1:1(vol/vol) em adjuvante hidróxido de alumínio (Aziram, União Química) volume total de 0,1mL.

4.5 Sangria parcial para obtenção do plasma das mães sensibilizadas

Para avaliar a produção de anticorpos, as fêmeas sensibilizadas com SWAP foram sangradas no 8º e 19º dia pós-sensibilização. O sangue foi coletado pela veia safena lateral (0,3 mL de sangue), com capilar heparinizado e foi diluído em 0,6mL de PBS. Posteriormente os tubos com sangue diluído foram centrifugados a 413 x g por 10 minutos. Os plasmas foram estocados a -20°C para posterior dosagem dos isótipos dos anticorpos (IgG1 e IgG2a anti-SWAP).

4.6 Operacionalização e formação dos grupos de estudo

Foram utilizados 25 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* com 4 semanas de idade. Destas, 15 fêmeas foram submetidas a imunização com SWAP. No 8º dia, ocorreu a sincronização do estro e acasalamento. Paralelamente, para formação do grupo controle, outras 10 fêmeas não-infectadas também tiveram seu estro sincronizado e acasalaram. Para formação dos grupos de estudo, parte dos filhotes de mães sensibilizadas foram amamentados em mães não-sensibilizadas e a outra parte permaneceu sendo amamentando em suas próprias mães. Parte dos filhotes de mães não sensibilizadas foram amamentados em mães sensibilizadas e a outra parte permaneceu amamentando em suas próprias mães (Fig 1).

Após 45 dias, os filhotes machos foram selecionados e infectados com 80 cercárias do *S. mansoni*, após 60 dias de infecção uma parte dos filhotes foram imunizados com Ovalbumina em adjuvante completo de Freund (ACF) de acordo com os seguintes grupos: **Grupo 1 (MIAI)** - cinco animais nascidos e amamentados em mães sensibilizadas e infectados. **Grupo 2 (MIAI)** - cinco animais nascidos e amamentados em mães sensibilizadas, infectados e imunizados com OA. **Grupo 3(MI)** - cinco animais nascidos mães sensibilizadas e infectados. **Grupo 4 (MI)** - cinco animais nascidos mães sensibilizadas, infectados e imunizados com OA. **Grupo 5 (AI)** - cinco animais amamentados em mães sensibilizadas e infectados. **Grupo 6 (AI)** - cinco animais amamentados em mães sensibilizadas, infectados e imunizados com OA. **Grupo 7 (CONTROLE)** - cinco animais nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas e infectados. **Grupo 8 (CONTROLE)** - cinco animais nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas, infectados e imunizados com OA.

4.7 Infecção dos descendentes

Os filhotes adultos distribuídos de acordo com os diferentes grupos de estudo, foram infectados por via percutânea com 80 cercárias da cepa BH de *S. mansoni* e 60 dias após infecção foram imunizados com OA em CFA. Para a infecção dos descendentes foram utilizadas cercárias de *S. mansoni*, da cepa Belo Horizonte (BH), obtidas de caramujos infectados pela espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário do Departamento de Medicina Tropical (UFPE) pela equipe do Setor de Imunologia do LIKA/UFPE. Após 45 dias de infecção, foi realizado o parasitológico de fezes pelo método de Kato-Katz (KATZ, CHAVES E PELLEGRINO, 1972).

4.8 Imunização com ovalbumina

Os filhotes adultos distribuídos de acordo com os diferentes grupos de estudo, foram imunizados com ovalbumina em ACF após 60 dias da infecção. Para a imunização foi injetado na base da cauda (via sub-cutânea) 100µg/camundongo de Ovalbumina (OA) 5 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA), emulsificada na proporção 1:1 (vol/vol) em Adjuvante Completo de Freund - ACF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA) em volume total de 0,1mL.

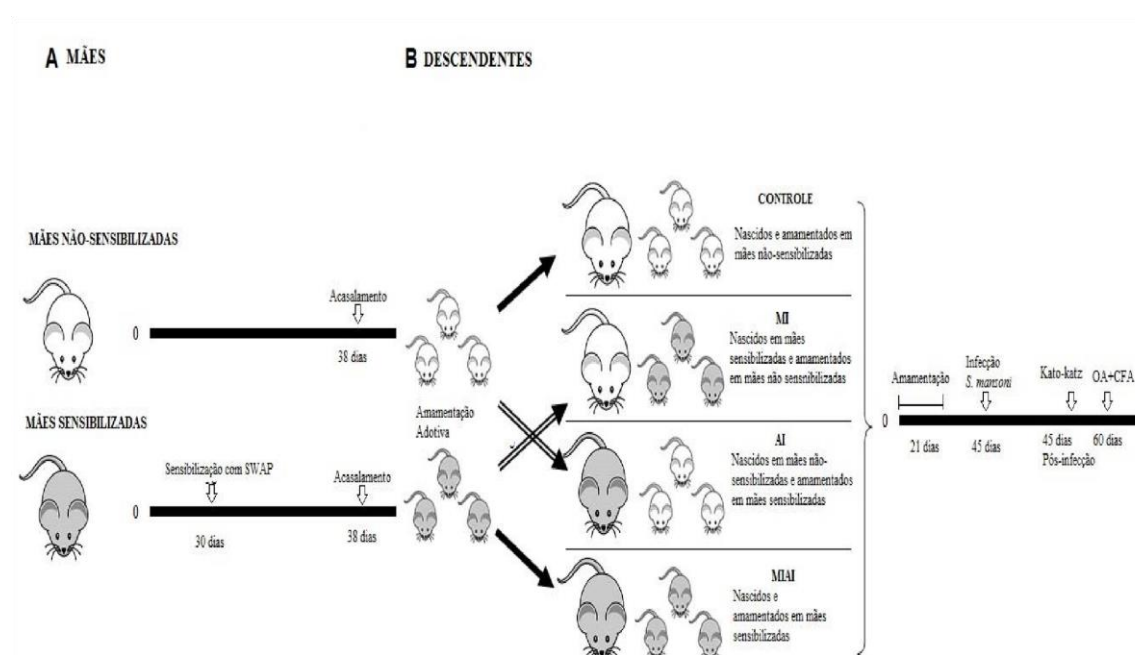


Figura 1 - Imunização, acasalamento, formação dos grupos, infecção dos descendentes

4.9 Cultura de células esplênicas

Foram obtidos os baços dos camundongos dos diferentes grupos de estudo, 8 dias após imunização com ovalbumina. As suspensões de células esplênicas foram então obtidas assepticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640 suplementado. Após centrifugação (413 x 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 ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo. USA), mantidas no gelo por 5 min para deposição do estroma e, após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo a contagem das células e o teste de viabilidade realizados com o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10% (90µl de Azul de Trypan a 10% + 10µl de suspensão de células)

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

4.10 Ensaio de citometria de fluxo para imunofenotipagem

Após 24 horas de cultivo foi adicionado a cada tubo contendo as suspensões de células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos, 5µL de Golgi Stop (para cada 5×10^6 células/mL), agitados em vórtex e devolvidas a estufa de CO₂ a 37°C por um intervalo de 4 horas. Passado este período de incubação, as células foram lavadas com 6mL de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado, em seguida foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos sob a temperatura de 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em PBS 0,01M + 5% de SBF estéril, no mesmo volume da cultura inicial e distribuídas nos tubos de citometria, sendo 100µL por tubo com concentração final de 1×10^6 células por tubo. Procedeu-se então à marcação celular com os anticorpos de superfície (anti-CD4; anti-CD28, anti-CTLA-4, anti-CD154, anti-CD14 e anti-CD40) sendo acrescentado ao tubo 0,5µL de cada anticorpo em ambiente escuro, seguido de agitação em vórtex e incubação por 30 minutos à 4°C no escuro. Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas uma vez com 1ml de PBS 0,01M + 5% de SBF estéril gelado com agitação em vórtex e posterior centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. Depois o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 200µL de tampão de fixação e as células foram incubadas por 15 minutos a 4°C no escuro, para posterior leitura no citômetro de fluxo. Os eventos (10.000 para linfócitos e 1000 para macrófagos) foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA).

4.11 Dosagem das citocinas nos sobrenadantes

Os sobrenadantes da cultura das células esplênicas, sob os diferentes estímulos acima descritos, foram coletados. Os níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ foram determinados por ELISA sanduíche, nos sobrenadantes dos tempos de 24 horas de cultivo. Placas de ELISA (2595, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura específico para cada citocina e incubadas à temperatura de 4°C por 18 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 30 minutos. Após lavagem e distribuição das amostras, as placas foram incubadas a 4°C por 18 h, 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 Chemical, St. Louis, Mo, USA). Em seguida à incubação à temperatura ambiente por 1 h, cada placa foi novamente lavada por três vezes com PBS-T e, então, adicionada o conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma 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 H₂O₂ e o cromógeno ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1M e fosfato de sódio 0,2M pH= 5,5 . A reação foi então bloqueada com ácido cítrico 0,2M e a leitura realizada a 405 nm em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550). As concentrações das citocinas nas amostras foram calculadas pelo programa Microplate Manager, versão 4.0, a partir de curvas padrão obtidas utilizando concentrações conhecidas das citocinas recombinantes. Os resultados foram apresentados como média aritmética + desvio padrão da média.

4.12 Dosagem de anticorpos antígenos específicos por ELISA

Os animais de todos os grupos foram sangrados no 60º dia após a infecção, por punção cardíaca, após anestesia intramuscular com Xilazina HCl/ Ketamina HCl. Os plasmas foram testados individualmente para dosagem dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP e anti-OA usando placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Roskilde, Denmark) sensibilizadas com SWAP (5 μ g/mL para IgG2a e 1,25 μ g/mL para IgG1) e OA (20 μ g/mL) e anticorpos de cabra específicos para IgG1 ou anti-mouse IgG2a conjugados à peroxidase (Southern Biotechninology Associates, Inc, AL, USA). As reações foram reveladas com solução de OPD (Ortho-phenyldiamine; Sigma) em tampão citrato 0,1M com H₂O₂. As placas foram lidas (450nm) no leitor de ELISA.

Curvas de titulação foram realizadas para todas as amostras. Os resultados foram expressos pela mediana das densidades óticas (D.O.) dos plasmas de cada grupo numa diluição apropriada (dentro da parte linear na curva de titulação) para cada isótipo $\pm$ erro padrão (1:32 para IgG1 e 1:8 para IgG2a anti- SWAP e 1:512 para IgG1 e 1:8 para IgG2a anti-OA).

4.13 Estudo histomorfométrico do tecido hepático

Após 60 dias da infecção, animais dos grupos Controle, AI, MI e MIAI, tiveram seus fígados retirados após anestesia e eutanásia, e foram fixados em formalina tamponada a 10%. Três fragmentos do tecido hepático em secções transversais dos três lobos foram coletados de cada animal. Secções histológicas horizontais (4 μ m) foram cortadas usando o microtomo Yamato (Japão) e os cortes foram corados com hematoxilina- eosina (HE) e Tricomico de Masson (seletivo para colágeno) para estudar a morfometria. O estudo foi realizado usando ImageJ Software (Nacional Institude Saude, Bethesda, MD) para mensuração da média do diâmetro (micrometer - μ m) dos granulomas e subsequente cálculo da área (μ m²), e intensidade da coloração azul (específico para colágeno) em histogramas. Análises foram realizadas em imagens randômicas obtidas de 10-20 campos/animal (100x).

4.14 Variáveis

4.14.1 Variáveis Independentes

Foram consideradas variáveis independentes a imunização subcutânea com o SWAP e OVA e a infecção pelo *S. mansoni*. Foram sensibilizadas fêmeas *Swiss webster* para a obtenção de descendentes nascidos ou amamentados em mães sensibilizadas, e os descendentes foram infectados com *S. mansoni* e imunizados com OA. As variáveis são consideradas dicotômicas (sim/não).

4.14.2 Variáveis Dependentes

As variáveis dependentes foram a expressão de CD4, CD28, CTLA-4, CD154, caracterizando o perfil de linfócitos T efetores, CD14 e CD40 na população de macrófagos e os níveis de citocinas produzidas por estas células (IL-10, IL-4, IL-5 e IFN- γ), a mensuração de necrose, infiltrado inflamatório e concentração de colágeno no parênquima hepático.

4.15. Análise estatística

Para os resultados de dosagem de imunoglobulinas e análise histopatológica os grupos foram comparados utilizando-se testes não-paramétricos. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e nos casos em que a análise se mostrou significativamente diferente, procedeu-se a comparação utilizando-se o teste de Mann-Whitney, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para os resultados das dosagens de citocinas, a comparação entre os diferentes grupos de animais foi feita utilizando-se análise de variância para dados paramétricos (ANOVA). Nos casos em que esta análise se mostrou significativamente diferente, procedeu-se a comparação múltipla segundo o método de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para análises estatísticas, foi usado o Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA) e considerados significativos valores de $p < 0,05$. Para os resultados da citometria de fluxo, foi considerada diferença significativa, frequência maior que 2 vezes para o fenótipo analisado. Os resultados mostram um experimento representativo de três repetições.

RESULTADOS

5.1. EFEITO DA AMAMENTAÇÃO E GESTAÇÃO EM MÃES SENSIBILIZADAS COM ANTÍGENOS DO VERME *SCHISTOSOMA MANSONI* NA RESPOSTA GRANULOMATOSA DOS DESCENDENTES.

INTRODUÇÃO

A prevalência de mulheres em idade fértil e gestantes cronicamente infectadas por *Schistosoma* é alta, em torno de 60% nas áreas endêmicas para esquistossomose (13). A esquistossomose mansoni, considerada uma doença de curso crônico, é marcada por uma reação granulomatosa e fibrótica, ao redor dos ovos do parasito presos no fígado e intestino (4). Contudo, não é comum nas regiões endêmicas casos graves decorrentes da resposta granulomatosa (5). Diversos estudos, já relataram que durante a reação granulomatosa, o SEA induz uma forte resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (6,7) e diminuição de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , MCP-1, VCAM-1 e CD68 (WOLFS et al. 2014), que regula negativamente a resposta Th1 induzida pelos antígenos do verme (SWAP) (8). Associada a resposta do perfil Th2, ocorre a estimulação dos linfócitos T regulatórios (Tregs) e IL-10, que auxiliam no controle do granuloma, protegendo o hospedeiro do agravamento da doença (10-12). De modo interessante, este fenômeno parece ser mantido em descendentes adultos durante infecções pós-natais.

Em camundongos, durante infecção materna pelo *Schistosoma mansoni*, foi demonstrada a sensibilização nos descendentes, pela exposição *in utero* e via amamentação e que houve menor tamanho e número de granulomas hepáticos, bem como menor recuperação de vermes. Além disso, maior expressão do gene de citocinas reguladoras IL-12 e TGF- β , (13,14). Neste cenário, Santos e colaboradores (2016) estudaram a influência da gestação e da amamentação, separadamente, em mães esquistossomóticas. Estes autores demonstraram que a gestação em mães infectadas levou uma resposta granulomatosa exacerbada (intensa deposição de colágeno e maior número de granulomas) nos descendentes infectados na vida adulta. Este efeito foi revertido pela amamentação em mães infectadas, visto que levou à diminuição da intensidade de infecção e atenuação da reação granulomatosa.

Há décadas, tem sido realizados estudos da capacidade imunomodulatória dos antígenos do *Schistosoma*, para uso como ferramenta de atenuação da resposta granulomatosa (16,17). Dentre estes estudos, destacam-se o uso do antígeno solúvel do verme (SWAP). Em modelos experimentais, houve diminuição da hipersensibilidade granulomatosa para ovos de *S. mansoni* em camundongos que foram sensibilizados com antígenos do verme e posteriormente

infectados (18). Gustavson e colaboradores (2002) relataram que a transferência de macrófagos pulsados com frações antigênicas do SWAP, levou à redução de 60% no tamanho do granuloma, além de altos níveis de IFN- γ e IL-2 e baixos níveis de IL-4. Além disso a sensibilização com os antígenos do verme induz uma forte resposta imune humoral, redução na recuperação de vermes, redução no tamanho e peso dos fígados, menor número e tamanho do granuloma, com menor infiltrado inflamatório (20,21).

Durães e colaboradores (2009) observaram que durante a fase inicial de infecção pelo *S. mansoni*, contato com antígenos parasitários do verme, desencadearam ativação de células dendríticas, regulação positiva na expressão de moléculas co-estimulatórias (CD40 e CD86) e indução na produção de citocinas como IL12p40 e TNF- α . Imunização com antígenos do tegumento do *S. mansoni*, além de reduzir a carga parasitária e a eliminação dos ovos, aumento na frequência de células CD4+CD25+, CD19+, ativação dos macrófagos demonstrada pelo aumento na frequência de células F4+80+ e F4+86+, e altos níveis de IFN- γ e IL-4 e baixos níveis de IL-10 (23).

Deste modo, sabendo do potencial imunorregulatório do SWAP, nós investigamos a resposta imune de descendentes previamente gerados ou amamentados em mães sensibilizadas com este antígeno, quando comparados aos descendentes de mães não-sensibilizadas. Foram avaliados a reação granulomatosa, o status de ativação dos linfócitos T auxiliares, a capacidade de apresentação antigênica dos macrófagos, produção de anticorpos e citocinas. Os nossos resultados demonstraram que a amamentação em mães sensibilizadas com o SWAP, reduz a deposição de colágeno e frente à estimulação policlonal, mantém aumentada a frequência de linfócitos T CD28+ e células CD14+/CD40+, enquanto que a gestação induz um potencial supressor, com altos níveis de IL-10.

METODOLOGIA

Sensibilização materna com SWAP e acasalamento

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss webster*, com 4 semanas de idade foram sensibilizadas, subcutaneamente, com 100 μ g/camundongo de SWAP (24, 25 modificado) em adjuvante hidróxido de alumínio (Aziram, União Química). As fêmeas foram acasaladas, sendo 1 macho para cada 2 fêmeas (1:2) e foi observada a formação do “plug” vaginal para confirmação do acasalamento. Os mesmos procedimentos foram realizados nas fêmeas não-sensibilizadas. Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil. Todos os protocolos experimentais

foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FIOCRUZ-PE (CEUA-70/2014).

Formação dos grupos de estudo e infecção dos descendentes

Após o nascimento, parte os filhotes de mães sensibilizadas e de mães não sensibilizadas tiveram suas mães trocadas para a amamentação adotiva. Desta forma quatro grupos foram formados (n=7): Descendentes nascidos em mães sensibilizadas foram amamentados em mães não-sensibilizadas (MI), descendentes nascidos em mães não-sensibilizadas foram amamentados em mães sensibilizadas (AI). Outra parte permaneceu amamentando em suas própria mães sensibilizadas (MIAI) ou não imunizada (CONTROLE). Os camundongos machos, seis semanas de vida, foram infectados, percutaneamente, com 80 cercárias de *S.mansoni* da cepa Belo Horizonte (BH). Após 45 dias a infecção foi confirmada pelo método de Kato-Katz.

Dosagem de anticorpos anti-SWAP específico por ELISA

Os animais de todos os grupos foram sangrados no 60º dia após a infecção, por punção cardíaca, após anestesia intramuscular com Xilazina HCl/ Ketamina HCl. Os plasmas foram testados individualmente para dosagem dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP usando placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Roskilde, Denmark) sensibilizadas com SWAP (5 µg/mL para IgG2a e 1,25 µg/mL para IgG1) e anticorpos de cabra específicos para IgG1 ou anti-mouse IgG2a conjugados à peroxidase (Southern Biotechninology Associates, Inc, AL, USA). As reações foram reveladas com solução de OPD (Ortho-phenyldiamine; Sigma) em tampão citrato 0,1M com H₂O₂. As placas foram lidas (450nm) no leitor de ELISA. Curvas de titulação foram realizadas para todas as amostras. Os resultados foram expressos pela mediana das densidades óticas (D.O.) dos plasmas de cada grupo numa diluição apropriada (dentro da parte linear na curva de titulação) para cada isótipo ± erro padrão (1: 32 para IgG1 e 1:8 para IgG2a).

Cultura de células esplênicas

Os baços dos descendentes foram retirados, assepticamente, após eutanásia por sobredose de anestésico. Suspensões de células esplênicas foram obtidas assepticamente em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com HEPES (10mM), 2 mercaptoetanol (0,05mM), 216mg de L-glutamina, gentamicina (50mg/mL) e 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas numa concentração final de 5x10⁶ células/mL, em tubos de 8mL e estimuladas com Con-A (5µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C em

estufa de CO₂ 5%, e após 24h os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção das citocinas e as células foram recuperadas e submetidas à marcação pra citometria de fluxo.

Dosagem de Citocinas

Os níveis das citocinas foram determinados por ELISA sanduíche utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: para IL-4, 11B11 e BVD6-24G2 biotinilado; para IFN- γ , AN18 e XCM1.2 biotinilado; IL-5, 39D10 e 5A10 biotinilado e IL-10, C2522A5e SXC-1 biotinilado. Ocorreu adição de estreptoavidinaperoxidase (Sigma-Aldrich) e as reações foram reveladas com solução ABTS (2-2-azinobis (3ethylbenzenethiazoline-6-sulfonic acid); Sigma) em tampão citrato 0,1M com H₂O₂. As placas foram lidas (405nm) no leitor de ELISA. As quantidades de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas com base nas curvas-padrões dos recombinantes purificados das citocinas, obtidas com concentrações de 0,3125 a 10ng/mL (rIL-4), 0,1562 a 5ng/mL (rIL-5) de 0,3125 a 20ng/mL (rIFN- γ) e 0,3125 a 20ng/mL (rIL-10).

Imunofenotipagem das células

As células esplênicas dos descendentes machos de todos os grupos foram submetidas à dupla-marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, As células foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células/mL com PBS+SBF 5% estéril e as marcações foram realizadas aos pares com adição de 1 μ L dos anticorpos de marcação: CD4 (FITC) com CD28 (PE) ou CTLA-4 (PE) ou CD154 (PE), bem como, CD14 (FITC) e CD40 (PE). A aquisição das células duplamente marcadas e a análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) do CPqAM/FIOCRUZ. Para os resultados da citometria de fluxo, foi considerado estatisticamente significante a diferença 2 vezes maior nos fenótipos encontrados entre os grupos.

Histomorfometria do tecido hepático

Após 60 dias da infecção, animais dos grupos Controle, AI, MI e MIAI, tiveram seus fígados retirados após anestesia e eutanásia, e foram fixados em formalina tamponada a 10%. Três fragmentos do tecido hepático em secções transversais dos três lobos foram coletados de cada animal. Secções histológicas horizontais (4 μ m) foram cortadas usando o microtomo Yamato (Japão) e os cortes foram corados com hematoxilina- eosina (HE) e Tricomico de Masson (seletivo para colágeno) para estudar a morfometria. O estudo foi realizado usando ImageJ Software (Nacional Instituto de Saude, Bethesda, MD) para mensuração da média do diâmetro (micrometer - μ m) dos granulomas e subsequente cálculo da área (μ m²), e intensidade

da coloração azul (específico para colágeno) em histogramas. Análises foram realizadas em imagens randômicas obtidas de 10-20 campos/animal (100x).

Análise estatística

Para os resultados de dosagem de imunoglobulinas e análise histopatológica os grupos foram comparados utilizando-se testes não-paramétricos. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e nos casos em que a análise se mostrou significantemente diferente, procedeu-se a comparação utilizando-se o teste de Mann-Whitney, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para os resultados das dosagens de citocinas, a comparação entre os diferentes grupos de animais foi feita utilizando-se análise de variância para dados paramétricos (ANOVA). Nos casos em que esta análise se mostrou significativamente diferente, procedeu-se a comparação múltipla segundo o método de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para análises estatísticas, foi usado o Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA) e considerados significativos valores de $p < 0,05$. Para os resultados da citometria de fluxo, foi considerada diferença significativa, frequência maior que 2 vezes para o fenótipo analisado. Os resultados mostram um experimento representativo de três repetições.

RESULTADOS

Estudo histomorfométrico do tecido hepático de descendentes de mães sensibilizadas com SWAP e infectados na vida adulta

Foi realizado o estudo histomorfométrico no fígado dos descendentes gerados e/ou amamentados em mães sensibilizadas com SWAP, quando infectados na vida adulta. Em comparação aos descendentes de mães não sensibilizadas (CONTROLE), não houve diferença na recuperação dos vermes e no tamanho dos granulomas dos grupos experimentais (Tabela 1; Apêndice A). Apesar de não haver diferença estatística, foi observado nos descendentes que tiveram contato prévio com o leite materno de mães sensibilizadas, AI e MIAI, menor número de ovos por gramas de fezes. Com relação à presença de colágeno, não houve diferença entre os descendentes do grupo MI e do CONTROLE, porém houve uma diminuição nos grupos AI e MIAI. Além disso, houve menor produção de colágeno no grupo MIAI quando comparado ao AI.

Status de ativação dos linfócitos T e macrófagos, em descendentes de mães sensibilizadas com SWAP.

A avaliação dos linfócitos T auxiliares, nos grupos de descendentes de mães que receberam SWAP e submetidos à infecção pós-natal, foi realizada com a marcação das moléculas CD28, CD154 e CTLA-4, após cultura apenas com meio de cultivo (basal) ou acrescentado de mitógeno (Con-A). Deste modo, em relação ao CONTROLE, pôde ser observado que a frequência basal de células CD4+CD28+ nos descendentes apenas nascidos é mais elevada, seguida dos descendentes apenas amamentados (CONTROLE= 0,09%; MIAI =0,15%; AI= 0,38%; MI =1,81%) (Fig 1A).

Frente ao estímulo mitogênico, houve maior frequência de células CD4+CD28+, nos grupos que receberam leite materno de mães sensibilizadas, e não houve diferença no grupo MI quando comparado com o CONTROLE (CONTROLE=0,35%; MIAI =2,15%; AI =1,2%; MI =0,40%) (Fig 1A). Com relação à frequência de células CD4+/CD154+, a frequência foi maior no grupo MI, enquanto houve menor frequência da CD4+/CTLA-4+ (CONTROLE= 0,06%, AI=0,04%, MIAI=0,07% e MI= 0,01%). Não houve diferença estatística na frequência destas duas populações nos grupos AI e MIAI (Fig 1B e Fig 1C)

A frequência basal das células CD14+/CD40+ foi significativamente maior nos animais que foram gerados em mães sensibilizadas, MI e MIAI, quando comparado ao grupo CONTROLE (CONTROLE =1,9%; AI =1,2% MIAI = 28,0% MI =15,8%). Frente ao estímulo com mitógeno, a frequência de células CD14+/CD40+ foi elevada em todos os grupos experimentais, sendo menor no grupo MI em comparação aos descendentes que receberam leite de mães sensibilizadas (CONTROLE=3,5%; AI =14,2%; MIAI =19,4%; MI =8,9%) (Fig 1D).

Produção de IL-5, IL-4 e IFN- γ em descendentes de mães sensibilizadas com SWAP, quando infectados na vida adulta.

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos, dos diferentes grupos de estudos, foram analisados quanto ao conteúdo de citocinas após cultivo com ou sem mitógeno.

Em relação à produção basal, quando comparado ao grupo CONTROLE, não foi detectável nível de IL-5 no grupo MIAI e houve menor produção desta citocina no grupo MI (Fig 2A). Níveis menores IFN- γ foram observados no sobrenadante do grupo AI (Fig 2B). Nos grupos AI, MIAI e MI houve produção de IL-10, com níveis bem maiores neste último grupo (Fig 2D). Nestas condições de cultivo, a IL-4 não foi detectada (Fig 2C).

Em resposta ao mitógeno, não houve diferença estatística entre os níveis de IL-4, IL-5, IFN- γ entre os grupos experimentais e o grupo CONTROLE (Fig 2 A, B e C). Contudo, a IL-

10 esteve em níveis menores nos animais MI que no grupo CONTROLE e não foi detectada nos grupos que receberam leite de mães sensibilizadas, AI e MIAI (Fig 2D).

Produção de anticorpos anti-SWAP em descendentes de mães sensibilizadas com SWAP, quando infectados na vida adulta.

Os níveis de anticorpos IgG2a anti-SWAP foram em todos os grupos experimentais semelhantes e significativamente maiores que o grupo CONTROLE (Fig 3B). Diferentemente, os níveis de anticorpos IgG1 anti-SWAP foram significativamente maiores apenas no grupo AI, em relação ao grupo CONTROLE (Fig. 3A).

DISCUSSÃO

Infecção esquistossomótica materna leva a uma hiporresponsividade, observada pela diminuição do tamanho do granuloma em descendentes adultos quando infectados (13-15). Aqui, nós avaliamos o efeito da sensibilização materna, apenas com os antígenos dos vermes e a influência da gestação ou da amamentação nestas mães. Além da resposta aos antígenos homólogos *in vivo*, pela reação granulomatosa, foi observado o status de ativação basal dos linfócitos T e macrófagos, bem como a imunidade dos descendentes num espectro mais amplo, sob ativação mitogênica.

Nestas condições, os descendentes gerados e seguidos de amamentação em mães sensibilizadas com SWAP (MIAI) apresentaram um menor número de ovos nas fezes e menor depósito de colágeno nos granulomas, maior produção de IL-10 e marcante diminuição de IL-5, com manutenção nos níveis de IFN- γ .

Estes dados corroboram os estudos que relatam uma diminuição da hipersensibilidade granulomatosa, bem como da carga parasitária nos hospedeiros sensibilizados com SWAP ou com células pulsadas com frações derivadas deste antígeno (19, 26,23). Camundongos esquistossomóticos, durante o período pré-patente da infecção ou vacinados com antígenos dos vermes, apresentaram um perfil de resposta Th1, com altos níveis de IFN- γ , IL12p40 e TNF- α , com diminuição de IL-4, seja com ou sem altos níveis de IL-10 (6, 16, 22, 23, 27). Estes dados sugerem que o contato precoce, durante a sensibilização materna com o SWAP, perpetua a imunomodulação negativa da reação granulomatosa, com resposta Th2 prejudicada, observada no hospedeiro sensibilizado. Vale á pena ressaltar que a dose de sensibilização materna foi baseada em modelos de vacinação com o SWAP e suas frações (24, 25 modificados), afim de

avaliar o uso de antígenos parasitários como um aliado na modulação da patologia hepática nos descendentes que habitam áreas em propícias a infecção.

Durante o período pré-patente da infecção pelo *S. mansoni* e com a imunização com tegumento do verme houve melhora na capacidade de colaboração dos linfócitos T com os macrófagos, por haver aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias CD86/CD80 e co-fetora CD40 (22,23). Aqui, esta característica do SWAP foi preservada nos descendentes de mães sensibilizadas com este antígeno, revelada pela maior frequência de macrófagos expressando CD40 no grupo MIAI. Apesar desta condição ser conhecida em melhorar resposta T efetora, esta interação molecular também é requerida para a produção de IL-10, seja por macrófagos como por Treg (28, 29).

De modo interessante, apesar de modulação negativa no fígado e o status de imunossupressão basal, uma melhora na imunidade do descendente foi observada frente ao estímulo policlonal: a produção das citocinas marcadoras de Th1 e Th2 não foi prejudicada e não houve produção de IL-10. Além disso, houve melhor expressão de moléculas importantes na ativação dos linfócitos, como CD28, e de CD40 nos macrófagos. Então, o desequilíbrio Th1/Th2 basal e produção de IL-10 foram revertidos sob estimulação policlonal. Estes resultados sugerem que a imunidade aos antígenos não relacionados aos vermes possam está preservada. De fato, nos descendentes nascidos e amamentados em mães esquistossomóticas, a imunidade anti-Ovalbumina foi restaurada, com aumento de IFN- γ (15)

Os achados dos animais apenas amamentados ou gerados em mães sensibilizadas ressaltam a importância da amamentação neste fenômeno imunomodulatório e parece excluir a IL-10 como único fator imunomodulatório.

No grupo MI, apesar da produção elevadíssima de IL-10 não houve alteração na inflamação hepática. A produção aumentada de IL-10, nestes descendentes, já foi demonstrada em outros modelos experimentais (30, 31,15) e parece estar envolvida com o fato de antígenos do *S. mansoni*, amplificar a condição *in útero* de produção de IL-10 por células apresentadoras de antígenos (32-34) imprimindo esta característica até a vida adulta.

No grupo AI houve menor número de ovos e menor deposição de colágeno, com maior produção de IL-10 e diminuição de IFN- γ , com manutenção nos níveis de IL-5. Vale á pena mencionar que nestes descendentes o controle da reação granulomatosa foi menos intenso que no grupo MIAI. Nós acreditamos que a diminuição drástica da IL-5 seja crucial para conter a deposição de colágeno, além da diminuição do IFN- γ . De fato, apesar de IFN- γ ter papel inicial pro inflamatório na formação do granuloma, a IL-5 está associada com granuloma mais fibrótico. Reiman e colaboradores (2006) demonstram que camundongos knockout para IL-5

reduziram a inflamação hepática, a fibrose e o tamanho dos granulomas, com poucos ou nenhum eosinófilos no fígado. A ausência de eosinófilos leva a uma redução na produção de IL-13, citocina fundamental na ativação de macrófagos alternativamente ativados (M2), responsáveis pela fibrose e remodelação tecidual. Então, estes dados ressaltam que é possível que a amamentação prévia em mães sensibilizadas com SWAP estimule outros mecanismos ou moléculas imunomodulatórias, entre elas células Tregs e/ou produção de TGF- β . Atualmente, estas hipóteses estão sendo avaliadas.

Com relação à produção de anticorpos, houve maiores níveis de IgG1 anti-SWAP em relação ao isótipo IgG2a, no grupo de animais infectados quando adultos (CONTROLE), corroborando um perfil Th2 da infecção esquistossomótica e também induzida pelo SWAP. Contudo, o perfil dos descendentes de mães sensibilizadas com SWAP foi direcionado para a produção do isótipo IgG2a anti-SWAP, seja nos amamentados e/ou gerados nestas mães. De modo interessante, no grupo AI houve também níveis aumentados do isótipo IgG1 anti-SWAP, corroborando o efeito potencializador do leite materno em contato prévio com antígenos e anticorpos de *S. mansoni* (30,36, 37). Adicionalmente, este resultado traz à tona a participação do isótipo IgG1 na modulação da reação granulomatosa nos indivíduos que recebem leite de mães sensibilizadas. De fato, a ação imunomodulatória do isótipo IgG1 tem sido demonstrada (36,4). Além disso, as mães sensibilizadas apresentaram níveis maiores de IgG1 anti-SWAP do que IgG2a para este antígeno (APÊNDICE B) e nós demonstramos que não há passagem do isótipo IgG2a anti-SWAP maternos, seja via leite ou placenta, para descendentes (38). Ação do isótipo IgG1 anti-SWAP na modulação granulomatosa merece ser melhor investigada.

É importante ressaltar que a amamentação e gestação, separadamente, em mães sensibilizadas levou a um status basal de pró-ativação de linfócito T. Houve expressão de CD28 no grupo AI e sob estímulo mitogênico apenas os descendentes amamentados mantiveram aumentados a frequência de linfócios T CD28⁺ e passam a ter mais macrófagos com CD40, com ausência de IL-10 nos animais AI (e MIAI). Estes dados corroboram o caráter imunomodulatório dicotômico do leite materno (tolerogênico no granuloma e estimulador em resposta ao mitógeno) na tenra idade (39,41) que parece ser mantido nos descendentes amamentados em mães sensibilizadas com o SWAP.

Na resposta basal do grupo MI, houve mais CD28⁺ e mais expressão de CD40L e menos CTLA-4, além de mais macrófagos expressando CD40. Contudo, este status não foi mantido sob estimulação mitogênica. Estes dados, corroboram o potencial supressor da gestação em mães em contato com antígeno do *S. Mansoni*, (30, 31) apoiado pela síntese de IL-10 em resposta ao mitógeno.

Em conclusão, nossos achados mostram que amamentação em mães expostas aos antígenos do verme do *S. mansoni* é requerida para um controle da doença hepática crônica e ainda favorece uma melhor condição imunológica nos descendentes de áreas endêmicas. Os achados ressaltam que a busca por ferramentas imunomodulatórias oriunda de helmintos aninhada com a modulação do sistema imune no início da vida, podem ser efetivos no controle da imunopatologia hepática, levando em conta o papel do leite materno, em indivíduos de área endêmicas.

Grupos ^a	Kato-Katz (opg) ^b	Recuperação de vermes ^c	Número de granulomas hepáticos ^d		Tamanho do granuloma (TM) ^e	Colágeno ^f (TM)
			(HE)	(TM)		
Controle	72,0 ± 67,9	7,50 ± 6,36	1.350 ± 0,64	1.250 ± 0,21	99440 ± 39630	183,6 ± 8,83
AI	40,0 ± 26,8	7,11 ± 4,54	0.933 ± 0,17	1.067 ± 0,25	112500 ± 41250	169,0 ± 12,30 ^g
MIAI	51,4 ± 35,1	10,17 ± 7,25	1.067 ± 0,19	1.400 ± 0,15	108900 ± 37060	158,0 ± 23,48 ^{g,h}
MI	64,0 ± 13,9	5,00 ± 1,41	1.267 ± 0,06	1.233 ± 0,25	106900 ± 66670	189,7 ± 10,76

Tabela 1- Estudo histomorfométrico do tecido hepático: a: Camundongos Swiss webster infectados com 80 cercárias, AI, MIAI e MI de mães sensibilizadas com SWAP, 60 dias pós infecção tiveram seus fígados submetidos a um estudo morfométrico. Camundongos nascidos de mães sensibilizadas (MI), amamentados em mães sensibilizadas (AI), camundongos nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e camundongos nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas (CONTROLE), foram também analisados dentro das mesmas condições [corados com Hematoxilina e eosina (HE) e Tricomico de Masson (TM)], b: mediana ± erro padrão (EP) do número de ovos por grama de fezes (opg), análises realizadas com 50 dias pós-infecção, c: mediana ± erro padrão (EP) da carga parasitária, análises realizadas 60 dias pós-infecção, d: mediana ± erro padrão (EP) do número de granulomas por campo, e: mediana ± erro padrão (EP) do tamanho (área seccional) dos granulomas em 2 µm. Análises de 10 granulomas por animal (n=5) totalizando 50 granulomas/grupo, f: mediana ± erro padrão (EP) da proporção de colágeno obtida do ImageJ® software; ^gp < 0.05 comparado com o grupo CONTROLE, ^h p < 0.05 comparado com o grupo AI.

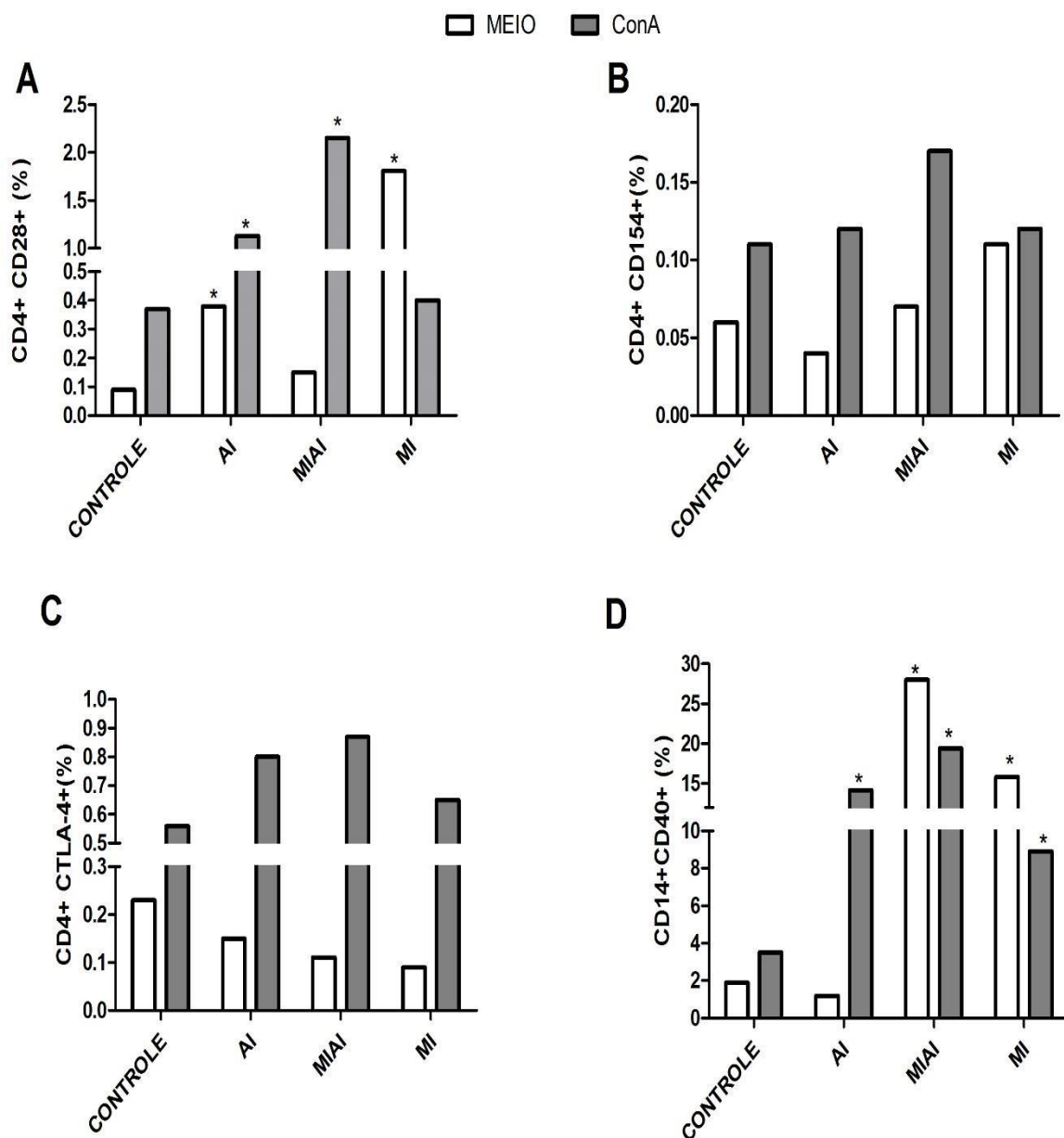


Figura 1- Frequência de células esplênicas CD4+CD28+(A), CD4+CD154+(B), D4+CTLA-4+ (C) e CD14+CD40+(D) de camundongos adultos nascidos e amamentados em mães não-sensibilizadas SWAP (Controle), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e apenas nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni*. 5×10^6 células cultivadas com meio RPMI e ConA(5 μ g/mL), e marcadas com anticorpos anti-CD4 (FITC), anti-CD28(PE), anti-CD154(PE), anti-CTLA-4(PE), anti-CD14 (FITC) e anti-CD40(PE). Foi considerada diferença significativa, frequência maior que 2 vezes para o fenótipo analisado. * $p < 0,005$ quando comparado ao Controle.

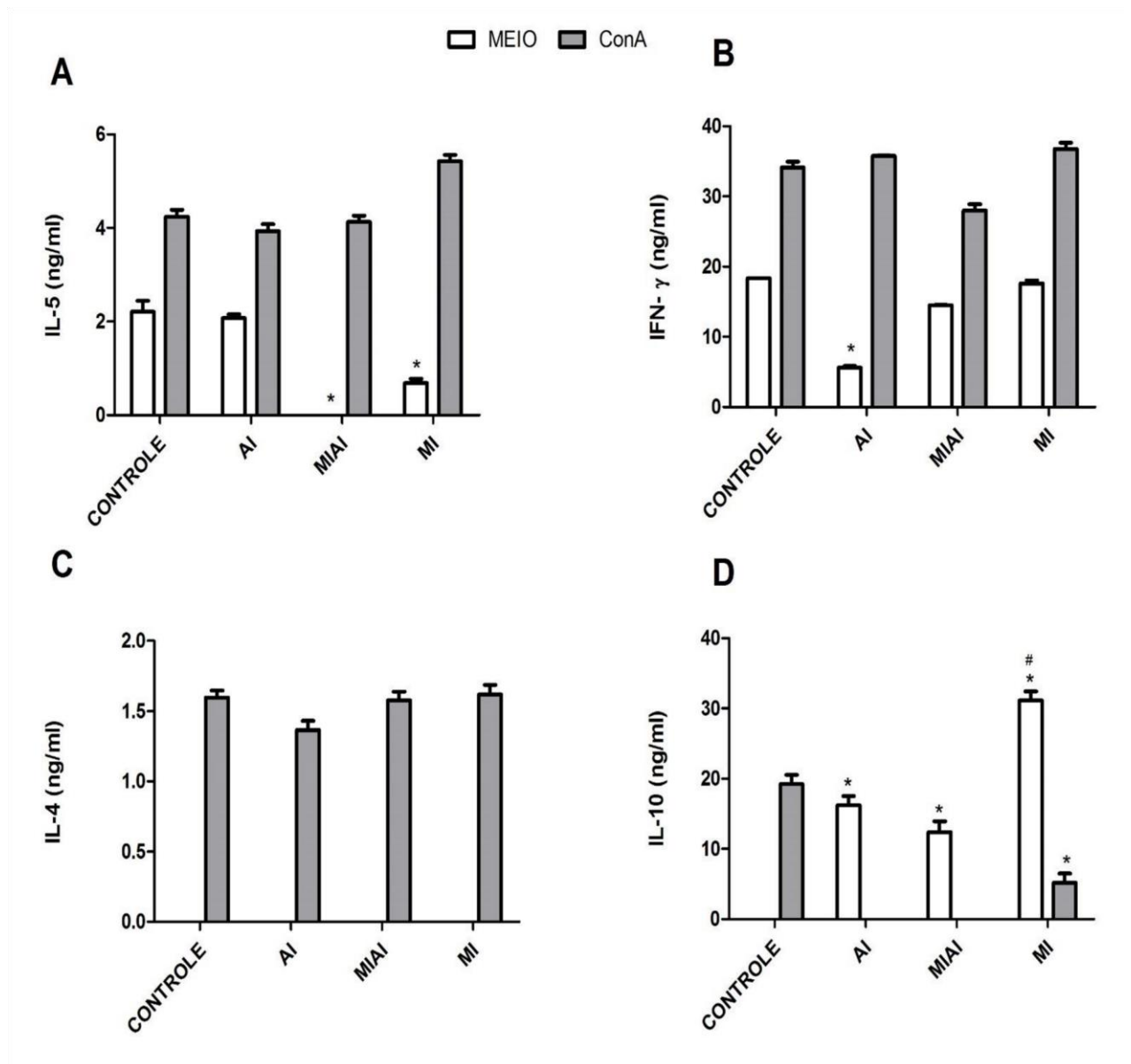


Figura 2- Níveis das citocinas IL-5 (A), IFN- γ (B), IL-4(C) e IL-10 (D) produzidas por camundongos *Swiss webster* nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas (Controle), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni*. 5×10^6 células foram estimuladas com ConA ($5 \mu\text{g/mL}$). As citocinas foram quantificadas no sobrenadante depois de 24hrs por ELISA de captura. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão. *p<0,005 quando comparado ao controle. # p<0,005 quando comparado ao AI e MIAI.

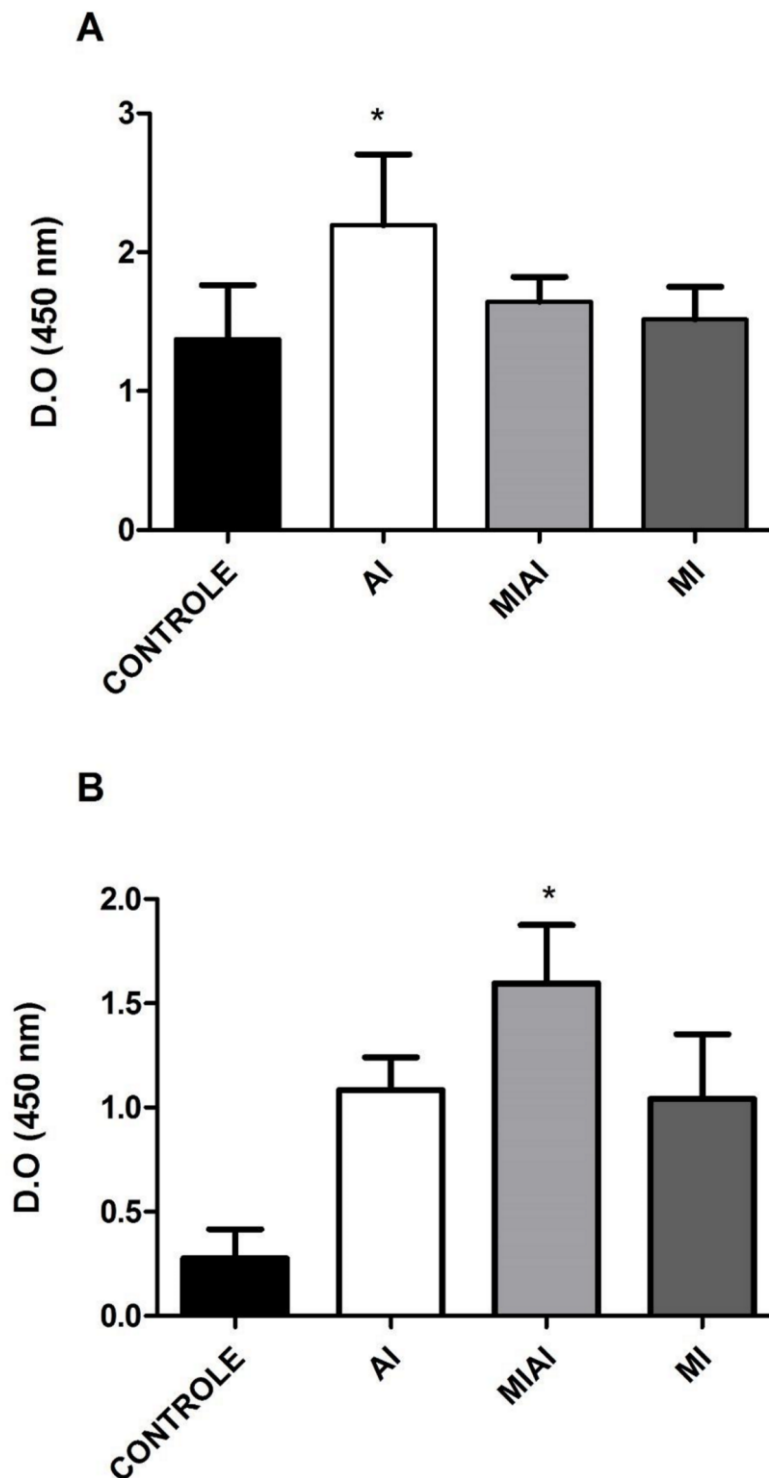


Figura 3- Títulos de anticorpos IgG1 anti-SWAP (A) e IgG2a anti-SWAP (B) nos soros de camundongos *Swiss webster* nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas (Controle), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni*. Dosados por ELISA indireto. Os resultados expressam a mediana da D.O de 3 a 5 animais/grupo. * $p < 0,005$ quando comparado ao controle.

REFERÊNCIAS

1. FRIEDMAN JF, MITAL P, KANZANIA HK, OLDS R, KEATINS JD. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol* 2007; **4**: 159-164.
2. SALAWU OT, ODAIBO A.B. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *Int. j. gynaecol. obstet* 2013; **122**: 1-4.
3. DAUBY, N, GOETGHEBUER T, KOLLMANN TR, LEVY J, MARCHANT A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect Dis* 2012; **12**: 330340.
4. FAIRFAX KC, AMIEL E, KING IL, FREITAS TC, MOHRS M. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *Plos Pathog* 2012; **8**: 1-13.
5. CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LFA, et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune response during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 2008; **108**: 109-117.
6. KULLBERG MC, PEARCE EJ, HIENY SE, SHER A, BERZOSKY JA. et al. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. *J. Immunol*; 1992; **148**: 3264-3270.
7. PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. rev. immunol* 2002; **2**: 499–511.
8. WOLFS IMJ, STOGER J, GOOSSENS P. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. *The Fasesb Journal*; 2014; 288-299.
9. BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Paras.Immunol* 2009; **31**:163–176.

10. MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol* 2004; **173**: 1224-31.
11. WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol.* 2007; **85**: 148-154.
12. CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Cell press* 2014; **30**: 141-150.
13. ATTALLAH AM, ABBAS AT, DESSOUKY MJ, ELI-ENSHATY HL, ELSHIKHA HM. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitol. Res.* 2006; 99:137–145.
14. OTHMAN AA, SHOHEIB ZS, SAIED EM, SOLIMAN RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology* 2010; 215: 101-112.
15. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES ES, 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* 2016;1-10.
16. JACOBS W A, BOGERS J, DEELDER A, WERY M, VAN MARCK E. Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation *in vivo*. *American Journal of Pathology* 1997; **150**: 2033-2045.
17. ZOUAIN, CS, FALCÃO PL, GOES TS, LEITE MF, GOES AM. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates *in vitro* granuloma formation by regulating CD28- CTLA-4, and CD86 expression in humans. *Immunol. lett* 2004; 91:113-118.
18. HIRSCH C, GOES AM. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. *Parasitology.* 1996; 112: 529-535.

19. GUSTAVSON S, ZOUAIN CS, ALVES JB, LEITE MF, GOES AM. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. *Parasitol. Res.* 2002; **51**: 259-269.
20. SULBÁRAN G, NOYA O, BRITO B, BALLEEN DE, CESARI JM. Immunoprotection of mice against *Schistosomiasis mansoni* using solubilized membrane antigens. *PLOS Neglected Tropical Disease* 2013; **7**: 1-13,
21. GABER HM, MAGHRABY AS, ALMED MB, RUPPEL A, BAHGAT MM. Immune responses in mice after immunization with antigens from different stages of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Z.naturforsch* 2010; **65c**: 289-302.
22. DURÃES FV, CARVALHO NB, MELO TT, OLIVEIRA SC, FONSECA CT. IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent, *Immunol. let* 2009; **125**: 72-77.
23. MELO TT, ARAUJO JM, SENA JC, ALVES CC, ARAUJO N, FONSECA CT. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smteg) in association with CpG-ODN. *Microbes and Infec* 2013; **15**: 28-36.
24. ETEWA, S.E. et al. Parasitological evaluation of potential candidate vaccines in *Schistosoma mansoni*-infected mice. v.6, p.23-30, 2014.
25. CARDOSO, L.S. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clinical Exp. Immunol.* 2010; **160**: 266-274.
26. HIRSCH C, ZOUAIN CS, ALVES JB, GOES AM. Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. *Parasitology* 1997; **115**: 21-28.

27. FERRAGINE, C.E; WALLS, C.D.; DAVIES S.T. Modulation of Innate AntigenPresenting Cell Function by Pre-patent Schistosome Infection. *Plos one neglected Tropical diseases*. 2013;7: 1-14.

28. MATHUR RK, AWASTHI A, WADHONE P, RAMANAMURTHY B, SAHA B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat. med.* 2004; **10**: 540-544.

29. GUIDUCCI C, VALZASINA B, DUSLICH H, COLOMBO MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Europ Journ Immunol.* 2005; 35: 557-567.

30. SANTOS P.A, SALES IRF, SCHIRATO GV, et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res.* 2010; **107**: 95102.

31. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES E, et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression. In antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Exp. parasitol.* 2014; **141**: 62-67.

32. HEIKKINEN J, MOTTONEN M, ALANEN A LASSILA O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; **136**: 373-378.

- 33-BLOIS SM, SOTO CD, TONETTEN M, KLAPP BF, MORGNI RA, ARACK PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol. Reprod*; 2004; **70**: 1018-1023.

- 34- THOMAS, P.G.; HARN, D.A. Jr. Immune biasing by helminth glycans. *Cell. microbial* 2004; **6**: 13-22.

35. REIMAN RM, THOMPSON RW, FENG CG et al. Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity. *Infec. immune.* 2006; **74**: 1471-1479.

36. COLLEY DG, MONTESANO MA, FREEMAN GL et al. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes infect.* 1999; **1**: 517-524.
37. MONTESANO MA, COLLEY DG, ELOI-SANTOS S, FREEMAN GL, SCOR WE. Neonatal idiotypic exposure alters subsequent cytokine, pathology, and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J.exp. med.* 1999; **189**: 637645.
38. NÓBREGA CGO, FERNANDES ES, NASCIMENTO WRC, et al. Transferência passiva de anticorpos específicos para antígenos de *Schistosoma mansoni* em camundongos nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas. *J Health Sci Inst.* 2012; **30**: 17-21.
39. FIELD, C.J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *J.Nutr.* 2005: 1-4.
40. BLEWETT HJH, CICALO MC, HOLLAND CD, FIELD CJ. The immunological components of human milk. **Adv. food nutr. res** 2008; 54: 45-80.
41. SALES, IANA RAFAELA FERNANDES. Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. 150 folhas: Il., fig, 30cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. TESE (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2015.

5.2 SENSIBILIZAÇÃO MATERNA COM ANTÍGENO DO VERME DE *SCHISTOSOMA MANSONI* (SWAP) E A INFLUÊNCIA DA GESTAÇÃO E AMAMENTAÇÃO, EM RESPOSTA À OVALBUMINA, NOS DESCENDENTES ADULTOS.

INTRODUÇÃO

Descendentes de mães esquistossomóticas, em área endêmica, podem se infectar e ao mesmo tempo ter contato com antígenos não relacionado ao verme (diante de vacinações, infecções heterólogas, alergias). Neste contexto, recentemente, Santos e colaboradores (2016) constaram que ambos, gestação e amamentação, em mães infectadas, levou ao prejuízo da respostas Th1 e Th2 anti-ovalbumina (OA), em descendentes infectados pós-natalmente, mas não avaliou os efeitos da sensibilização materna com antígenos parasitários do *Schistosoma mansoni*.

Muitos são os estudos utilizando antígenos parasitários do *Schistosoma*, a fim de demonstrar seu potencial como ferramenta imunomodulatória para prevenir o desenvolvimento do diabetes tipo 1, por intermédio da indução de células Treg, bem como, do diabetes tipo 2, além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares (2,3). Neste contexto, o uso do antígeno solúvel do verme (SWAP) vem tendo destaque. Em camundongos parasitados ou tratados com este antígeno e desafiados para ovalbumina (OA), houve supressão de resposta alérgica anti-OA, com menores níveis de citocinas Th2, maior indução de células T CD4+CD25+ e IL-10 e modulação negativa das respostas Th1 e Th2 (4-6)

Aqui, este estudo se propôs a avaliar o status de ativação dos linfócitos T e a capacidade de apresentação antigênica dos macrófagos, os níveis de citocinas e de imunoglobulinas antígenos-específicas, em descendentes previamente gerados ou amamentados em mães sensibilizadas com SWAP quando comparados aos descendentes de mães não-sensibilizadas, submetidos a infecção pós-natal e imunização com OA.

METODOLOGIA

Sensibilização materna com SWAP e sincronização do estro

Camundongos fêmeas da linhagem *Swiss webster*, com 4 semanas de idade foram sensibilizadas, subcutaneamente, com 100µg/camundongo de SWAP (7, 8 modificado), em adjuvante hidróxido de alumínio (Aziram, União Química). As fêmeas foram acasaladas, sendo 1 macho para cada 2 fêmeas (1:2) e foi observada a formação do “plug” vaginal para

confirmação do acasalamento. Os mesmos procedimentos foram realizados nas fêmeas não-sensibilizadas.

Filhotes machos com seis semanas de idade foram utilizados para formação dos grupos experimentais e controle. Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FIOCRUZ-PE (CEUA-70/2014).

Formação dos grupos de estudo, Infecção pós-natal e imunização com OA

Após o nascimento filhotes de mães sensibilizadas e de mães não sensibilizadas tiveram suas mães trocadas para a amamentação adotiva. Descendentes nascidos em mães sensibilizadas foram amamentados em mães não-sensibilizadas (MI), descendentes nascidos em mães não-sensibilizadas foram amamentados em mães sensibilizadas(AI). Outro grupo são os descendentes nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI). Animais nascidos em mães não-sensibilizadas foram amamentados em sua própria mãe (CONTROLE).

Camundongos machos com seis semanas de vida foram infectados, percutaneamente, com 80 cercárias de *S. mansoni* da cepa Belo Horizonte (BH). Após 45 dias a infecção foi confirmada pelo método de Kato-Katz. Sessenta dias após a infecção, foram imunizados por via subcutânea (s.c.) com 100µg de ovalbumina (OVA; 5 vezes cristalizada; Sigma-Aldrich), emulsificada em adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma-Aldrich), na base da cauda (0,1mL/camundongo).

Cultura de Células esplênicas

Após 6 semanas da infecção, foram retirados os baços dos filhotes, nos diferentes grupos, após eutanásia por sobredose de anestésico. Suspensões de células esplênicas foram obtidas assepticamente em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com HEPES (10mM), 2 mercaptoetanol (0,05mM), 216mg de Lglutamina, gentamicina (50mg/mL) e 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas numa concentração final de 5×10^6 (24h) células/mL em tubos de 8mL e estimuladas com OA (500mg/mL) e Con-A (5µg/mL). Os tubos foram incubados a 37°C em estufa de CO₂ 5%, e após 24h os sobrenadantes foram coletados e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção das citocinas IL4, IL-5, IFN-γ e IL-10. As células cultivadas por 24 h foram recuperadas e marcadas para detecção de macrófagos e linfócitos T.

Dosagem de Citocinas

Os níveis das citocinas foram determinados por ELISA sanduíche utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: para IL-4, 11B11 e BVD6-24G2 biotinilado; para

IFN- γ , AN18 e XCM1.2 biotinilado; IL-5, 39D10 e 5A10 biotinilado e IL-10, C2522A5e SXC-1biotinilado. Ocorreu adição de estreptoavidinaperoxidase (Sigma-Aldrich) e as reações foram reveladas com solução ABTS (2-2'-azinobis (3ethylbenzenethiazoline-6-sulfonic acid); Sigma) em tampão citrato 0,1M com H₂O₂. As placas foram lidas (405nm) no leitor de ELISA. As quantidades de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas com base nas curvas-padrões dos recombinantes purificados das citocinas, obtidas com concentrações de 0,3125 a 10ng/mL (rIL-4), 0,1562 a 5ng/mL (rIL-5) de 0,3125 a 20ng/mL (rIFN- γ) e 0,3125 a 20ng/mL (rIL- 10).

Imunofenotipagem das células

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

As células foram ajustadas para uma concentração de 1×10^6 células/mL com PBS+SBF 5% estéril e as marcações foram realizadas aos pares com adição de 1 μ L dos anticorpos de marcação: CD4 (FITC), CD28 (PE), CTLA-4 (PE), CD154 (PE), CD14 (FITC) CD40 (PE). A aquisição das células duplamente marcadas e a análise dos dados foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) do CPqAM/FIOCRUZ.

Dosagem de Anticorpos OA-Específicos por ELISA

Os animais de todos os grupos foram sangrados no 9º dia após a imunização, por punção cardíaca, após anestesia intramuscular com Xilazina HCl/ Ketamina HCl. Os plasmas foram testados individualmente para dosagem dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OA usando placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Roskilde, Denmark) sensibilizadas com OA (20 μ g/mL) e anticorpos de cabra específicos para IgG1 ou anti-mouse IgG2a conjugados à peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Inc, AL, USA). As reações foram reveladas com solução de OPD (Ortho-phenyldiamine; Sigma) em tampão citrato 0,1M com H₂O₂. As placas foram lidas (450nm) no leitor de ELISA.

Curvas de titulação foram realizadas para todas as amostras. Os resultados foram expressos pela mediana das densidades óticas (D.O.) dos plasmas de cada grupo numa diluição apropriada (dentro da parte linear na curva de titulação) para cada isótipo $\pm$ erro padrão (1:512 para IgG1 e 1:8 para IgG2a).

Análise Estatística

Para os resultados de dosagem de imunoglobulinas e análise histopatológica os grupos foram comparados utilizando-se testes não-paramétricos. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e nos casos em que a análise se mostrou significativamente diferente, procedeu-se a comparação utilizando-se o teste de Mann-Whitney, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para os resultados das dosagens de citocinas, a comparação entre os diferentes grupos de animais foi feita utilizando-se análise de variância para dados paramétricos (ANOVA). Nos casos em que esta análise se mostrou significativamente diferente, procedeu-se a comparação múltipla segundo o método de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Para análises estatísticas, foi usado o Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA) e considerados significativos valores de $p < 0,05$. Para os resultados da citometria de fluxo, foi considerada diferença significativa, frequência maior que 2 vezes para o fenótipo analisado. Os resultados mostram um experimento representativo de três repetições.

RESULTADOS

Amamentação em mães sensibilizadas com SWAP melhora o status de ativação dos linfócitos T, em resposta a ovalbumina, nos descendentes adultos infectados.

Em comparação ao controle, o grupo que apenas teve contato prévio com o leite de mães sensibilizadas levou a uma maior frequência basal de células CD4+CD28+ (Fig 1A). (CONTROLE= 0,05%, AI=0,10%; MIAI = 0,05% e MI=0,04%), bem como após reestimulação *in vitro* com OA (CONTROLE= 0,06%, AI=0,52%; MIAI = 0,03% MI=0,04%). Quando houve estimulação com o mitógeno, foi observada uma diminuição na frequência de células CD4+CD28+, nos descendentes apenas gerados em mães sensibilizadas em comparação ao controle (CONTROLE = 0,21%, AI =0,15%; MIAI =0,16% MI =0,05%)

Com relação à frequência de células CD4+/CD154+ (Fig 1B), a frequência basal foi menor naqueles descendentes que foram nascidos e amamentados em mães sensibilizadas em relação ao grupo controle (CONTROLE =0,04 %, AI =0,04%; MIAI = 0,01% MI =0,03 %). Frente à reestimulação *in vitro* com OA, os descendentes amamentados em mães sensibilizadas, apresentaram frequência maior em relação ao controle (CONTROLE = 0,04%, AI =0,08%; MIAI =0,05 % MI =0,04 %). Em resposta ao mitógeno, houve uma maior frequência de células CD4+CD154+ nos descendentes apenas nascidos em mães sensibilizadas em relação ao

controle e demais grupos experimentais (CONTROLE = 0,06%, AI = 0,06%, MIAI = 0,07%, MI = 0,12%).

A frequência basal de células CD4⁺ expressando CTLA-4 (Fig 1C) foi menor nos descendentes que tiveram contato com o leite, AI e MIAI, em relação ao controle. (CONTROLE = 0,21%, AI = 0,07%, MIAI = 0,10%, MI = 0,21%). Frente a reestimulação com OA, os descendentes AI, apresentaram frequência maior em relação ao controle, (CONTROLE = 0,05%, AI = 0,16%, MIAI = 0,07%, MI = 0,05%) bem como frente ao mitógeno, (CONTROLE = 0,18%, AI = 0,32%, MIAI = 0,12%, MI = 0,18 %).

A gestação e a amamentação em mães sensibilizadas com SWAP altera a expressão da molécula co-estimulatória CD40, nos macrófagos, nos descendentes adultos infectados.

Com relação à frequência de células expressando CD14⁺CD40⁺ (Fig 2), os descendentes gerados em mães sensibilizadas, apresentaram uma frequência basal alta, em relação ao CONTROLE e aos demais grupos experimentais (CONTROLE=3,8%, AI=2,1%, MIAI=11,2%, MI=23,0%). Após reestimulação *in vitro* com OA, nos descendentes AI e MIAI, houve uma maior frequência destas células quando comparado com o CONTROLE, (CONTROLE=2,4%, AI=5,9%, MIAI=5,5%, MI=4,4%), bem como, quando as células destes grupos foram cultivadas com o mitógeno, havendo aumento maior no grupo MIAI (CONTROLE = 3,5%, AI = 6,6%, MIAI= 19,1 %, MI= 3,8%).

Produção de citocinas em descendentes infectados, imunizados com OA, amamentados e/ou gerados em mães sensibilizadas com SWAP

A síntese basal de IL-5, bem como em resposta à OA, foi menor apenas no grupo MIAI, quando comparado ao CONTROLE (Fig 3A). Em resposta ao mitógeno, não houve diferença entre os grupos CONTROLE e experimentais. No que se refere à síntese basal IFN- γ , e ao reestímulo *in vitro* com a OA foi observado que apenas os amamentados em mães sensibilizadas com SWAP, obtiveram uma menor produção basal, em relação aos demais grupos (Fig 3B). Em resposta ao mitógeno, não houve diferença entre os grupos experimentais e o controle.

Em relação a síntese basal de IL-4, houve produção detectável nos grupos AI e MI. Da mesma forma, quando as células foram estimuladas com OA, houve maior produção nos grupos AI e MI, com maiores níveis neste último. A IL-4 pôde ser mensurada em todos os grupos experimentais, quando estimulados com o mitógeno, e não houve diferença estatística entre os mesmos (Fig. 3C)

Para a IL-10 (Fig 3D), foi mensurada no grupo CONTROLE, no cultivo basal e sob os estímulos antigênico ou mitogênico, enquanto que no grupo MI apenas sob estímulo mitogênico e em menor nível. Nestas condições experimentais não houve produção destas citocinas no grupo AI e MIAI.

O contato prévio com o leite materno de mães sensibilizadas potencializa a produção de anticorpos específicos para OA.

A produção de IgG1 anti-OA (Fig. 4A) nos camundongos apenas amamentados ou gerados em mães sensibilizadas foi significativamente maior, em relação aos descendentes de mães não sensibilizadas (Controle). Por outro lado, nos grupos MI e MIAI os níveis deste anticorpo foram semelhantes ao grupo controle. Com relação à produção de anticorpos IgG2a anti-OA (Fig 4B), não houve diferença estatística entre os grupos AI, MIAI, MI e CONTROLE, embora seja possível observar níveis mais elevados nos descendentes apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI).

DISCUSSÃO

Aqui, foi investigada a influência de mães sensibilizadas com antígenos do verme (SWAP) nos seus descendentes infectados e imunizados com antígeno não relacionado ao verme. Pôde ser observado que nos animais nascidos e amamentados a produção de anticorpos anti-OA é mantida, com potencial de ativação celular, acompanhado de melhora na expressão de CD40 nos macrófagos, porém com prejuízo na produção de IL-5. Contudo, estes resultados diferem quando avaliamos, separadamente, a gestação da amamentação em mães que receberam SWAP.

A gestação, em mães sensibilizadas, levou a uma maior frequência basal de células expressando CD14+/CD40+ nos descendentes infectados e imunizados com OA na vida adulta. Contudo, este *status* não é mantido sob estimulação antigênica e mitogênica *in vitro*. Corroborando este dado, num modelo experimental de infecção materna com *S. mansoni*, a gestação nestas mães acarretou em uma alta frequência de linfócitos B expressando CD40, entretanto esse aumento foi seguido de um drástico decréscimo, sugerindo que o status de ativação inicial das células B não foi mantido (9). Nas células cultivadas com mitógeno, os linfócitos apesar de apresentarem maior expressão de CD40 ligante (CD154), houve uma redução drástica da molécula CD28 com produção de IL-10. Em conjunto, estes achados

corroboram o potencial supressor, via IL-10, observado dos antígenos do verme (4) e da gestação em mães infectadas com *S. mansoni* (10, 1).

Apesar disso, para a resposta antígeno específica, houve um aumento na síntese de IL-4, na presença de IFN- γ e ausência de IL-10, sugerindo um perfil misto Th1/Th2 anti-OA, sem alterar a produção de anticorpos. Apesar dos antígenos dos vermes estarem associados com perfil Th1 no início da infecção (11), o hospedeiro em contato com antígenos cercárianos irradiadas apresentou um perfil misto Th1/Th2, em infecção posterior (12). Em respeito à manutenção dos níveis de anticorpos anti-OA do grupo MI, foi também observada em descendentes infectados e imunizados com OA de mães esquistossomóticas (1). Vale à pena mencionar que em descendentes sem infecção pós-natal, demonstraram supressão da resposta anti-OA em animais MI (10). Então, estes dados sugerem uma reversão da supressão na produção de anticorpos anti-OA pela infecção pós-natal nos descendentes gerados, seja em mães infectadas ou sensibilizadas com SWAP. Desta forma, ressalta a participação do contato prévio com o SWAP neste fenômeno.

Com relação ao efeito do leite materno de mães sensibilizadas com SWAP, houve uma melhora no *status* de ativação celular, com mais linfócitos e macrófagos expressando moléculas co-estimulatórias e co-efetoras e incremento na produção de anticorpos anti-OA. Este efeito estimulador do leite materno nas APCs foi também observado, em estudos *in vivo* ou *in vitro*, com o leite de mães esquistossomóticas, que melhorou a expressão de CD40 e CD80 em linfócitos B (9,13). Adicionalmente, este estudo mostrou que a sensibilização materna com SWAP, via leite, em conjunto com a infecção no descendente aprimorou marcadores de ativação dos linfócitos T, a molécula CD28. Contudo, nós estamos cientes da presença da molécula CTLA-4 neste cenário e do seu papel negativo na ativação (14). A presença desta molécula em condições de pró ativação (antígeno e mitógeno) reflete a função dicotômica do leite materno (15, 13) e seu potencial em controlar a exacerbação da resposta imune.

O contato com leite de mães sensibilizadas com SWAP parece ser requerido para melhorar a produção de anticorpos anti-OA, nos descendentes pós-infectados quando adultos. A previa amamentação nestas mães levou a melhora na produção de IL4, com diminuição do IFN- γ , na ausência de IL-10. Vale a pena ressaltar os achados sob o efeito do leite de mães esquistossomóticas, onde não foi demonstrada detecção dos níveis de IL-4 e nem aumento na produção de anticorpos anti-OA nos descendentes pós infectados e com diminuição do IFN- γ , na ausência de IL-10 (1). Estes dados indicam o requerimento da sensibilização materna com SWAP, via amamentação, pra desvio de resposta imune Th2/IL-4 e potencialização da resposta de anticorpos.

O leite materno de mães esquistossomóticas, mostrou peptídeos de natureza imunomodulatória, como a interleucina IL-17F ou glutathione-S-transferase-GST (13). Curwen e colaboradores (2004) identificou GST (26kDa) entre as proteínas solúveis derivadas de preparação de cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos. Contudo, se o leite de mães sensibilizadas com SWAP tem moléculas imunomodulatórias, precisa ainda ser esclarecido. Com relação aos anticorpos, mães sensibilizadas com SWAP apresentaram níveis maiores de IgG1 anti-SWAP do que IgG2a para este antígeno (APÊNDICE D) e nós demonstramos que não há passagem do isótipo IgG2a anti-SWAP maternos, seja via leite ou placenta, para descendentes (17) A ação imunomodulatória do isótipo IgG1 tem sido demonstrada (18, 19) e precisa ser melhor investigada no fenômeno de imunomodulação exercida pelo leite materno.

Em síntese, nossos achados mostram que mães sensibilizadas com SWAP em conjunto com infecção pós-natal melhoram a resposta imune para antígenos não relacionados ao parasita e enfatizam a função do leite materno destas mães na estimulação da imunidade que é mantida a longo prazo na vida adulta. No contexto do uso de antígenos parasitários como ferramentas imunomodulatórias, este estudo trouxe à tona a possível associação do uso de componentes parasitários durante a amamentação, a fim de obter um melhor imunidade frente a infecções bacterianas, virais e doenças auto-imunes ao longo da sua vida.

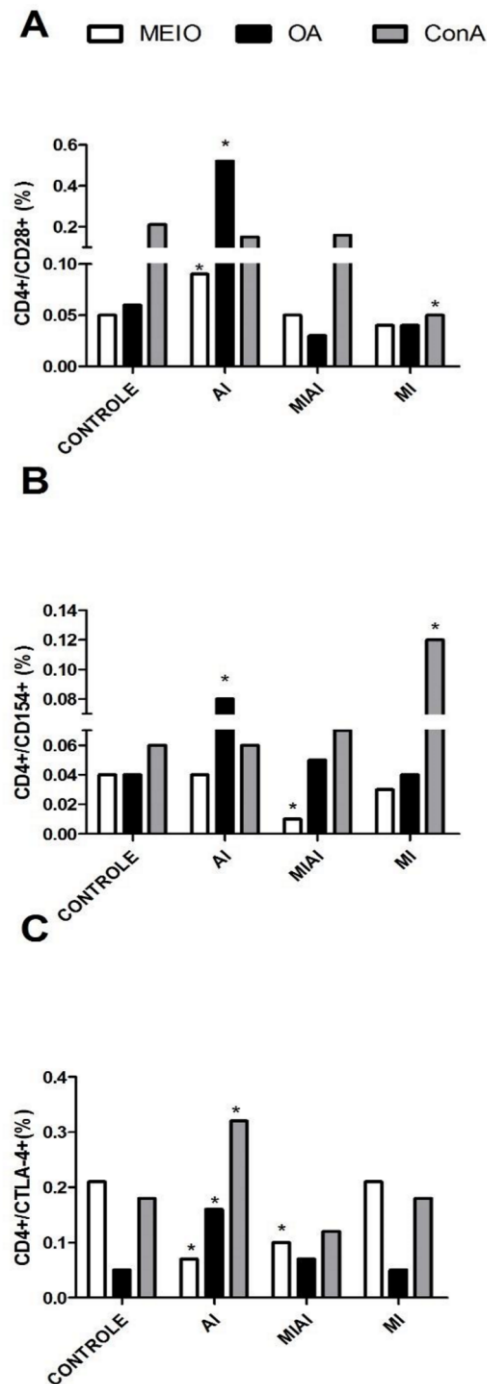


Figura 1- Frequência de células esplênicas CD4+CD28+(A), CD4+CD154+(B) e CD4+CTLA-4+ (C) de camundongos adultos nascidos e amamentados em mães não-sensibilizadas com SWAP (CONTROLE), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e apenas nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni* e imunizados com OA. 5×10^6 células cultivadas com meio RPMI, OA (500 mg/mL) e ConA(5µg/mL), e marcadas com anticorpos anti-CD4 (FITC), anti-CD28(PE), antiCD154(PE) e anti-CTLA-4(PE). Foi considerada diferença significativa, frequência maior que 2 vezes para o fenótipo analisado. * $p < 0,005$ quando comparado ao CONTROLE.

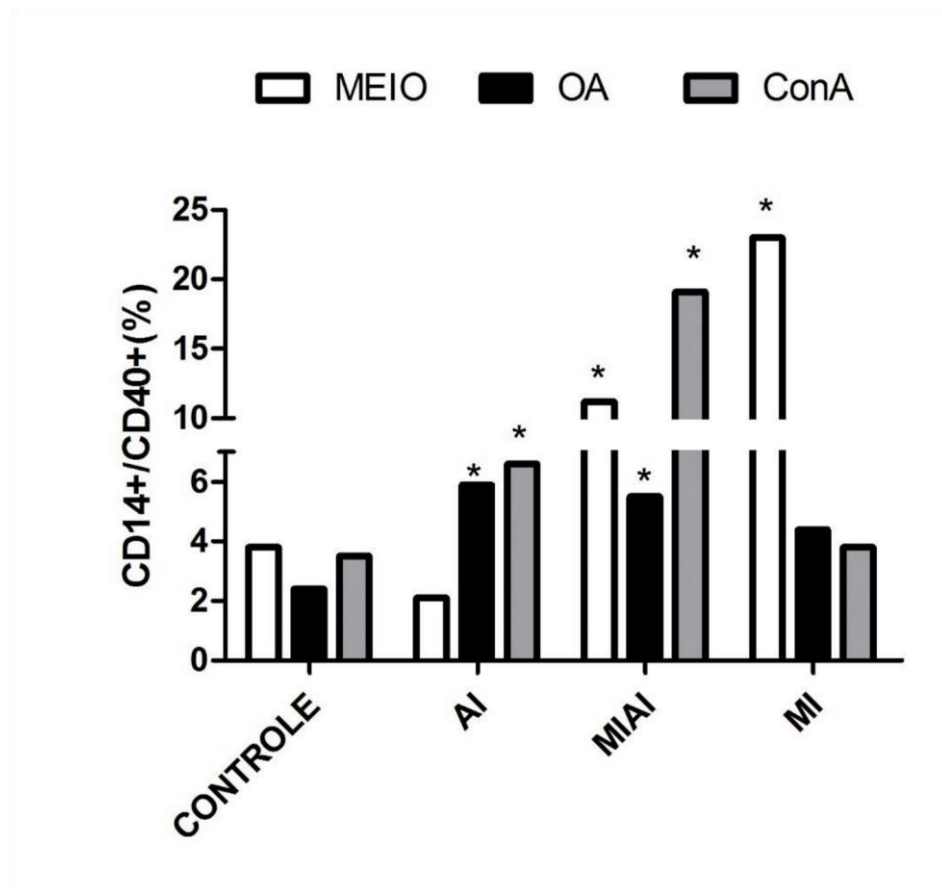


Figura 2- Frequência de células esplênicas CD14+CD40 de camundongos adultos nascidos e amamentados em mães não-sensibilizadas com SWAP (CONTROLE), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e apenas nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni* e imunizados com OA. 5×10^6 células cultivadas com meio RPMI, OA (500 mg/mL) e ConA(5µg/mL), e marcadas com anticorpos antiCD14 (FITC), anti-CD40(PE). Foi considerada diferença significativa, frequência maior que 2 vezes para o fenótipo analisado. * $p < 0,005$ quando comparado ao CONTROLE.

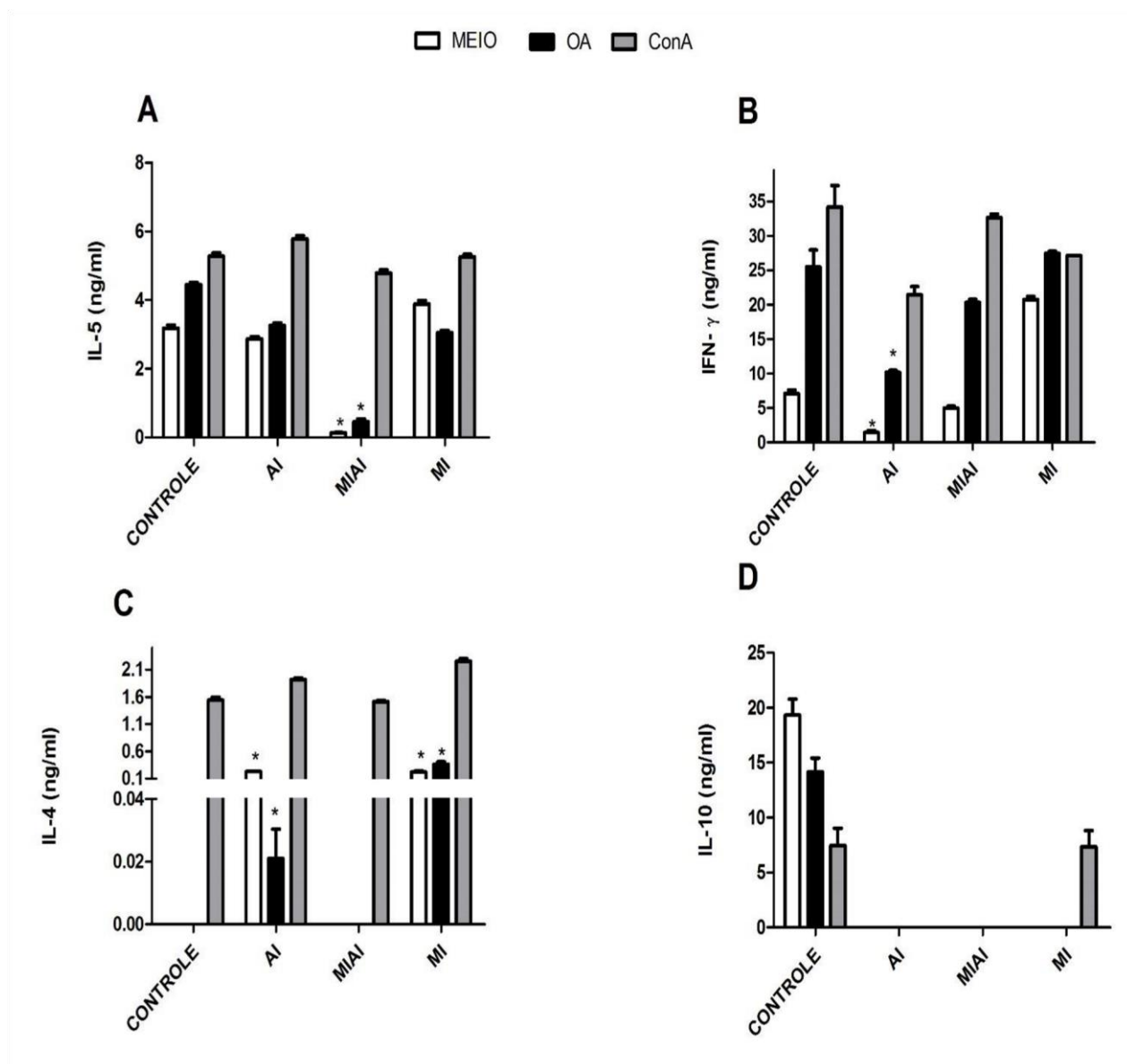


Figura 3- Níveis das citocinas IL-5 (A), INF- γ (B), IL-4(C) e IL-10 (D) produzidas por camundongos Swiss webster nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas (CONTROLE), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni* e imunizados com OA. 5×10^6 células forma estimuladas com ConA (5 μ g/mL). As citocinas foram quantificadas no sobrenadante depois de 24 hrs por ELISA de captura. Os resultados são representados pela média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,005$ quando comparado ao CONTROLE

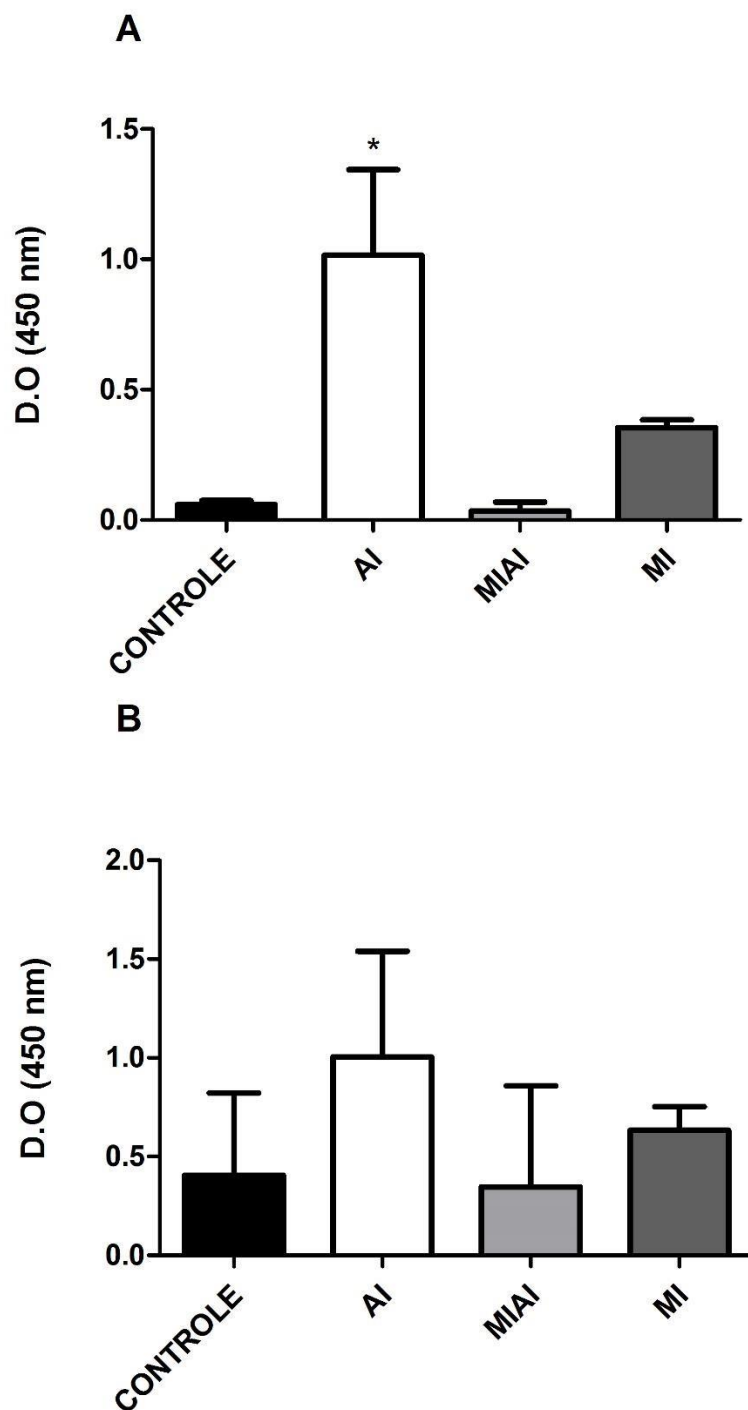


Figura 4- Títulos de anticorpos IgG1 anti-OA (A) e IgG2a anti-OA (B) nos soros de camundongos *Swiss webster* nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas (CONTROLE), apenas amamentados em mães sensibilizadas (AI), nascidos e amamentados em mães sensibilizadas (MIAI) e nascidos em mães sensibilizadas (MI), submetidos a infecção com 80 cercárias do *S. mansoni* e imunizados com OA. Os níveis dos isótipos foram dosados por ELISA indireto, nas diluições 1:512 (IgG1) e 1:8 (IgG2a). Os resultados expressam a mediana da D.O de 3 a 5 animais/grupo. * $p < 0,005$ quando comparado ao AI.

REFERÊNCIAS

1. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES ES, 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* 2016;1-10.
2. ZACCONE P, FCHERVAN Z, JONES FM, SIDOBRE S. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 1439–1449.
3. EBERLE C, MERKI E, YAMASHITA T, et al. Maternal immunization affects in utero programming of insulin resistance and type 2 diabetes. *PLos one* 2012;7: 1-12, e4536.
4. AMU S, SAUNDERS SP, KRONENBERG M, MANGAN NE, ATZLAGER A, FALLON PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 1114-1124.
5. NASSEF NE, EL-KERSH WM, EL-NAHAS NS, EL-DIN SAS, ELDEEN SAS. *Schistosoma mansoni* infection or soluble egg antigen immunization can reduce allergic airway diseases. **Menoutia Medical Journal** 2015; 642-649.
6. PACÍFICO LGG, MARINHO FAV, FONSECA CT, et al. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent of Interleukin-10. *Infect. immune* 2009; 77: 98–107.
7. ETEWA, S, EABD EL-AAL1 NF, ABDEL-RAHMAN SA, EL-SHAFFEY MA. et al. Parasitological evaluation of potential candidate vaccines in *Schistosoma mansoni* infected mice 2014; 6: 23-30.
8. CARDOSO LS, OLIVEIRA SC, GOES AM, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clinical exp. immunol.* 2010; 160: 266-274.

9. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES E, et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression. In antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Exp. Parasitol* 2014; 141: 62-67.
10. SANTOS, P.A, SALES IRF, SCHIRATO GV, et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res.* 2010; 107: 95102.
11. KULLBERG MC, PEARCE EJ, HIENY SE, SHER A, BERZOSKY JA. et al. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. *J. Immunol*; 1992; **148**: 3264-3270.
12. HEWITSON JP, HAMBLIN PA, MOUNTFORD P. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol.* 2005; 7: 271-280.
13. SALES, IANA RAFAELA FERNANDES. Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. 150 folhas: Il., fig, 30cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. TESE (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2015.
14. SHIPKOVA M, WIELAND E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. chim. acta.* 2012; 413: 1338–1349.
15. FIELD, C.J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *J.Nutr.* 2005: 1-4.
16. CURWEN RS, ASHTON PD, JOHNSTON DA, WILSON A. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. *Mol. biochem. parasitol.* 2004; 138: 57-66.
17. NÓBREGA CGO, FERNANDES ES, NASCIMENTO WRC, et al. Transferência passiva de anticorpos específicos para antígenos de *Schistosoma mansoni* em camundongos nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas. *J Health Sci Inst* 2012; 30: 17-21.

18. COLLEY DG, MONTESANO MA, FREEMAN GL. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes infect.* 1999; 1: 517-524.
19. FAIRFAX KC, AMIEL E, KING IL, FREITAS TC, MOHRS M. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *Plos Pathog* 2012; **8**: 1-13.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A amamentação em mães sensibilizadas com SWAP, seguida de infecção pós-natal, amenizou a inflamação granulomatosa, reduzindo a deposição de colágeno, assim como nos descendentes nascidos e amamentados, enquanto que a gestação não alterou a inflamação hepática.
2. Para antígenos homólogos, a amamentação em mães sensibilizadas com SWAP, levou a uma maior frequência de células CD4+/CD28+ e CD14+/CD40+, em resposta ao mitógeno, além de melhorar a produção de anticorpos IgG1 anti-SWAP com baixos níveis de INF- γ , e alta síntese basal de IL-10, enquanto a gestação em mães sensibilizadas, incrementa apresentação dos macrófagos com alta frequência de células expressando CD14+CD40+, mantém dos níveis de anticorpos específicos, com alta síntese de IL-10.
3. Para antígeno heterólogo, o contato prévio com o leite de mães sensibilizadas com SWAP, levou há um status de pró-ativação basal, observado pela alta frequência de células CD4+CD28+ e CD14+ CD40+, além de melhorar a produção de anticorpos com altos títulos de IgG1 anti-OA, já a gestação em mães sensibilizadas demonstra uma alta frequência basal de células expressando CD14+CD40+, além de preservar a imunidade humoral anti-OA, ambas gestação e amamentação induzem um perfil de resposta Th2.

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.** v. 125, n. 5, p.1114-1124, 2010.
- ANTHONY, B.J; RAMM, G.A.; MCMANUS, D.P. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Cell press.** v.28, n. 12, p. 572-580, 2012.
- ATTALLAH, A.M. et al. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **J. trop. med. hyg.** v. 68, n. 6, p. 647–651. 2003.
- ATTALLAH, A.M. et al. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni* infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. **Parasitol. Res.** v. 99, n. 2, p.137–145, 2006.
- BAFICA, A.M.B. et al. Changes in T-cell and monocyte phenotypes *in vitro* by *Schistosoma mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. **J. Parasit. Res.** v.2012, p. 1-10, 2012.
- BARBOSA, C.S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 101, n.I, p. 55–62, 2006.
- BLEWETT, H.J.H. et al. The immunological components of human milk. **Adv. food nutr. res.** v. 54, p. 45-80, 2008.
- BLOIS, S.M. et al. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. **Biol. Reprod.** v. 70, n. 4, p.1018-1023, 2004.
- BURKE, M.L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite immunol.** v. 31, n. 4, p. 163–176, 2009.
- CALDAS, I.R. et al. Human schistosomiasis mansoni: Immune response during acute and chronic phases of the infection. **Acta. trop.** v. 108, n. 2-3, p. 109-117, 2008.
- 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.

CARDOSO, L.S. et al. *Schistosoma mansoni* antigen-driven interleukin-10 production in infected asthmatic individuals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 101, p. 339-343, 2006.

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, p. 266-274, 2009.

CARDOSO, L.S. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate allergic response *in vitro* in cells of asthmatic individuals. **Drug dev. res.** v. 72, p. 538–548, 2011.

CARDOSO, L.S, et al. *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets,** v.12, p. 24-32, 2012.

CHIARAMONTE, M.G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology.** 2001.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Cell press.** v. 30, n.3, p. 141-150, 2014.

DURÃES, F.V. et al. IL-12 and TNF- α production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent, **Immunol. lett.** v.125, p. 72-77, 2009.

EBERLE, C. et al. Maternal immunization affects in utero programming of insulin resistance and type 2 diabetes. **PLoS one.** v. 7, n.9, p. 1-12, e4536. 2012.

EL-AHWANY, E., et al. T regulatory cell responses to immunization with a soluble egg antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Korean J. Parasitol.** v.50, p. 29-35, 2012.

ELIAS, D. et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine.** v. 23, n. 11, p.1326– 1334, 2005.

FIELD, C.J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. **J.Nutr.** p.1-4, 2005.

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

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

GABER, H.M. et al. Immune responses in mice after immunization with antigens from different stages of the parasite *Schistosoma mansoni*. **Z. naturforsch.** v.65c, p.289-302, 2010.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. dis. clin. north. am.** v. 26, p. 383–397, 2012.

GUSTAVSON, S. et al. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol. res.** v.51, p.259-269, 2002.

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, IL10, TGF-beta and TNF-alpha. **J. Reproduc Immunol.** v. 71, p. 41-56, 2006.

HAMS, E., AVIELLO, G. FALLON, P.G The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**. v.4, n.89, p.1-6, 2013.

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

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

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

HIRSCH, C.; GOES, A.M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro. **Parasitology**. v.112, p.529-535, 1996

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**. v.115, p.21-28, 1997.

JACOBS, W. et al Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation *in Vivo*. **Am.j.pathol.** v.150, n.6, p. 2033-2045, 1997.

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

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 105, 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, n. 4, p. 257-267. 1987.

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

MALHOTRA I. et al. Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis. **J. immunol.** v.162, p. 6843-48, 1999.

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

MELO, T.T. et.al. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) in association with CpG-ODN. **Microbes infec.** v.15, p-28-36, 2013.

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, p. 1224-1231, 2004.

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

NASSEF, N.E. et al. *Schistosoma mansoni* infection or soluble egg antigen immunization can reduce allergic airway diseases. **Menoutia Medical Journal.** p.642649, 2015.

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

PACÍFICO, L.G.G. et al. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent of Interleukin-10. **Infect. immune** v. 77, n. 1, p. 98–107, 2009.

PEARCE, E.J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. exp. med.** v. 173, p. 159-166, 1991.

PEARCE, E.J., MACDONALD, A.S.. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. rev. immunol.** v.2, p.499-511, 2002.

REZENDE, C.F.M. et al Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: Effects on granuloma down-modulation and cytokine production. **Immunol. lett.** v.141, p 123-133, 2011.

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

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

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

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

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

SANTOS, P.A. et al. Gestation and breastfeeding in schistosomal mothers differently modulate the immune response of adult offspring to postnatal *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst Oswaldo Cruz.** p. 1-10, 2016 .

- SMITS, H.H. et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. **J Allergy Clin Immunol** v.120. p, 932-940, 2007.
- STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. CD4 T-cell memory. **Semin. Immunol.**, v. 16, n. 5, p. 295-303, 2004.
- STRAUBINGER, K. et al. Maternal immune response to helminth infection during pregnancy determines offspring susceptibility to allergic airway inflammation. **J Allergy Clin Immunol** v. 134, n. 6, p. 1271-1279e10, 2014.
- SULBÁRAN, G. et al. Immunoprotection of mice against Schistosomiasis mansoni using solubilized membrane antigens. ~~PLOS Neglected Tropical Disease.~~ v.7, n.6, p.113, 2013.
- 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. p, 3671-3682, 2011.
- 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. B10 cells induced by *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens modulated regulatory T cells and cytokine production of T cells. **Parasitol. res.** v.114, p. 3827-3834. 2015.
- UTZINGER, J. et al. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta trop.** v.120, suppl. 1, p, S121-S137, 2010.
- WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol.** v. 85, p. 148154, 2007.
- WEINER, H.L. et al. Oral tolerance. **Immunol. rev.** v. 241, p, 241-259, 2011.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/>>. Acesso em: 10 fev 2016
- XU, J. et al. *Schistosoma japonicum* infection induces macrophage polarization. **J. Biom. Res.**-v.28, n.4, p-299-308, 2014.
- ZACCONE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **Eur. J. Immunol.** v. 33, p.1439–1449, 2003.

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

APÊNDICE

APÊNDICE A- VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

Artigo submetido à revista Parasite Immunology

ORIGINAL PAPER

EFFECT OF BREASTFEEDING E GESTATION IN SENSITIZED MOTHERS WITH *SCHISTOSOMA MANSONI* WORM ANTIGENS (SWAP) IN THE GRANULOMATOUS RESPONSE DESCENDANTS

Maria da Conceição Silva¹; Virgínia Maria Barros Lorena²; Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda¹; Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^{1,3}; André de Lima Aires^{1,3}; Vláudia Maria Assis Costa^{1,3}; Patrícia d'Emery Alves Santos¹ Valdênia Maria Oliveira de Souza^{1,4}

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

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

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

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

*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

ABSTRACT

Maternal schistosomiasis, during pregnancy and breastfeeding modulate immunity in the offspring as adults. However, little is known about the effects of maternal sensitization to parasite antigens of *Schistosoma mansoni* (SWAP). We evaluate the immunity to homologous antigens in mice adult born/suckled by mothers sensitized with SWAP. Newborns were divided into: born (BIM), suckled (SIM) or born/suckled (BSIM) in sensitized and non-sensitized mothers (CONTROL). When adults, the descendants were infected (80 cercariae of *S. mansoni*). We evaluate the T cell activation status and macrophages, antibodies levels (IgG1 e IgG2a) anti-soluble worm antigen preparation, cytokines production and histomorphometry of hepatic granuloma. Compared to CONTROL group, SIM and BSIM under postnatal infection had lower deposition of collagen. There was a greater IL-10 production in experimental groups, and increased frequency of CD14⁺ CD40⁺ in the BSIM, lowest IFN- γ and increased frequency of CD4⁺ CD28⁺ in the SIM. In the BIM group had higher baseline frequency of CD4⁺CD28⁺ and CD14⁺CD40⁺ cells, but were reduced in response to mitogen. There was a higher production of isotype IgG2a anti-SWAP in all experimental groups and anti-IgG1 SWAP only in the SIM group. Thus, the breastfeeding diminished granulomatous inflammation and pregnancy increases presentation of macrophages with IL-10.

Keywords: SWAP. Gestation. Breastfeeding. Sensibilization

INTRODUCTION

The prevalence of women of childbearing age and pregnant chronically infected with *Schistosoma* is high, around 60% in endemic areas for schistosomiasis (1-3). The schistosomiasis *mansoni*, considered a chronic course of disease is characterized by granulomatous and fibrotic reaction around the parasite eggs trapped in the liver and intestine (4). However, it is not common in endemic regions severe cases resulting from granulomatous response (5). Several studies have reported that during granulomatous reaction, SEA induce a strong Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) (6, 7) and decrease of proinflammatory mediators as TNF- α , MCP-1, VCAM-1 and CD68 (8), which negatively regulates Th1 response induced by the worm antigens (SWAP) (9). Associated with Th2 response, is stimulation of regulatory T cells (Tregs) and IL-10, which help in controlling granuloma, protecting the host worsening of the disease

(10-12). Interestingly, this phenomenon seems to be kept in adult offspring during postnatal infections.

In mice, for maternal infection with *Schistosoma mansoni* it was demonstrated sensitization in the offspring, by exposure *in utero* and via breastfeeding and there were smaller size and number of hepatic granulomas and lower recovery of worms. Furthermore, increased expression of the gene regulatory cytokine IL-12 and TGF- β (13, 14). In this scenario, Santos et al (2016) studied the influence of pregnancy and breastfeeding separately in schistosomotic mothers. These authors showed that pregnancy in infected mothers led an exaggerated granulomatous response (intense collagen deposition and more granulomas) in the offspring infected in adulthood. This effect was reversed by breastfeeding on infected mothers, as it led to the decrease in the intensity of infection and attenuation of granulomatous reaction.

For decades, studies have been made of the immunomodulatory capacity of *Schistosoma antigen*, for use as a granulomatous response attenuation tool (16, 17). Among these studies, we highlight the use of soluble worm antigen (SWAP). In experimental models, there was a decrease of granulomatous hypersensitivity to eggs of

S. mansoni in mice that were sensitized with worm antigens and subsequently infected (18). Gustavson et al (2002) reported that the transfer of pulsed macrophages with antigenic fractions SWAP led to a 60% reduction in granuloma size, and high IFN- γ and IL-2 and low levels of IL-4. Furthermore, sensitization with the worm antigen induces a strong humoral immune response, reduction in worm recovery, reduction in size and weight of the livers, fewer and granuloma size with less inflammatory infiltrate (20, 21).

Durães et al (2009) observed that during the initial phase of infection with *S. mansoni* contact with the worm parasitic antigens, triggered activation of dendritic cells, regulating the expression of costimulatory molecules (CD40 and CD86) and inducing the production of cytokines such as TNF- α and IL12p40. Immunization with tegument antigens of *S. mansoni*, while reducing the parasitic load and the removal of the eggs, increased frequency of CD4+CD25+, CD19+, activation of macrophages demonstrated by the increase in the frequency cells F4+ 80 +, F4 + 86+, and high levels of IFN- γ and IL-4 and low levels of IL-10 (23).

Thus, knowing the SWAP immunoregulatory potential, we investigated the immune response descendants previously born or breastfeeding mothers in sensitized to this antigen when compared to the offspring of non-sensitized mothers. We evaluated the granulomatous

reaction, the activation status of T-helper cells, the antigen presentation capacity of macrophages, production of antibodies and cytokines. Our results show that breastfeeding sensitized mothers with SWAP, reduces the deposition of collagen and front to the polyclonal stimulation, remains increased frequency of lymphocytes T CD28+ and CD14+/CD40+, while gestation induces a suppressor potential, with high IL-10 levels.

MATERIALS AND METHODS

Maternal sensitization with SWAP

Four-week-old *Swiss webster* female mice were sensitized subcutaneously with 100µg/SWAP (24, 25 modified) on alum (Aziram, Chemical Union). The females were caged with 1 male for 2 females each (1: 2) and successful mating was checked by presence of a vaginal plug. The same procedure were performed in non-sensitized females. The mice were housed in the animal care facility at the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the FIOCRUZ-PE Commission (CEUA-70/2014).

Infection protocol and study groups

After the birth, the newborns of the sensitized mothers or non-sensitized were housed in cages with interchanged mothers. After adoptive breastfeeding, offspring BIM were suckled by non-sensitized mothers and offspring SIM were suckled by sensitized mothers. Another group of animals was born and suckled by sensitized mothers. Animals born from non-sensitized mothers 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).

Detection of SWAP-specific antibodies by ELISA

On 60 th day posinfection, blood samples were taken by cardiac puncture from each group under intramuscular anesthesia with xylazine HCl / Ketamine HCl. Plasma samples were tested individually for IgG1 and IgG2a antibodies SWAP (5 ug / ml IgG2a and 1.25 ug / ml for IgG1) coated 96-well plates (Nunc Maxisorp, Roskilde, Denmark) and biotinylated goat anti-mouse IgG1 or IgG2a (Southern Biotechnology Associates, Inc, AL, USA). The reactions were developed with a streptavidinperoxidase conjugate (Sigma Aldrich) and an O-

phenylenediamine (Sigma-USA) solution in 0.1M citrate buffer plus H₂O₂. The plates were read (450nm) in an automated ELISA reader. Titration curves were carried out for all the samples. The results are expressed as the median of the samples optical densities from each group (n=) in an appropriated dilution (within the linear part of the titration curve) for each isotype $\pm$ standard error (1: 32 for IgG1 and 1: 8 IgG2a).

Cell culture

The spleens of the each animal was harvested after euthanasia by cervical deslocation. Cell suspensions were prepared in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with HEPES (10mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM), 216mg Lglutamine, gentamycin (50mg/mL) and 5% of Foetal Bovine Serum - PBS (SigmaAldrich). The spleens cells from each group (n=) were cultivated at a final concentration of 5×10^6 cells/mL in 8 mL tubes and subsequently stimulated with concavalin-A (Con-A) (5 μ g/mL) at 37 ° C in 5% CO₂. Supernatants were harvested after 24h and assayed for cytokine content. Cells cultured were collected and double labelling with fluorochrome-labelled antibody.

Cytokine assay

The cytokines were measured using specific two-site sandwich ELISA, using the following monoclonal antibodies: for IL-4, 11B11 and biotinylated BVD6-24G2; for IFN- γ , AN18 and biotinylated XCM1.2; for IL-5, 39D10 and biotinylated 5A10 and for IL-10, C252-2A5e SXC-1biotinilado. Binding of biotinylated antibodies was detected using a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an ABTS (2-2-azinobis (3ethylbenzene-thiazoline-6-sulfonic acid), Sigma) solution in 0.1M citrate buffer plus H₂O₂. The plates were read (405nm) in an automated ELISA reader. The samples were quantified by comparison with the standard curves of purified recombinant cytokines (rIL-4, rIL-5, rIFN- γ and rIL- 10), with resulting detection limits of 0.3125 ng/ml for IL-4, IFN- γ and IL-10, 0.1562 ng /ml for IL-5.

Immunophenotyping of cells

The spleen cells of male offspring of all groups were submitted for doublelabelling with fluorochrome-labeled antibody solutions at a concentration 0,1mg /10⁶ cells: FITC anti-mouse CD4 plus PE anti-mouse CD28 or CD154 or CTLA-4, as well as FITC anti-mouse CD14 plus PE anti-mouse CD40 (BD Biosciences Pharmigen). Data acquisition was performed using a flow cytometry FACSCalibur (BD Pharmingen, USA) CPqAM/FIOCRUZ by collecting a

minimum of 10,000 events per sample for lymphocytes and 1,000 events per sample for macrophages. For the results of flow cytometry, it was considered a statistically significant difference 2 times higher in phenotypes found among the groups.

Histomorphometric study of liver tissue

On the 60th dpi, animals from control, BIM, SIM and BSIM groups, the livers were harvested after anaesthesia and euthanasia, and 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 (4µm) were cut using microtome Yamato (Japan) and the slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and trichrome Masson (selective for collagen) for morphometry study. The study was performed using ImageJ Software (National Institute of Health, Bethesda, MD) for measuring the average diameter (micrometer - µm) of granulomas, with subsequent calculation of the area (µm²), and intensity of blue stain (specific for collagen) in histograms. Analyses were performed on images randomly obtained 10-20 fields/ animal (100x). The histomorphometric study was performed in five animals/group.

Statistical analysis

For antibody production and histomorphometric analysis of liver sections, the Kruskal-Wallis test. The multiple comparisons were performed by Mann-Whitney test. For the results of cytokine analysis, an one way analysis of variance followed by Tukey's method were used. For statistical analysis, we used the Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA) and all findings were considered significant at $p < 0.05$. For the results of flow cytometry was considered significant difference frequency greater than 2 times for phenotype analysis. Results show one representative experiment of three independent repetitions.

RESULTS

Histomorphometric study of liver tissue descendants of sensitized mothers with SWAP and infected in adulthood

The histomorphometric study was performed in the liver of the offspring born and/or suckled sensitized mothers with SWAP, when infected postnatal. Compared to the descendants of non-sensitized mothers (CONTROL), there was no difference in the recovery of worms and size of granulomas of experimental groups (Table 1, Appendix C). Although no statistical difference was observed in the offspring who had previous contact with the breast milk of

sensitized mothers, SIM and BSIM, low eggs per gram of feces. Regarding the presence of collagen, there was no difference between the descendants of the BIM group and CONTROL, but there was a decrease in SIM and BSIM groups. In addition, there was lower production of collagen in the BSIM group compared to the SIM.

Lymphocyte activation status and macrophages in offspring of mothers sensitized with SWAP.

The evaluation of lymphocytes T helper, in offspring of sensitized mothers SWAP and subjected to postnatal infection was performed by marking CD28 molecules, CD154 and CTLA-4 after culture with only culture medium (basal) or added to mitogen (Con-A). Thus, in relation to CONTROL, could be observed that the baseline frequency of CD4 + CD28 + cells in the only born offspring is higher, then the only suckled offspring (CONTROL = 0.09%; BSIM = 0.15%; SIM = 0.38%; BIM = 1.81%) (Fig.1A).

Front mitogenic stimulus, there was a higher frequency of CD4 + CD28 + cells in the groups receiving breast milk of mothers sensitized, and no difference in BIM group compared to the Control (CONTROL = 0.35%; BSIM= 2.15% ; SIM = 1.2%; BIM = 0.40%) (Fig.1A). Regarding the frequency of CD4+/CD154+ cells, the frequency was higher in the BIM group, while there was a lower frequency of CD4+/ CTLA-4+ (CONTROL = 0.06%; SIM = 0.04%; BSIM= 0.07%; MI = 0.01%). There was no statistical difference in the frequency in SIM and BSIM groups (Fig. 1B and Fig. 1C)

The baseline frequency of CD14+/CD40+ cells was significantly higher in descendants that were born in sensitized mothers, BIM and BSIM when compared to CONTROL (CONTROL = 1.9%; SIM = 1.2%; BSIM= 28.0%; BIM= 15.8%). Front mitogen stimulation, the frequency of CD14 +/ CD40 + cells was high in all groups, being lower in the BIM group compared to offspring who receiving breast milk of sensitized mothers (CONTROL = 3.5%; SIM = 14.2%; BSIM = 19.4%; BIM = 8.9%) (Fig.1D).

IL-5, IL-4 and IFN- γ in offspring of mothers with sensitized SWAP when infected postnatal.

The supernatants of splenocyte cultures of the groups studied, were analyzed for cytokine contents after cultivation with or without the mitogen.

In relation to baseline production when compared to the control group, was not detectable level of IL-5 in BSIM group and there was less production of this cytokine in the

BIM group (Fig. 2A). Lower levels IFN- γ were observed in the supernatant of the SIM group (Fig. 2B). In experimental groups (SIM, BSIM and BIM) there was IL-10 production with higher levels in the latter group (Fig. 2D). Under these culture conditions, IL-4 was not detected (Fig 2C).

In response to mitogen, there was no statistical difference between the IL-4 levels, IL-5, IFN- γ between the experimental groups and the control group (Fig. 2 A; B and C). However, IL-10 was at lower levels in animals BIM in the control group and was not detected in the descendants that had ingested the breast milk of sensitized mothers, SIM and BSIM (Fig. 2D).

Anti-SWAP antibody production in mothers of offspring sensitized with SWAP, in postnatal infection.

The levels of anti-SWAP IgG2a antibodies were similar in all experimental groups and significantly higher than the control group (Figure 3B). In contrast, antiSWAP IgG1 antibody levels were significantly higher only in the SIM group compared to the control group (Fig. 3A).

DISCUSSION

Maternal schistosome infection leads to hyperresponsiveness observed by the reduction in granuloma size in adult offspring when infected (13-15). Here, we evaluated the effect of maternal sensitization, only with the antigens of the worms and the influence of pregnancy or breastfeeding these mothers. In response to *in vivo* homologous antigens, granulomatous reaction, basal activation status of lymphocytes T and macrophages was observed, as well as the immunity of the offspring a broader spectrum under mitogenic activation.

In such conditions, the descendants born and followed by breastfeeding sensitized mothers with SWAP (BSIM) had fewer eggs in the feces and less collagen deposition in the granulomas, increased production of IL-10 and marked decrease of IL5, with maintenance the IFN- γ levels.

These data corroborate studies that report a decrease of granulomatous hypersensitivity, as well as the parasite load in sensitized hosts with SWAP or cells pulsed with fractions derived from this antigen (19, 26, 23). Mice schistosomiasis, during the pre-patent period of the infection or vaccinated with antigens of worms showed a Th1 profile, with high levels of IFN- γ , IL12p40 and TNF- α , with decreased IL-4, either with or without high IL-10 levels (6, 16, 22, 23, 27). These data suggest that early contact during maternal sensitization with SWAP,

perpetuates negative immunomodulation of granulomatous reaction, with impaired Th2 response observed in the sensitized host. It is worth noting that the dose of maternal sensitization was based on vaccination models with SWAP and its fractions (24, 25 modified) in order to evaluate the use of parasite antigens as an ally in the modulation of pathology hepatic the descendants who live in areas prone to infection.

During the pre-patent period of *S. mansoni* infection and immunization with the worm in tegument was no improvement in the T lymphocytes collaboration capabilities with macrophages, for having increased expression of co-stimulatory molecules CD86/CD80 and co-effector CD40 (22,23). Here, this feature SWAP has been preserved in the offspring of mothers sensitized to this antigen, revealed by the higher frequency of macrophages expressing CD40 in BSIM group. Although this condition is known to improve effector T response, this molecular interaction is also required for IL10 production by macrophages is as by Treg (28, 29).

Interestingly, although negative modulation in the liver and status basal immunosuppression an improvement in the immunity of descending was observed against polyclonal stimulation, the production of cytokines marker Th1 and Th2 was not affected and no IL-10 production. Moreover, a better expression of molecules important in lymphocyte activation, such as CD28 and CD40 on macrophages. Then, the Th1/ Th2 imbalance basal and IL-10 production were reversed under polyclonal stimulation. These results suggest that immunity to antigens unrelated to the worm can be preserved. In fact, the born and suckled on mothers schistosomotic descendants, the antiovalbumin immunity was restored, an increase of IFN- γ (15).

The findings of animals only suckled or born in sensitized mothers emphasize the importance of breastfeeding in this immunomodulatory phenomenon and seems to exclude the IL-10 as a single immunomodulatory factor.

In the BIM group, despite the very high IL-10 production was not changed in hepatic inflammation. The increased production of IL-10, these descendants, has been demonstrated in other experimental models (30,31,15) and appears to be involved with the fact of *S. mansoni* antigens, amplify the condition *in utero* production IL-10 by antigen presenting cells (32-34) printing this feature to adult life.

In group SIM, there were fewer eggs and less collagen deposition with increased production of IL-10 and decrease IFN- γ , maintaining the levels of IL-5. It is worth mentioning

that these descendants control of granulomatous reaction was less intense than in BSIM group. We believe that the drastic decrease in IL-5 is crucial to contain collagen deposition, as well as decreased IFN- γ . In fact, although IFN- γ have proinflammatory role in the initial formation of granuloma, IL-5 is associated with more fibrotic granuloma. Reiman et al. (2006) showed that knockout mice for IL-5 decreased hepatic inflammation, fibrosis and size of granulomas, with few or no eosinophils in the liver. The absence of eosinophils takes there is a reduction in the production of IL-13, a key cytokine in the activation of alternatively activated macrophages (M2) responsible for tissue remodeling and fibrosis. Then, these data underscore that it is possible that previous breastfeeding mothers sensitized SWAP mechanism or stimulate other immunomodulatory molecules, including Treg cells and/or TGF- β production. Currently, these hypothesis are being evaluated.

Regarding the production of antibodies, there were higher anti-SWAP IgG1 levels compared to isotype IgG2a, the descendants infected postnatal (CONTROL), corroborating one Th2 profile of schistosome infection and induced SWAP. However, the profile of the offspring of mothers sensitized SWAP was directed to the production of the IgG2a isotype anti-SWAP, either in breastfed and/or born in these mothers. Interestingly, the SIM group were also increased levels of anti-IgG1 isotype SWAP, corroborating the potentiating effect of breast milk in previous contact with antigens and antibodies to *S. mansoni* (30, 36, 37). Additionally, this result brings out the participation of the IgG1 isotype in the modulation of granulomatous reaction in individuals receiving sensitized mothers milk. In fact, the immunomodulatory action of the IgG1 isotype has been demonstrated (36, 4). Furthermore, sensitized mothers had higher levels of anti-SWAP IgG1 to IgG2a for this antigen (Appendix D) and we have demonstrated that there is no passage of IgG2a anti-SWAP maternal isotype, either via milk or placenta to descendants (38). Action anti-SWAP IgG1 isotype in granulomatous modulation deserves further investigation.

It is important to note that breastfeeding and pregnancy separately in sensitized mothers led to a baseline status of pro-activation of T lymphocyte.

There was CD28 expression in the SIM group and under mitogenic stimulation only breastfed offspring maintained increased the frequency of CD28 + T lymphocytes and now have more macrophages with CD40, absence of IL-10 in SIM animals (and BSIM). These data corroborate the dichotomous immunomodulatory character breastmilk (tolerogenic in

granuloma and stimulator in response to mitogen) in young age (39-41) that seems to be maintained in the offspring breastfed in sensitized mothers SWAP.

In response basal MI group had more CD28 +, and CD40L expression and less CTLA-4, and more macrophages expressing CD40. However, this status is not maintained under mitogenic stimulation. These data confirm the pregnancy suppressant potential mothers in contact with antigen *S. mansoni*, (30, 31) supported by the IL-10 synthesis in response to mitogen.

In conclusion, our findings show that breastfeeding mothers exposed to *S. mansoni* worm antigens is required for control of chronic liver disease and still favors a better immune status in the offspring of endemic areas. The findings point out that the search for immunomodulatory tools coming from helminths nested with the modulation of the immune system in early life, can be effective in controlling liver immunopathology, taking into account the role of breast milk in endemic area of individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

To Gerlane Tavares de Souza Chioratto, for veterinary support, Laurimar Thomé da Rocha, for technical assistance, and to the PDTIS/Fiocruz, for the use of its facilities.

REFERENCES

1. FRIEDMAN JF, MITAL P, KANZANIA HK, OLDS R, KEATINS JD. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol* 2007; **4**: 159-164.
2. SALAWU OT, ODAIBO A.B. Schistosomiasis among pregnant women in rural communities in Nigeria. *Int. j. gynaecol. obstet* 2013; **122**: 1-4.
3. DAUBY, N, GOETGHEBUER T, KOLLMANN TR, LEVY J, MARCHANT A. Uninfected but not unaffected: chronic maternal infections during pregnancy, fetal immunity, and susceptibility to postnatal infections. *Lancet Infect Dis* 2012; **12**: 330-340.
4. FAIRFAX KC, AMIEL E, KING IL, FREITAS TC, MOHRS M. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *Plos Pathog* 2012; **8**: 1-13.

5. CALDAS IR, CAMPI-AZEVEDO AC, OLIVEIRA LFA, et al. Human schistosomiasis mansonii: Immune response during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 2008; **108**: 109-117.
6. KULLBERG MC, PEARCE EJ, HIENY SE, SHER A, BERZOSKY JA. et al. Infection with *Schistosoma mansonii* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. *J. Immunol*; 1992; **148**: 3264-3270.
7. PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. rev. immunol* 2002; **2**: 499–511.
8. WOLFS IMJ, STOGER J, GOOSSENS P. et al. Reprogramming macrophages to an anti-inflammatory phenotype by helminth antigens reduces murine atherosclerosis. *The Fatesb Journal*; 2014; 288-299.
- 9-BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Paras.Immunol* 2009; **31**:163–176.
10. MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol* 2004; **173**: 1224-31.
11. WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol.* 2007; **85**: 148-154.
12. CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Cell press* 2014; **30**: 141-150.
13. ATTALLAH AM, ABBAS AT, DESSOUKY MJ, ELI-ENSHATY HL, ELSHIKHA HM. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansonii*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansonii* infection. *Parasitol. Res.* 2006; 99:137–145.

14. OTHMAN AA, SHOHEIB ZS, SAIED EM, SOLIMAN RH. Congenital exposure to *Schistosoma mansoni* infection: impact on the future immune response and the disease outcome. *Immunobiology* 2010; 215: 101-112.
15. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES ES, 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* 2016;1-10.
16. JACOBS W A, BOGERS J, DEELDER A, WERY M, VAN MARCK E. Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation *in vivo*. *American Journal of Pathology* 1997; **150**: 2033-2045.
17. ZOUAIN, CS, FALCÃO PL, GOES TS, LEITE MF, GOES AM. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates *in vitro* granuloma formation by regulating CD28- CTLA-4, and CD86 expression in humans. *Immunol. lett* 2004; 91:113-118.
- 18-HIRSCH C, GOES AM. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. *Parasitology*. 1996; 112: 529-535.
19. GUSTAVSON S, ZOUAIN CS, ALVES JB, LEITE MF, GOES AM. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. *Parasitol. Res.* 2002; **51**: 259-269.
20. SULBÁRAN G, NOYA O, BRITO B, BALLEEN DE, CESARI JM. Immunoprotection of mice against *Schistosomiasis mansoni* using solubilized membrane antigens. *PLOS Neglected Tropical Disease* 2013; **7**: 1-13,.
21. GABER HM, MAGHRABY AS, ALMED MB, RUPPEL A, BAHGAT MM. Immune responses in mice after immunization with antigens from different stages of the parasite *Schistosoma mansoni*. *Z.naturforsch* 2010; **65c**: 289-302.

22. DURÃES FV, CARVALHO NB, MELO TT, OLIVEIRA SC, FONSECA CT. IL-12 and TNF-alpha production by dendritic cells stimulated with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument is TLR4- and MyD88-dependent, *Immunol. let* 2009; **125**: 72-77.

23. MELO TT, ARAUJO JM, SENA JC, ALVES CC, ARAUJO N, FONSECA CT. Evaluation of the protective immune response induced in mice by immunization with *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) in association with CpG-ODN. *Microbes and Infec* 2013; 15: 28-36.

24. ETEWA, S, EABD EL-AAL1 NF, ABDEL-RAHMAN SA, EL-SHAFFEY MA. et al. Parasitological evaluation of potential candidate vaccines in *Schistosoma mansoni* infected mice 2014; 6: 23-30.

25. CARDOSO LS, OLIVEIRA SC, GOES AM, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clinical exp. immunol.* 2010; 160: 266-274.

26. HIRSCH C, ZOUAIN CS, ALVES JB, GOES AM. Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. *Parasitology* 1997; **115**: 21-28.

27. FERRAGINE, C.E; WALLS, C.D.; DAVIES S.T. Modulation of Innate AntigenPresenting Cell Function by Pre-patent Schistosome Infection. *Plos one neglected Tropical diseases.* 2013;7: 1-14.

28. MATHUR RK, AWASTHI A, WADHONE P, RAMANAMURTHY B, SAHA B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat. med.* 2004; **10**: 540-544.

29. GUIDUCCI C, VALZASINA B, DUSLICH H, COLOMBO MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Europ Journ Immunol.* 2005; 35: 557-567.

30. SANTOS P.A, SALES IRF, SCHIRATO GV, et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res.* 2010; **107**: 95102.
31. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES E, et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression. In antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Exp. parasitol.* 2014; **141**: 62-67.
32. HEIKKINEN J, MOTTONEN M, ALANEN A LASSILA O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; **136**: 373-378.
- 33-BLOIS SM, SOTO CD, TONETTEN M, KLAPP BF, MORGNI RA, ARACK PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol. Reprod;* 2004; **70**: 1018-1023.
34. THOMAS, P.G.; HARN, D.A. Jr. Immune biasing by helminth glycans. *Cell. microbial* 2004; **6**: 13-22.
35. REIMAN RM, THOMPSON RW, FENG CG et al. Interleukin-5 (IL-5) Augments the Progression of Liver Fibrosis by Regulating IL-13 Activity. *Infec. immune.* 2006; **74**: 1471-1479.
36. COLLEY DG, MONTESANO MA, FREEMAN GL et al. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotype interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. *Microbes infect.* 1999; **1**: 517-524.
37. MONTESANO MA, COLLEY DG, ELOI-SANTOS S, FREEMAN GL, SCOR WE. Neonatal idiotype exposure alters subsequent cytokine, pathology, and survival patterns in experimental *Schistosoma mansoni* infections. *J.exp. med.* 1999; **189**: 637645.
38. NÓBREGA CGO, FERNANDES ES, NASCIMENTO WRC, et al. Transferência passiva de anticorpos específicos para antígenos de *Schistosoma mansoni* em camundongos nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas. *J Health Sci Inst.* 2012; **30**: 17-21.

39. FIELD, C.J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *J.Nutr.* 2005: 1-4.
40. BLEWETT HJH, CICALO MC, HOLLAND CD, FIELD CJ. The immunological components of human milk. **Adv. food nutr. res** 2008; 54: 45-80.
41. SALES, IANA RAFAELA FERNANDES. Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. 150 folhas: Il., fig, 30cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. TESE (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2015.

LEGENDS OF TABLES AND FIGURES

TABLE 1- Histomorphometric study of liver tissue- a: Swiss webster mice infected with 80 cercariae, SIM, BSIM BIM from sensitized mother with SWAP, 60 days postinfection had their liver subjected to morphometric study. Born from sensitized mothers (BIM), suckled by sensitized mothers (SIM), and born and suckled by sensitized mothers (BSIM) and born and suckled mice from non-sensitized mothers (CONTROL), were analysed under the same conditions [haematoxylin-eosin (H&E) and Masson's trichrome (MT) stains]; b: median $\pm$ standard error (SE) of number of the eggs per gram (epg) faeces. Analysis was conducted 50 days post-infection; c: median $\pm$ SE of parasite burden. Analysis was conducted 69 days post-infection; d: median $\pm$ SE of number of hepatic granulomas per field; e: median $\pm$ SE of size (sectional area) of hepatic granulomas in μm^2 . Analysis of 20 granulomas per animal ($n = 5$) totalling 50 granulomas/group; f: median $\pm$ SE of proportion of collagen obtained from the ImageJ® software; g: $p < 0.05$ compared with the control group. ^h $p < 0.05$ compared with SIM group.

Fig 1. Frequency of splenic cells CD4+CD28+(A), CD4+CD154+(B), CD4+CTLA-4+(C) and CD14+CD40+(D) in adult mice born e suckled by non-sensitized mothers with SWAP (CONTROL), suckled by sensitized mothers (SIM), born and suckled by sensitized mothers (BSIM) e born sensitized mothers (BIM) when infected with 80 cercariae of *S. mansoni*. 5×10^6 cells cultured with RPMI and ConA ($5 \mu\text{g/mL}$), and were labelled with FITC anti-CD4, and PE anti-CD28 or PE anti-CD154 or PE anti-CTLA-4, and FITC anti-CD14 and PE anti-CD40. Was considered significant, frequency difference greater than 2 times to the phenotype. * $p < 0.005$ when compared CONTROL group.

Fig 2- Levels of cytokines: interleukin (IL)-5 (A), interferon (IFN) $-\gamma$ (B), interleukin (IL)-4(C) and interleukin (IL)-10 (D) secreted by spleen cells. Swiss webster born e suckled by non-sensitized mothers with SWAP (CONTROL), suckled by sensitized mothers (SIM), born and suckled by sensitized mothers (BSIM) e born sensitized mothers (BIM) when infected with 80 cercariae of *S. mansoni*. 5×10^6 cells were stimulated with ConA ($5 \mu\text{g/mL}$), for 24 hrs Cytokines were quantified by sandwich ELISA. The results represent the mean $\pm$ standard

deviation* $p < 0,005$ were compared CONTROL. # $p < 0,005$ were compared with SIM and BSIM.

Fig 3. SWAP-specific IgG1(A) and IgG2a (B) antibodies titers in mice sera Swiss *webster* born and suckled in non-sensitized mothers (CONTROL) only suckled in sensitized mothers (SIM), born and suckled in sensitized mothers (BSIM) and born in sensitized mothers (BIM) submitted to infection with 80 cercariae of *S. mansoni*. Measured by ELISA. Results are expressed median O.D. 3 to 5 animals/group. * $P < 0.005$ compared to the control.

TABLES AND FIGURES

Table 1

Groups ^a	Kato-Katz (epg) ^b	Worm recovery ^c	Number of hepatic granulomaus ^d		Size granulomaus (MT) ^e	Collágeno ^f (TM)
			(H&E)	(MT)		
CONTROL	72,0 ± 67,9	7,50 ± 6,36	1.350 ± 0,64	1.250 ± 0,21	99440 ± 39630	183,6 ± 8,83
SIM	40,0 ± 26,8	7,11 ± 4,54	0.933 ± 0,17	1.067 ± 0,25	112500 ± 41250	169,0 ± 12,30 ^g
BSIM	51,4 ± 35,1	10,17 ± 7,25	1.067 ± 0,19	1.400 ± 0,15	108900 ± 37060	158,0 ± 23,48 ^{g,h}
BIM	64,0 ± 13,9	5,00 ± 1,41	1.267 ± 0,06	1.233 ± 0,25	106900 ± 66670	189,7 ± 10,76

Figure 1.

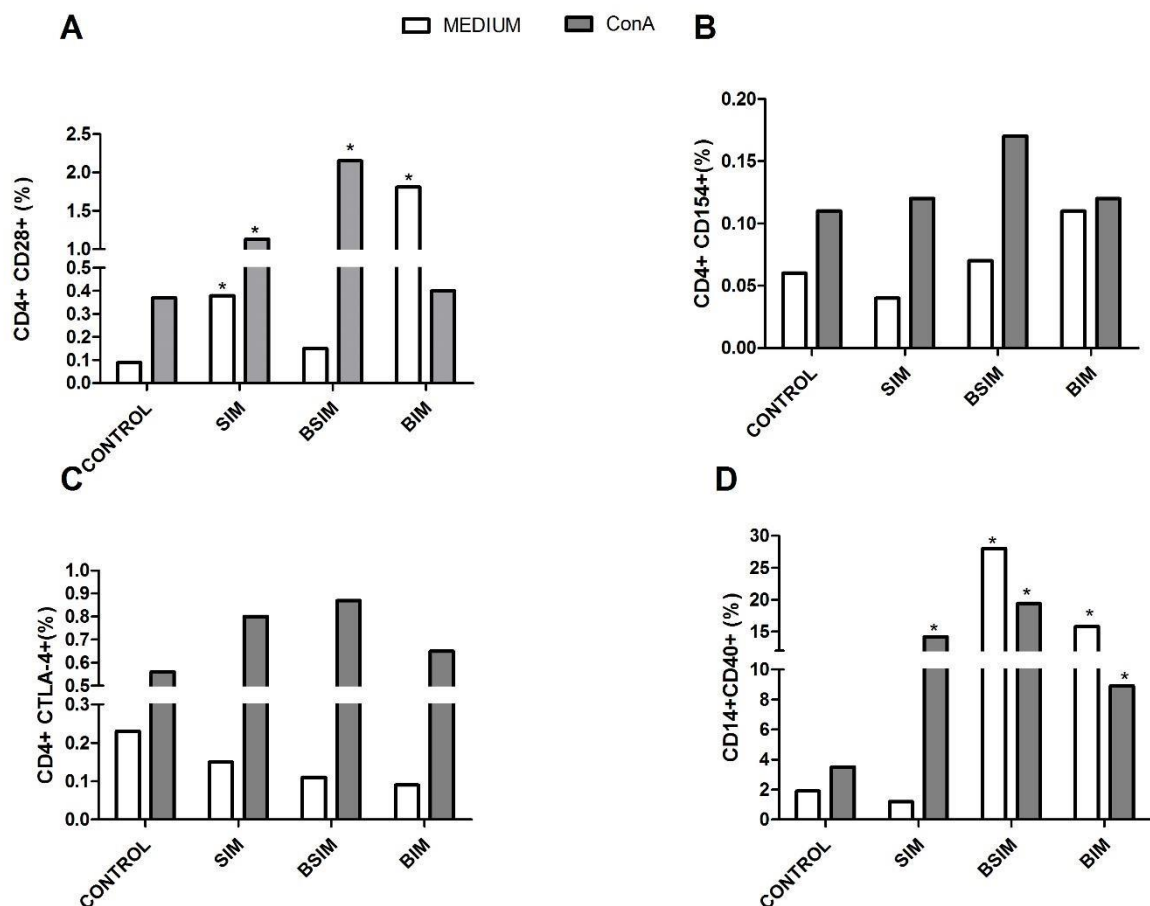


Figure 2

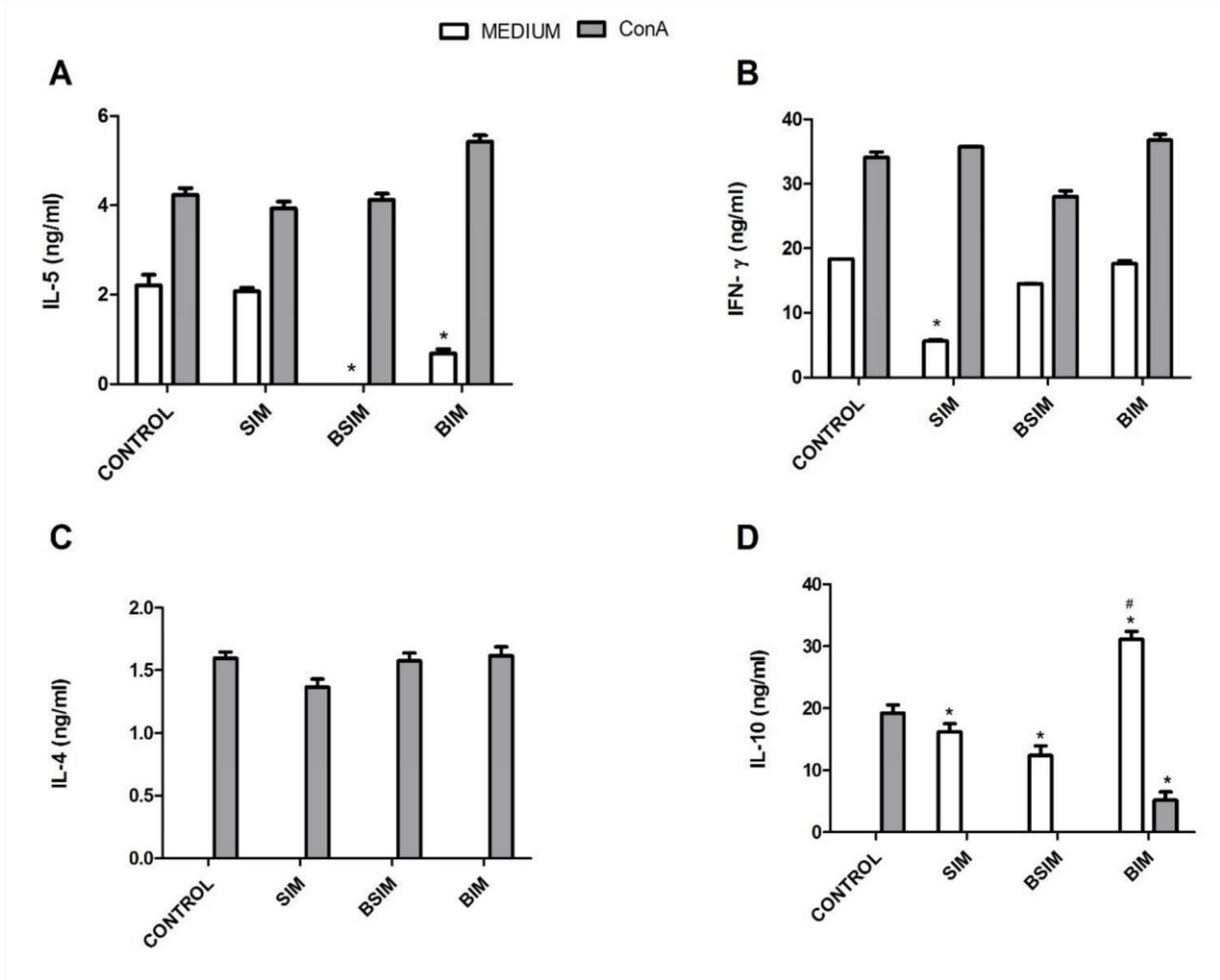
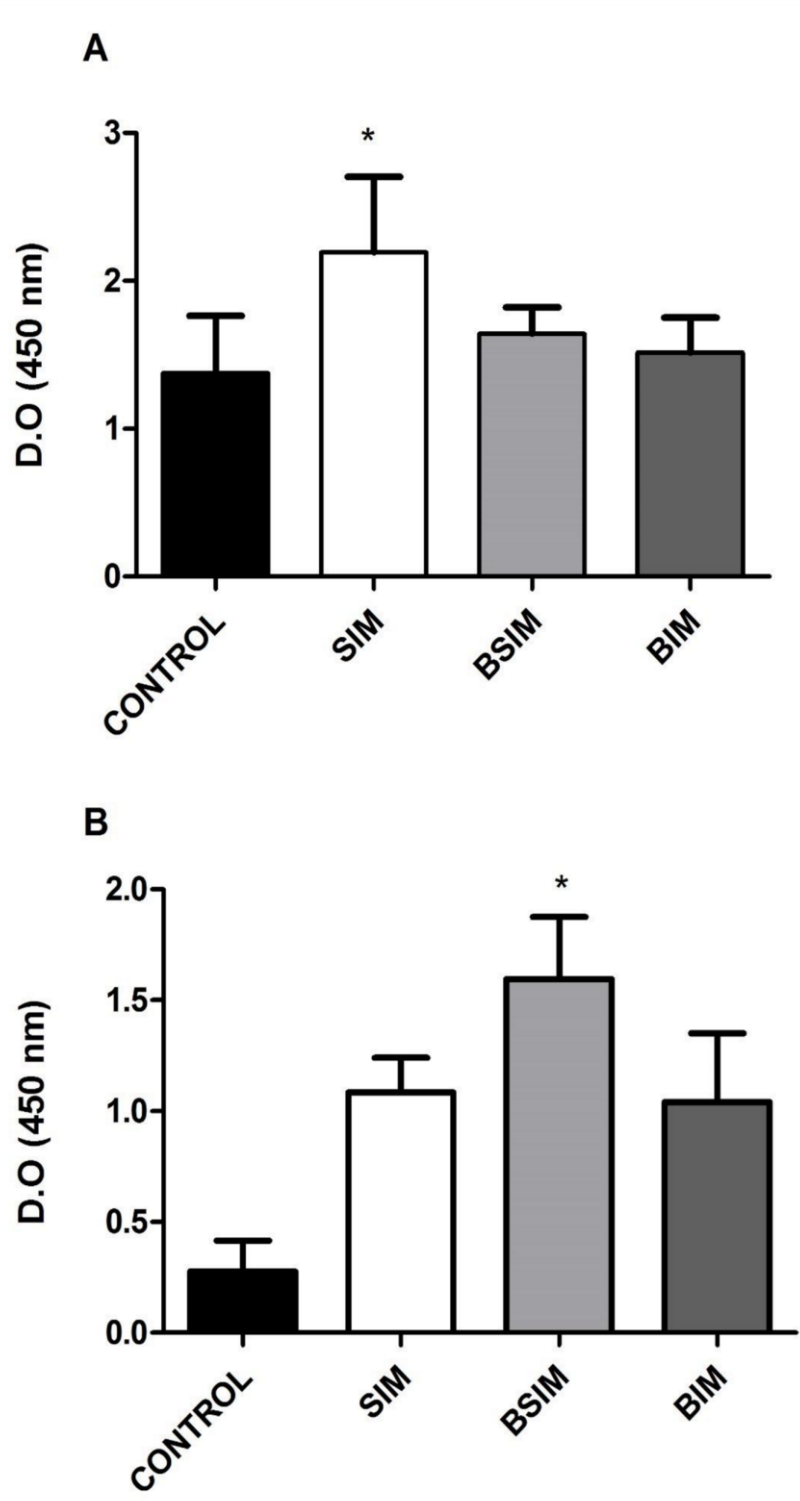


Figure 3



APÊNDICE B- VERSÃO ARTIGO 2 EM INGLÊS

Artigo submetido a Revista Brasileira de Medicina Tropical

ORIGINAL PAPER

MATERNAL SENSIBILIZATION WITH WORM ANTIGEN *SCHISTOSOMA* *MANSONI* (SWAP) AND INFLUENCE GESTATION AND BREASTFEEDING, IN RESPONSE OVALBUMIN, DESCENDANTS ADULTS

Maria da Conceição Silva¹; Virgínia Maria Barros Lorena²; Gabriela Calixto Ribeiro de Holanda¹; Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^{1,3}; André de Lima Aires^{1,3}; Vláudia Maria Assis Costa^{1,3}; Patrícia d'Emery Alves Santos¹ Valdênia Maria Oliveira de Souza^{1,4}

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

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

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

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

*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

ABSTRACT

INTRODUCTION: Descendants adult schistosome mothers had alterations of immunity to homologous and heterologous antigens due to pregnancy or breastfeeding these mothers. The pregnancy in offspring in postnatal infection concomitantly immunized with OA (ovalbumin) + adjuvant, demonstrated great number of granulomas and high deposition of collagen, while suckled decreased size. However, little is known about the effects of maternal sensitization with worm parasite antigens of *S. mansoni* (SWAP). We evaluate the, immunity to heterologous antigens in mice adult born/suckled by mothers sensitized with SWAP.

METHODS: Newborns were divided into: born (BIM), suckled (SIM) or born/suckled (BSIM) in sensitized and nonsensitized mothers (CONTROL). When adults, the descendants were infected (80 cercariae of *S. mansoni*) and was immunized with adjuvant + OA.

RESULTS: We evaluate the T cell activation status and macrophages, antibodies levels (IgG1 e IgG2a) anti-soluble worm antigen preparation and anti-ovalbumin and cytokine production. For the anti-OA immunity in BSIM group had a greater frequency of CD14⁺/CD40⁺ cells, decreased production of IL-5. Breastfeeding induced higher frequency of CD4⁺/CD28⁺ CD4⁺/CTLA-4⁺, CD14⁺/CD40⁺ increased levels of IFN- γ and in response to OA and increased production of anti-OA IgG1. Pregnancy induced basal frequency of CD14⁺/CD40⁺ and lower frequency in response to OA and Con-A, increased IL-4 levels in response to OA. In response to mitogen less CD4⁺ CD28⁺ cells, CD40 high-frequency cells CD154, and high IL-10 levels.

CONCLUSIONS: Thus, both pregnancy and breastfeeding divert the response towards Th2, but breastfeeding enhances activation status of lymphocytes and macrophages, together with better anti-OA antibody response.

Keywords: Gestation. Breastfeeding. Ovalbumin. SWAP

INTRODUCTION

Descendants of schistosomiasis mothers in endemic areas can become infected while having contact with unrelated to worm antigens (before vaccinations, heterologous infections, allergies). In this context, recently, Santos et al (2016) consisted that both pregnancy and breastfeeding in infected mothers, led to the loss of Th1 and Th2 anti-ovalbumin (OA) in

infected postnatal descendants, but did not assess the effects maternal sensitization to parasite antigens of *Schistosoma mansoni*.

There are many studies using parasitic antigens of *Schistosoma*, in order to demonstrate its potential as immunomodulatory tool for preventing the development of Type 1 diabetes through the Treg induction, as well as type 2 diabetes, and reduce the risk of cardiovascular disease (2, 3). In this context, the use of soluble worm antigen (SWAP) come to prominence. In infected mice or treated with this antigen and challenged ovalbumin (OA), there was suppression of anti-OA allergic response, with lower levels of Th2 cytokines, increased cell inducing CD4 + CD25 + and IL-10 and negative modulation of the Th1 and Th2 (4-6)

Here, this study aimed to assess the T lymphocyte activation status and antigen presentation capacity of macrophages, cytokine levels and specific antigens immunoglobulins, in descending previously born or suckled on sensitized mothers with SWAP compared to offspring non-sensitized mothers undergoing postnatal infection and immunization with OA.

MATERIALS AND METHODS

Maternal sensitization with SWAP

Four-week-old *Swiss webster* female mice were sensitized subcutaneously with 100µg/SWAP (7, 8 modified) on alum (Aziram, Chemical Union). The females were caged with 1 male for 2 females each (1:2) and successful mating was checked by presence of a vaginal plug. The same procedure were performed in non-sensitized females. The mice were housed in the animal care facility at the Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the FIOCRUZ-PE Commission (CEUA-70/2014).

Infection/immunization protocol and study groups

After the birth, the newborns of the sensitized mothers or non-sensitized were housed in cages with interchanged mothers. After adoptive breastfeeding, offspring BIM were suckled by non-sensitized mothers and offspring SIM were suckled by sensitized mothers. Another group of animals was born and suckled by sensitized mothers. Animals born from non-sensitized mothers 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) and 60 dpi, immunized s.c with 100µg of OA (grade V; Sigma-Aldrich, USA) and emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) (Sigma Aldrich) at the base of the tail (0,1 mL/animal).

Cell culture

The spleens of the each animal was harvested after euthanasia by cervical deslocation. Cell suspensions were prepared in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with HEPES (10mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM), 216mg Lglutamine, gentamycin (50mg/mL) and 5% of Foetal Bovine Serum - PBS (SigmaAldrich). The spleens cells from each group (n=) were cultivated at a final concentration of 5×10^6 cells/mL in 8 mL tubes and subsequently stimulated with concavalin-A (Con-A) (5µg/mL) at 37 ° C in 5% CO₂. Supernatants were harvested after 24h and assayed for cytokine content. Cells cultured were collected and double labelling with fluorochrome-labelled antibody.

Cytokine assay

The cytokines were measured using specific two-site sandwich ELISA, using the following monoclonal antibodies: for IL-4, 11B11 and biotinylated BVD6-24G2; for IFN-γ, AN18 and biotinylated XCM1.2; for IL-5, 39D10 and biotinylated 5A10 and for IL-10, C252-2A5e SXC-1biotinilado. Binding of biotinylated antibodies was detected using a streptoavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich) and an ABTS (2-2-azinobis (3ethylbenzene-thiazoline-6-sulfonic acid), Sigma) solution in 0.1M citrate buffer plus H₂O₂. The plates were read (405nm) in an automated ELISA reader. The samples were quantified by comparison with the standard curves of purified recombinant cytokines (rIL-4, rIL-5, rIFN-γ and rIL- 10), with resulting detection limits of 0.3125 ng/ml for IL-4, IFN-γ and IL-10, 0.1562 ng /ml for IL-5

Immunophenotyping of cells

The spleen cells of male offspring of all groups were submitted for doublelabelling with fluorochrome-labeled antibody solutions at a concentration 0,1mg /10⁶ cells: FITC anti-mouse CD4 plus PE anti-mouse CD28 or CD154 or CTLA-4, as well as FITC anti-mouse CD14 plus PE anti-mouse CD40 (BD Biosciences Pharmingen). Data acquisition was performed using a flow cytometry FACSCalibur (BD Pharmingen, USA) CPqAM/FIOCRUZ by collecting a minimum of 10,000 events per sample for lymphocytes and 1,000 events per sample for

macrophages. For the results of flow cytometry, it was considered a statistically significant difference 2 times higher in phenotypes found among the groups.

Statistical analysis

For antibody production the Kruskal-Wallis test. The multiple comparisons were performed by Mann-Whitney test. For the results of cytokine analysis, an one way analysis of variance followed by Tukey's method were used. For statistical analysis, we used the Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA) and all findings were considered significant at $p < 0.05$. For the results of flow cytometry was considered significant difference frequency greater than 2 times for phenotype analysis. Results show one representative experiment of three independents repetitions.

RESULTS

Breastfeeding in mothers sensitized with SWAP improves T lymphocyte activation status, in response to ovalbumin in infected adult offspring.

Compared to the control, the group had only prior contact with the sensitized mothers milk led to a higher baseline frequency of CD4 + CD28 + cells (Fig 1A). (CONTROL = 0.05%; SIM = 0.10%; BSIM= 0.05%; BIM= 0.04%), and after *in vitro* restimulation with OA (CONTROL = 0.06%; SIM = 0.52%; BSIM = 0.03%; BIM = 0.04%). When there stimulation with the mitogen, was observed a decrease in the frequency of CD4 + CD28 + cells only in the offspring born in sensitized mothers compared to control (CONTROL = 0.21%; SIM = 0.15%; BSIM= 0.16 %; BIM = 0.05%).

Regarding the frequency of CD4+ /CD154 + (Fig. 1B), the basal rate was lower in offspring that were born and suckled in sensitized mothers in the control group (CONTROL = 0.04%; SIM = 0.04%; BSIM = 0.01%; BIM= 0.03%). Faced with the restimulation *in vitro* with OA, the descendants breastfed in sensitized mothers showed higher frequency compared to the control (CONTROL = 0.04%; SIM = 0.08%; BSIM = 0.05%; BIM= 0.04%) . In response to mitogen, there was a higher frequency of CD4+ CD154+ cells in only offspring born in sensitized mothers in the control and other experimental groups (CONTROL = 0.06%; SIM = 0.06%; BSIM = 0.07%; BIM = 0.12%).

The baseline frequency of CD4⁺ expressing CTLA-4 (Fig. 1C) was lower in the offspring who had contact with the milk, SIM and BSIM, compared to control. (CONTROL = 0.21%; SIM = 0.07%; BSIM = 0.10%; BIM= 0.21%). Front restimulation with OA, SIM offspring showed higher frequency compared to the control (CONTROL = 0.05%; SIM = 0.16%; BSIM = 0.07%; BIM= 0.05%) and front the mitogen (CONTROL = 0.18%; SIM= 0.32%; BSIM= 0.12%; BIM= 0.18%).

Gestation and breastfeeding mothers sensitized with SWAP alters the expression of co-stimulatory CD40 molecule in macrophages in infected adult offspring.

Regarding the frequency of cells expressing CD14⁺/CD40⁺(Fig 2), the descendants generated sensitized mothers had high baseline frequency, compared to CONTROL and the other experimental groups (CONTROL= 3.8%; SIM = 2.1 %; BSIM= 11.2%; BIM = 23.0%). After restimulation *in vitro* with OA in SIM and BSIM descendants, there was a higher frequency of these cells compared with the control (CONTROL = 2.4%; SIM= 5.9%; BSIM = 5.5%; BIM = 4, 4%) as well, when the cells of these groups were cultured with mitogen, with greater increase in BSIM group (CONTROL = 3.5%; SIM = 6.6%; BSIM= 19.1%; BIM = 3.8 %).

Cytokine production in infected offspring mice immunized with OA, suckled and / or born in sensitized mothers SWAP

Basal synthesis of IL-5, as well as in response to OA was lower only in BSIM group when compared to CONTROL (Fig. 3A). In response to mitogen, there was no difference between the control and experimental groups. With regard to the basal IFN- γ synthesis, and *in vitro* reestimulation OA it was observed that only the breastfed mothers in sensitized SWAP obtained a lower basal production in the other groups (Fig. 3B). In response to mitogen, there was no difference between the experimental groups and the control.

In relation to basal synthesis of IL-4, there was detectable production in SIM and BIM groups. Similarly, when cells were stimulated with OA, there was a greater production in SIM and BIM groups, with highest levels in the latter. The IL-4 could be measured in all experimental groups when stimulated with the mitogen, and there was no statistical difference between them (Fig. 3C)

For the IL-10 (Fig. 3D), was measured in the CONTROL group at baseline and cultivation under the antigenic or mitogenic stimuli, whereas in the BIM group just under mitogenic stimulus and lower level. Under these experimental conditions there was no production of these cytokines in SIM and BSIM group.

Previous contact with the breast milk of mothers sensitized increased the production of specific antibodies to OA.

The production of anti-OA IgG1 (Fig. 4A) only in the mice suckled or born in sensitized mothers was significantly higher compared to offspring of mothers do non- sensitized (CONTROL). On the other hand, the BIM and BSIM groups to this antibody levels were similar to the control group.

With the production of anti-OA IgG2a antibodies (Fig 4B), there was no statistical difference between the groups SIM, BSIM, BIM and CONTROL, although it is possible to observe higher levels in the offspring only breastfeeding sensitized mothers (SIM).

DISCUSSION

Here, we investigated the influence of sensitized mothers with worm antigens (SWAP) in their infected and immunized with unrelated to worm antigen descendants. It might be observed that in animals born and suckled the production of anti-OA antibody is maintained with the potential of cell activation, accompanied by an improvement in the expression of CD40 on macrophages but with impaired production of IL-5. However, these results differ when evaluated separately, breastfeeding of pregnancy in mothers who received SWAP.

Gestation in sensitized mothers, led to a higher baseline rate of cells expressing CD14+/CD40+ in infected descendants and immunized with OA later in life. However, this status is not maintained under mitogenic and antigenic stimulation *in vitro*. Confirming this data in an experimental model of maternal infection with *S. mansoni*, these mothers pregnancy resulted in a high frequency of B cells expressing CD40, however this increase was followed by a drastic decrease, suggesting that the initial activation status of B cells it was not maintained (9). In cells cultured with mitogen, lymphocytes despite having increased expression of CD40 ligand (CD1540), there was a drastic reduction in CD28 molecule with IL-10 production.

Together, these findings corroborate the suppressive potential via IL-10, observed the worm antigens (4) and pregnancy in mothers infected with *S. mansoni* (10, 1).

Nevertheless, for the specific antigen response, an increase in IL-4 synthesis in the presence of IFN- γ and no IL-10, suggesting a mixed profile Th1/Th2 anti-OA without altering the production of antibodies. Although the antigens of the worms are associated with Th1 early in infection (11), the host cercárianos in contact with irradiated antigen showed a profile mixed Th1/Th2 balance in a subsequent infection (12). In respect to the maintenance of levels of anti-OA antibodies BIM group was also observed in infected descendants and immunized with OA (1). It is worth mentioning that in offspring without postnatal infection showed suppression of anti-OA response in animals BIM (10). Then, these data suggest a reversal of suppression in production of anti-OA antibodies by postnatal infection in the offspring generated, whether sensitized or infected mothers SWAP. Thus, says the participation of previous contact with the SWAP this phenomenon.

With respect to the effect of breast milk from mothers sensitized with SWAP, there was an improvement in cellular activation status, more lymphocytes and macrophages express costimulatory molecules and co-effector and increase in production of anti-OA antibodies. This stimulatory effect of breast milk on APCs was also observed *in vivo* or *in vitro* studies, with the milk schistosomic mothers who improved the expression of CD40 and CD80 on B lymphocytes (9, 13). In addition, this study showed that maternal sensitization SWAP via the milk together with the infection in descending enhanced T lymphocyte activation marker, the CD28 molecule. However, we are aware of the presence of CTLA-4 molecule in this scenario and its negative role in activation (14). The presence of this molecule in pro-activation conditions (antigen and mitogen) reflects the dichotomous function of human milk (15, 13) and its potential in control exacerbation of immune response.

Contact with milk mothers sensitization with SWAP seems to be required to improve the production of anti-OA antibodies in post-infected offspring as adults. The predicted breastfeeding mothers led to these improved IL-4 production, with decreased IFN- γ in the absence of IL-10. It is worth noting the findings on the effect of schistosomic mothers milk, which has not been demonstrated detection of IL-4 levels and no increase in the production of anti-OA antibodies in post-infected offspring and decreased IFN- γ in absence of IL-10 (1). These data indicate the application of maternal sensitization with SWAP, via breastfeeding, to bypass immune response Th2 / IL-4 and potentiation of the antibody response.

The breast milk of mothers schistosomotic showed immunomodulatory peptide nature, such as interleukin IL-17F or glutathione-S-transferase (GST) (13). Curwen et al (2004) identified GST (26kDa) from the soluble proteins derived from preparation of cercariae, schistosomules, adult worms and eggs. However, if the milk sensitized mothers with SWAP has immunomodulatory molecules, still needs to be clarified. With respect to antibodies, sensibilized mothers with SWAP had higher levels of antiSWAP IgG1 than IgG2a for this antigen (Appendix D) and we have demonstrated that there is no passage of IgG2a anti-SWAP maternal isotype, either via milk or placenta, for descendants (17) the immunomodulatory action of isotype IgG1 has been demonstrated (18, 19) and needs to be further investigated the phenomenon of immunomodulation exerted by breast milk.

In summary, our findings show that mothers coated with SWAP in conjunction with postnatal infection enhance the immune response to antigens unrelated to the parasite and emphasize the role of the mother's milk of the mothers in the stimulation of immunity that is maintained long term in adulthood. In the context of the use of parasite antigens and immunomodulatory tools, this study brought to light the possible association between the use of parasitic components during breastfeeding, in order to get a better immunity against bacterial, viral and autoimmune diseases throughout their life.

REFERENCES

1. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES ES, 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* 2016;110.
2. ZACCONE P, FCHERVAN Z, JONES FM, SIDOBRE S. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 1439–1449.
3. EBERLE C, MERKI E, YAMASHITA T, et al. Maternal immunization affects in utero programming of insulin resistance and type 2 diabetes. *PLoS one* 2012;7: 1-12, e4536.

4. AMU S, SAUNDERS SP, KRONENBERG M, MANGAN NE, ATZLAGER A, FALLON PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 1114-1124.

5. NASSEF NE, EL-KERSH WM, EL-NAHAS NS, EL-DIN SAS, ELDEEN SAS. *Schistosoma mansoni* infection or soluble egg antigen immunization can reduce allergic airway diseases. *Menoutia Medical Journal* 2015; 642-649.

6. PACÍFICO LGG, MARINHO FAV, FONSECA CT, et al. *Schistosoma mansoni* Antigens Modulate Experimental Allergic Asthma in a Murine Model: a Major Role for CD⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T Cells Independent of Interleukin-10. *Infect. immune* 2009; 77: 98–107.

7. ETEWA, S, EABD EL-AAL1 NF, ABDEL-RAHMAN SA, EL-SHAFFEY MA. et al. Parasitological evaluation of potential candidate vaccines in *Schistosoma mansoni* infected mice 2014; 6: 23-30.

8. CARDOSO LS, OLIVEIRA SC, GOES AM, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *Clinical exp. immunol.* 2010; 160: 266-274.

9. SANTOS PA, LORENA VMB, FERNANDES E, et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression. In antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Exp. Parasitol* 2014; 141: 62-67.

10. SANTOS, P.A, SALES IRF, SCHIRATO GV, et al. Influence of maternal schistosomiasis on the immunity of adult offspring mice. *Parasitol Res.* 2010; 107: 95102.

11. KULLBERG MC, PEARCE EJ, HIENY SE, SHER A, BERZOSKY JA. et al. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. *J. Immunol*; 1992; **148**: 3264-3270.

12. HEWITSON JP, HAMBLIN PA, MOUNTFORD P. Immunity induced by the radiation attenuated schistosome vaccine. *Parasite Immunol.* 2005; 7: 271-280.

13. SALES, IANA RAFAELA FERNANDES. Avaliação *in vitro* do efeito imunomodulador do leite materno de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. 150 folhas: Il., fig, 30cm. Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza. TESE (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2015.
14. SHIPKOVA M, WIELAND E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. Clin. chim. acta. 2012; 413: 1338–1349.
15. FIELD, C.J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. J.Nutr. 2005: 1-4.
16. CURWEN RS, ASHTON PD, JOHNSTON DA, WILSON A. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages. Mol. biochem. parasitol. 2004; 138: 57-66.
17. NÓBREGA CGO, FERNANDES ES, NASCIMENTO WRC, et al. Transferência passiva de anticorpos específicos para antígenos de *Schistosoma mansoni* em camundongos nascidos ou amamentados em mães esquistossomóticas. J Health Sci Inst 2012; 30: 17-21.
18. COLLEY DG, MONTESANO MA, FREEMAN GL. Infection-stimulated or perinatally initiated idiotypic interactions can direct differential morbidity and mortality in schistosomiasis. Microbes infect. 1999; 1: 517-524.
19. FAIRFAX KC, AMIEL E, KING IL, FREITAS TC, MOHRS M. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. Plos Pathog 2012; 8: 1-13.

TITLES OF FIGURES

Fig 1. Frequency of splenic cells CD4+CD28+(A), CD4+CD154+(B) and CD4+CTLA4+ (C) in adult mice born e suckled by non-sensitized mothers with SWAP (CONTROL), suckled by sensitized mothers (SIM), born and suckled by sensitized mothers (BSIM) e born sensitized mothers (BIM) when infected with 80 cercariae of *S. mansoni* and immunized with OA. (100µg/mL/animal) 5×10^6 cells cultured with RPMI, OA (500mg/mL) Con-A (5µg/mL), and were labelled with FITC anti-CD4, and PE anti-CD28 or PE anti-CD154 or PE anti-CTLA-4, and FITC anti-CD14 and PE antiCD40. Considered significant, frequency difference greater than 2 times to the phenotype. *p<0,005 when compared CONTROL group.

Fig 2- Frequency of splenic cells CD14+CD40 in adult mice born e suckled by nonsensitized mothers with SWAP (CONTROL), suckled by sensitized mothers (SIM), born and suckled by sensitized mothers (BSIM) e born sensitized mothers (BIM) when infected with 80 cercariae of *S. mansoni* and immunized with OA. (100µg/mL/animal) 5×10^6 cells cultured with RPMI, OA (500mg/mL) Con-A (5µg/mL), and were labelled with FITC anti-CD14 and PE anti-CD40. Considered significant, frequency difference greater than 2 times to the phenotype. *p<0,005 when compared CONTROL group.

Fig 3- Levels of interleukin (IL)-5 (A), interferon (IFN) - γ (B), interleukin (IL)-4(C) and interleukin (IL)-10 (D) secreted by spleen cells. *Swiss webster* born e suckled by non-sensitized mothers with SWAP (CONTROL), suckled by sensitized mothers (SIM), born and suckled by sensitized mothers (BSIM) e born sensitized mothers (BIM) when infected with 80 cercariae of *S. mansoni* and immunized with OA. (100µg/mL/animal). 5×10^6 cells were stimulated with OA (500mg/mL) and Con-A (5µg/mL), for 24 hrs. Cytokines were quantified by sandwich ELISA. The results represent the mean $\pm$ standard deviation *p<0,005 were compared CONTROL.

Fig 4- OA-specific IgG1(A) and IgG2a (B) antibodies titers in mice sera *Swiss webster* born and suckled in non-sensitized mothers (CONTROL) only suckled in sensitized mothers (SIM), born and suckled in sensitized mothers (BSIM) and born in sensitized mothers (BIM) submitted to infection with 80 cercariae of *S. mansoni* and immunized with OA. Isotype levels

were measured by sandwich ELISA, in the dilutions 1:512 (IgG1) and 1:8 (IgG2a). Results are expressed median O.D. 3 to 5 animals/group. * $P < 0.005$ compared to the control.

Figure 1

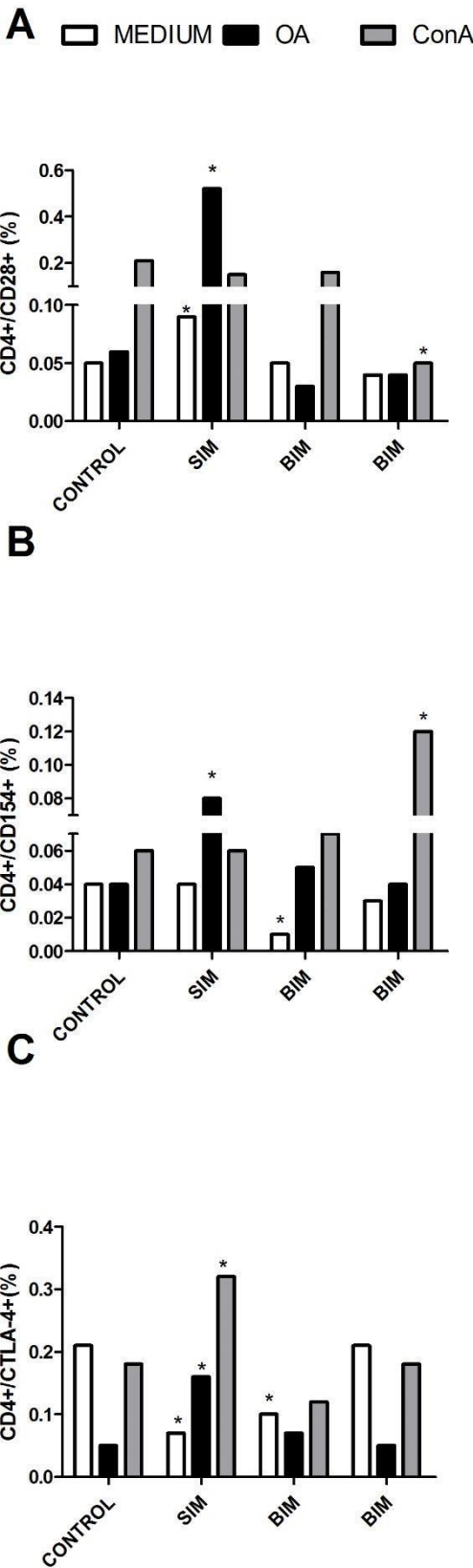


Figure 2

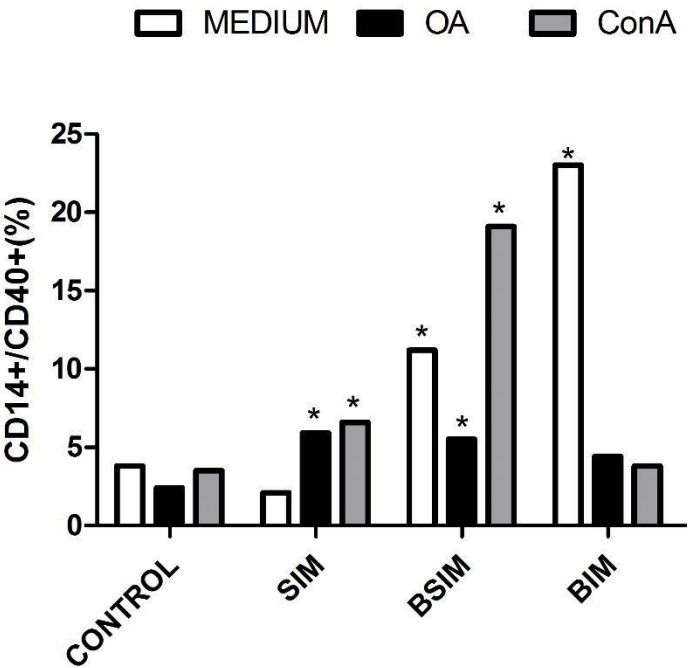


Figure 3

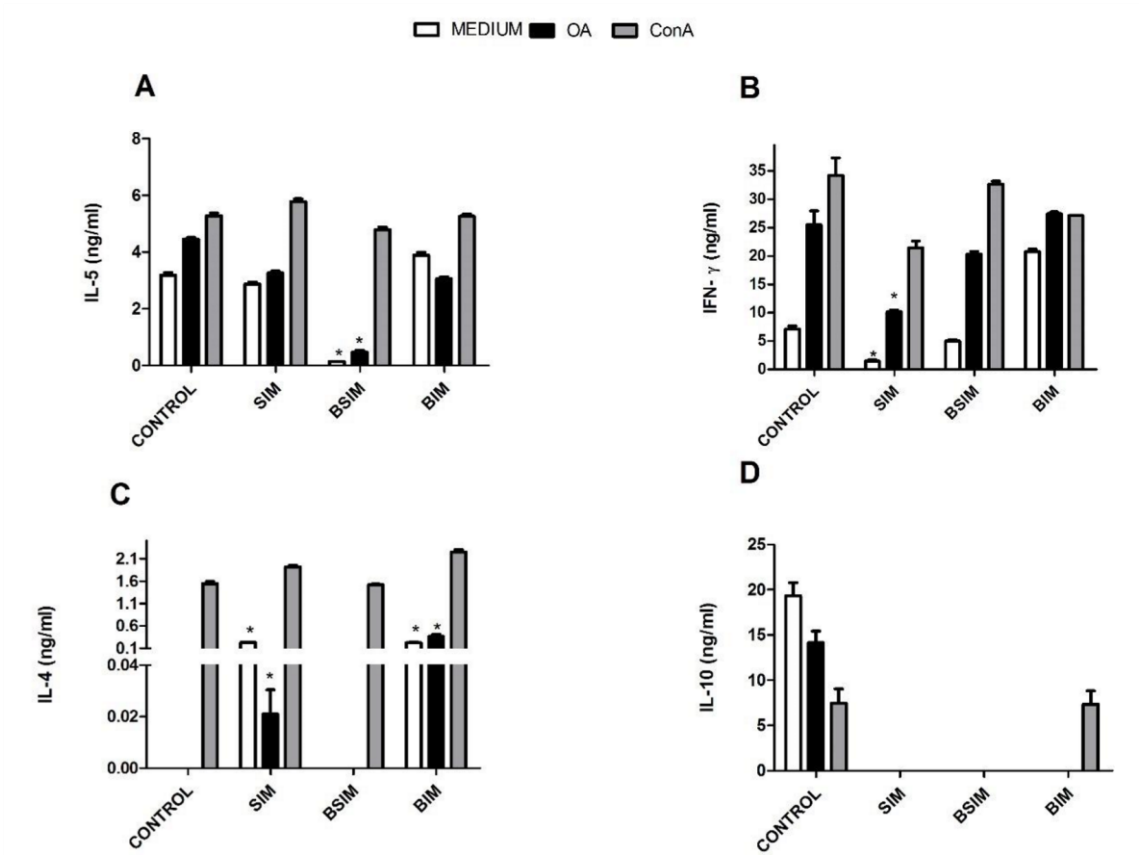
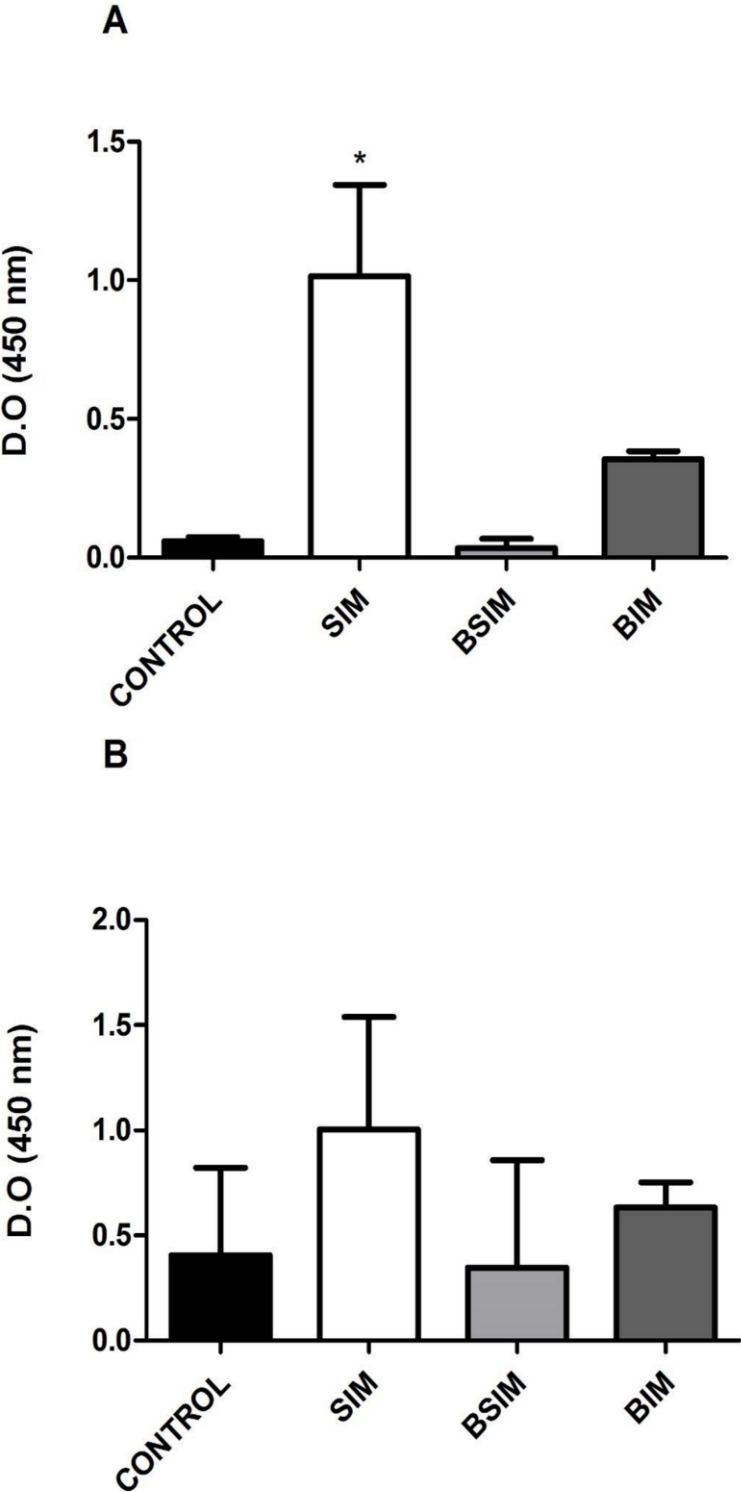


Figure 4



APÊNDICE C- Análise Histomorfométrica do granuloma hepático, carga parasitária e recuperação de vermes.

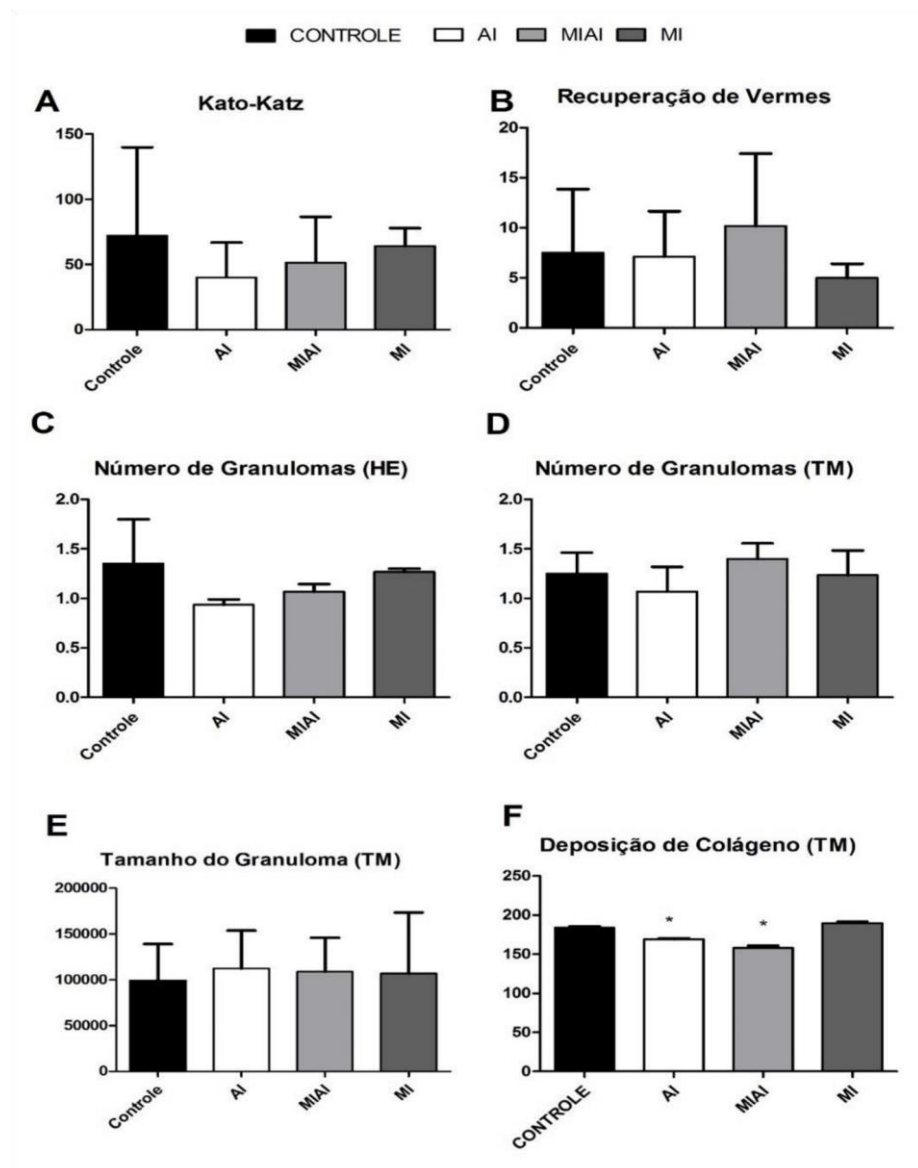


Figura 1. Camundongos Swiss webster infectados com 80 cercárias, AI, MIAI e MI de mães sensibilizadas com SWAP, 60dias pós infecção tiveram seus fígados submetidos a um estudo morfométrico. Camundongos nascidos e amamentados em mães não sensibilizadas (CONTROLE), foram também analisados dentro das mesmas condições [corados com Hematoxilina e eosina (HE) e Tricomico de Masson (TM)]; b: mediana ± erro padrão (EP) do número de ovos por grama de fezes (opg), análises realizadas com 50dias pós-infecção; c: mediana ± erro padrão (EP) da carga parasitária, análises realizadas 60 dias pós-infecção; d: mediana ± erro padrão (EP) do número de granulomas por campo; e: mediana ± erro padrão (EP) do tamanho (área seccional) dos granulomas em 2 µm. Análises de 10 granulomas por animal (n=5) totalizando 50 granulomas/grupo; f: mediana ± erro padrão (EP) da proporção de colágeno obtida do ImageJ® software; □ p < 0.05 comparado com o grupo CONTROLE. # p < 0.05 comparado com o grupo AI

APÊNDICE D- Títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP em mães sensibilizadas antes e durante a gestação.

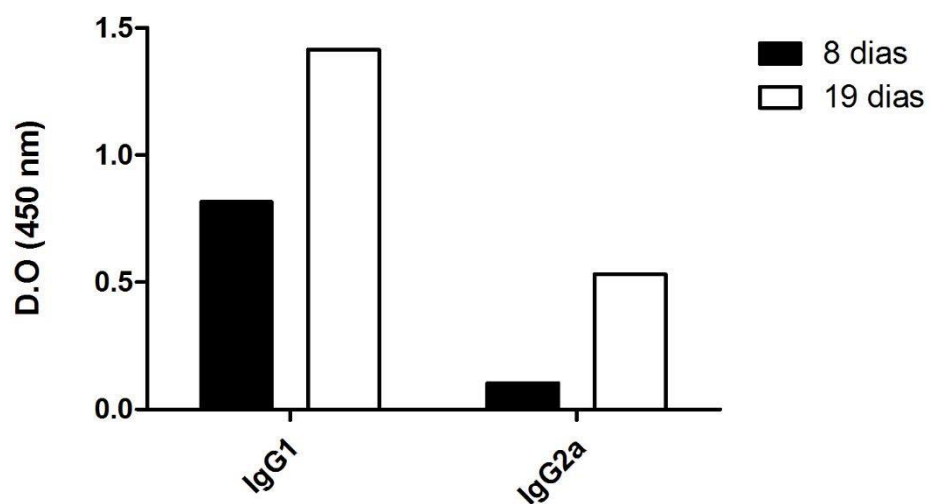


Figura 1- . Níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-SWAP nos plasmas de camundongos fêmeas (mães) sensibilizadas com SWAP, após sensibilização (8 dias e 19 dias). Os anticorpos foram dosados por ELISA. Os resultados representam a mediana da D.O. de 15 animais $\pm$ erro padrão.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A



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

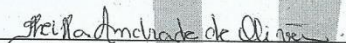
Projeto nº 70/2014

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


Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais – CEUA
Mat. SIAPE 1554975
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
CPqAM/Fiocruz

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



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **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**, protocolado sob nº 70/2014 pelo (a) pesquisador (a) Virginia Maria Barros de Lorena. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 27/04/2015. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2016.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongos Mus músculos Swiss webster macho	75
Camundongos Mus músculos Swiss webster fêmea	150
Total	225

We certify that project entitled **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**. Protocol nº 70/2014, coordinated by Virginia Maria Barros de Lorena. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on April, 27, 2015. In present version this project is licensed and valid until February, 2016.

Recife (PE, Brazil) April, 27, 2015.

Sheilla Andrade de Oliveira

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora CEUA/CPqAM

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
Coordenadora da Comissão de Ética
no Uso de Animais - CEUA
Mat. SIAPE 1554975
e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
CPqAM/Fiocruz

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

ANEXO B- NORMAS DE SUBMISSÃO À REVISTA PARASITE IMMUNOLOGY.

Edited By: Eleanor M. Riley and Richard K. Grencis

Impact Factor: 2.143 ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 14/36

(Parasitology); 102/148 (Immunology) Online ISSN: 1365-3024

Manuscript Submission

All papers must be submitted via [ScholarOne Manuscripts](#). Authors may wish to consult an appropriate member of the [Editorial Board](#) prior to submission of material. On submission you will need: (1) the type of your paper (original paper, brief definitive report, Review) (2) the full title of your paper (limited to 120 characters), (3) the abstract (limited to 200 words), (4) up to six keywords, (5) the full names and affiliations of all authors, (6) details of preferred and/or non-preferred reviewers (optional), (7) a cover letter, (8) a manuscript keyword, (9) to answer questions regarding human tissues and animal experimentation, (10) to complete and upload a Conflict of Interest form for each author, (11) to adhere to the ARRIVE guidelines, and (12) to upload the appropriate files and forms.

Submissions should be prepared using double-line spacing, a minimum of 1 inch margins, and 12 point Times New Roman font. The preferred file type formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .docx, .rtf, .ppt, .xls; please do not save them as portable document files (PDF) files. Ideally, illustrations should be uploaded in native format of PICT if created on a Mac, or in native format or WMF if created in Windows. Files saved as PS, EPS, GIF and TIF may also be used. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. Detailed information on our digital illustration standards is available on-line at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Each submission should include a title page which should contain: the paper title, full names and affiliations of all authors, and should indicate an author for use for correspondence (including an email address). For each author, disclose potential conflicts of interest, including

all relevant financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding) in any company or institution that might benefit from the publication (or state 'none'). Authors do not need to report the sums concerned. Please can you therefore add a small paragraph entitled "Disclosures" and then include any relevant details or "none" if there is nothing to disclose, if you have not already done so. For indexing purposes a short number of 'key words' should be included.

If you are not a native English-language speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission. A list of companies that will edit your manuscript for a fee can be found [here](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp)http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. Professional editing is not compulsory, but will mean that reviewers are better able to read and assess your manuscript. Use of one of these companies does not guarantee acceptance or preference for publication in this journal.

Manuscript Types and Style

Original Papers

The text should be preceded by a short abstract not exceeding 200 words. The abstract of a paper in *Parasite Immunology* is the face of the paper turned to the world. It is not a précis of the paper, but is a

clear, direct account of what was done, why it was done, and why the outcome matters. This is not the place for details or data, or for speculation. Avoid abbreviations, write sparingly, but simply and clearly as to a general audience, and give the highlights only. You can make some simple changes to your title and abstract to improve your article's ranking in search engines: guidelines on this can be found [here](#). Please review your article's title and abstract in the light of these suggestions to improve your paper prior to submission and maximise its potential readership.

The abstract should be followed by these sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to Tables and Figures, Tables and Figures. Pages should be numbered consecutively in arabic numerals. Please also ensure that the lines in your manuscript are numbered. Acknowledgements should include an

indication of the source of funding for the work and the contribution of individual authors (see “Authorship” below).

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

1) Rogerson SJ, Novakovic S, Cooke BM, Brown GV. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes adhere to the proteoglycan thrombomodulin in static and flow-base systems. *Exp Parasitol* 1997; 86 8-18. 2) Parks DR, Lanier LL, Herzenberg LA. In *Handbook of Experimental Immunology*, ed. Weir DM, Oxford:

Blackwell Science Ltd; 1986; 29

Authors are responsible for the accuracy of their references.

Spelling should conform to *The Concise Oxford Dictionary of Current English* and units of measurement, symbols and abbreviations with those in *Units, Symbols and Abbreviations* (1977) published and supplied by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE. This specifies the use of SI units. Tables and figures should be referred to in the text together with an indication of their approximate position. Colour illustrations are encouraged; there is no charge to the author for the inclusion of colour illustrations.

Brief Definitive Reports

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

Review Articles

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

Letters to the Editor

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

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

All authors must fulfil the following three criteria:

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

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

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

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

Supporting Information

Online Supporting Information can include additional explanatory notes, data sets, videos, lists, figures or tables that will not be published in the print edition of the journal and which are ancillary to, rather than central to, the article. Supporting Information must be approved by the Editors and should be supplied as a single PDF file headed by the title of the paper and the authors' names, addresses and contact information. Supporting Information will be published exactly as supplied and it is the author's responsibility to ensure that the material

is logically laid out, adequately described, and in a format accessible to readers. Animations and other moving images or sound files in standard formats must be supplied as separate files. Figures and tables in Supporting Information should be referred to in the main text and labelled Fig. S1, Fig. S2 or Table S1, etc., in the order cited. Full guidelines and information on acceptable file formats may be found

<http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

Display of Sequences

Prepare sequences as figures, not tables. This will ensure that proper alignment is preserved. **Submission of Sequences to GenBank** Original DNA sequences reported in *Parasite Immunology* must also be submitted to GenBank. Instructions for submission can be found at the following address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>.

An accession number should be supplied parenthetically at a relevant location in the text.

Human and Murine Genes

For human genes, use genetic notation and symbols approved by the HUGO Nomenclature Committee. Approved gene symbols should be obtained prior to submission from the HUGO Nomenclature Committee, nome@galton.ucl.ac.uk. For nomenclature guidelines, see White et al., 'Guidelines for Human Gene Nomenclature' [Genomics, 45, 468-471 (1997)]. The Gene Name Proposal form may be completed on the Nomenclature Web page: <http://www.genenames.org>. Use ISCN nomenclature for cytogenetics notation [Mitelman, F. (ed.) ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S.

Karger, Basel]. Human gene names and loci should be written in uppercase italics and Arabic numerals. Protein products are not italicized. For mouse strain and genetic nomenclature, refer to the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice: <http://www.informatics.jax.org/nomen/>. New symbols and names for genes should be obtained prior to submission through the online symbol registry form at: http://www.informatics.jax.org/nomen/nomen_submit_form.shtml.

Microarray Databases

Parasite Immunology supports the efforts of the Microarray Gene Expression Data Society to standardize the presentation of microarray data, and we recommend that authors follow their guidelines and checklist

(http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame_checklist.html). In addition, the journal strongly recommends the supplemental microarray data be deposited in a public database such as Gene Expression Omnibus (or GEO, at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) or Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or submitted for peer-review with the initial submission of the manuscript.

Ethical Policy and Guidelines *Parasite Immunology* encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the [International Committee of Medical Journal Editors](#). The Editors reserve the right to reject a paper that does not meet these standards.

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

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed [consent/release form](#) in all instances. – If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians. – If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased. – If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published. [Please click here to read the Ethical Policies of *Parasite Immunology*](#). For more detailed ethical guidelines please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/publicationethics.asp>

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

Animal Experimentation

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

ARRIVE Guidelines

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

Clinical Trials Registry

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

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

Distribution of Reagents

The Editors of *Parasite Immunology* have adopted the policy that any readily renewable resources mentioned in a journal article not already obtainable from commercial sources shall be made available to all qualified investigators in the field. The policy stems from the long-standing scientific principle that authenticity requires reproducibility.

Publication in *Parasite Immunology* constitutes a *de facto* acceptance of this policy. Included are reagents that can be easily provided; specifically, nucleic acid sequences, cDNA and genomic clones, cell lines, and monoclonal antibody clones. Small amounts (sufficient for the replication of any in vitro work reported) of novel protein reagents are also considered easily transferable. Although the Editors appreciate that many of the reagents mentioned in *Parasite Immunology* are proprietary or unique, neither condition is considered adequate grounds for deviation from this policy. Suitable material transfer agreements can be drawn up between the provider and requester, but if a reasonable request is turned down and submitted to the Editor-in-Chief, the corresponding author will be held accountable. The consequence for noncompliance is simple: the corresponding author will not publish in *Parasite Immunology* for the following three years.

Disclosures and Conflict Interest

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

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

- **Personal financial interests:** Stocks or shares in companies that may gain or lose financially through publication; consultant fees or fees from speakers bureaus other forms of remuneration from organisations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication.
- **Funding:** Research support from organisations that might gain or lose financially through publication of the paper.
- **Employment:** Recent, present or anticipated employment of you or a family member by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper. Any such competing interest that authors may have should be declared. The aim of the

statement is not to eradicate competing interests, as they are almost inevitable. Papers will not be rejected because there is a competing interest, but a declaration on whether or not there are competing interests will be added to the paper.

- **Patent rights**

- **Consultancy work.** All authors must disclose competing interests, or state “none” via the Journal's ScholarOne Manuscripts website.

All sources of funding must be disclosed in the Acknowledgments section of the paper. List governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred. Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

For papers where there are no competing interests, all authors must include the statement ‘Competing interests: the authors have no competing interests.’ We will also ask reviewers to provide a statement of competing interests.

Copyright and OnlineOpen

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

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

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are

treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

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

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

CTA Terms and Conditions

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

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

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

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

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

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

<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Accepted Articles

'Accepted Articles' have been accepted for publication and undergone full peer review but have not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only (without the accompanying full-text HTML) and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity. More information about DOIs can be found online

at <http://www.doi.org/faq.html>. Given that Accepted Articles are not considered to be final, please note that changes will be made to an article after Accepted Article online publication, which may lead to differences between this version and the Version of Record. The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear either as Early View articles in a matter of weeks or in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Early View

Parasite Immunology is covered by Wiley's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not have volume, issue or page numbers yet, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are, therefore, given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Citing Accepted and Early View Articles

To include the Digital Object Identifier (DOI) in a citation to an article, simply append it to the reference as in the following example: Choi, B and Kropf, P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarisation *ex vivo* and *in vitro*. *Parasite Immunol*; DOI: 10.1111/j.13653024.2008.01094.x

To link to an article from the author's homepage, take the DOI (digital object identifier) and append it to "http://dx.doi.org/ " as per the following example: DOI 10.1111/pim.12023, becomes http://dx.doi.org/ 10.1111/pim.12023

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: [Adobe Reader Download](#). This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. **Author Services**

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

Offprints

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via [Author Services](#) only. Please therefore sign up for [Author Services](#) if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form, which accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is more if the order form arrives too late for the

main print run. Offprints are normally dispatched within three weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the following if offprints do not arrive:

C.O.S. Printers Pte Ltd., 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; Email: offprint@cosprinters.com. However, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to six weeks to arrive. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper. **Immunity, Inflammation and Disease**

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

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via [Author Services](#) only. Please therefore sign up for [Author Services](#) if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form, which accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is more if the order form arrives too late for the

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

journal and article publication fees apply. For more information please go to www.immunityinflammationdisease.

ANEXO C- NORMAS DE SUBMISSÃO À REVISTA BRASILEIRA DE
MEDICINA
TROPICAL

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Tipos de manuscrito](#)
- [Preparação do manuscrito](#)
- [Formatação do manuscrito](#)

Tipos de manuscrito

A Revista convida à publicação Artigos Originais, Artigos de Revisão e Minirrevisões, Editoriais, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas e Números Especiais.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título e referências). O manuscrito deve conter resumo estruturado com até 250 palavras, com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo com até 250 palavras (não estruturado). Cinco ilustrações são permitidas (tabelas e figuras). São publicadas também minirrevisões. Minirrevisões têm no máximo 3.000 palavras (excluindo resumo, título e referências). Devem ter resumo (não estruturado) com até 200 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo não estruturado, Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Conflito de Interesses, Lista de Referências e Título das Figuras/Legendas. **Editoriais:** usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências. **Comunicações Breves:** devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. As comunicações breves devem ter no máximo 2.000 palavras (excluindo resumo, título e

referências); Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Até três palavras-chaves devem ser fornecidos. O corpo do manuscrito não devem conter subdivisões ou subtópicos. Declaração de conflito de interesses deve ser incluída. **Relatos de Casos:** devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras (excluindo título, resumo e referências), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo não estruturado com no máximo 100 palavras e três palavras-chaves. O Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo, Palavras-Chaves, Texto do Manuscrito (Introdução, Relato de Caso, Discussão), Lista de Referências e Título das Figuras/Lendas.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de **experts**. Será considerado, se formatado como um editorial.

Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Apenas três autores e três referências são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras (excluindo título e referências) com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras.

Cartas: leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da Revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (figura ou tabela) e pode tratar de material anteriormente publicado na revista, com até 12 referências.

Números Especiais: Propostas de números especiais devem ser feitas ao o Editor e/ou Editor Convidado. A proposta será analisada levando em consideração o tema, organização do programa ou produção de acordo com escopo da revista.

Preparação do manuscrito

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto possível. Os editores reservam-se o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

Sistema de Sumissão On-line: Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão **on-line** nos endereços <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmtscielo> ou <http://www.scielo.br/rsbmt>. O autor deve escolher dentro do item “Tipos de Manuscrito” uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de

Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Réplica à Carta ou Outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Carta de Apresentação: a) deve conter uma declaração, assegurando de que se trata de pesquisa original e que, ainda, não foi publicada, nem está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar pelos outros co-autores, mediante procuração. c) Os autores devem incluir na **Cover Letter** uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem, nem o número de autores alterados, sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. d) Devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Contribuição dos autores: Os autores devem incluir, em documento separado, uma declaração de responsabilidade especificando a contribuição, de cada um, no estudo.

Edição da Pré-Submissão: todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser em inglês. É altamente recomendável que os autores utilizem os serviços de uma empresa profissional de edição e/ou tradução. A revisão/edição da língua inglesa não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

Formatação do manuscrito

O manuscrito deve ser preparado usando **software** padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte **Times New Roman** tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelo menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, Título,

Resumo, palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Declaração de Conflito de Interesses, Lista de Referências, Título das Figuras/Legendas. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados (estes dois últimos podem ser incluídos junto com a Página de Título). Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, afiliações institucionais (Departamento, Instituição, Cidade, Estado e País de cada autor). O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone, fax e e-mail. Na página de título também podem ser incluídos agradecimentos e suporte

financeiro. A quantidade de autores por manuscrito é limitada a oito, exceto para estudos multicêntricos.

Indicação de potenciais revisores: Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de região e instituição diferente dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 50 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 palavras devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas e o número de aprovação deve ser enviado à Revista.

Ensaio Clínico: No caso de Ensaios Clínicos, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC). Estes requisitos estão de acordo com a BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>) e do Workshop ICTPR.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos àqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por “et al”. Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos “em preparação” ou “submetidos para publicação” não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separadas por parênteses, sem vírgula. [Ex.: Mundo^{(1) (2) (3)}; Vida^{(30) (42) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50)}]. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos

(Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no **Index Medicus** (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Citação de Artigos em Geral: autores, título do artigo na língua original em que foi publicado, nome do periódico, ano, volume, páginas inicial e final completas.

Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. **In vitro** enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:697-701.

2. Capítulo de livro: autores do capítulo, título do capítulo, editores, nome do Livro, edição, cidade, editora, ano e página.

Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361380.

3. Livro: autores do livro, nome do livro, edição, cidade, editora e ano.

Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

4. Dissertação/Tese: Autor, Título, Tipo (Dissertação ou Tese), Lugar da Publicação, Nome da Instituição, Ano, Total de páginas.

Cosendey MAE. Análise da implantação do programa farmácia básica: um estudo multicêntrico em cinco estados do Brasil. [Doctor's Thesis]. [Rio de Janeiro]: Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz; 2000. 358 p.

Figuras: devem ser submetidas, em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. **Título e Legendas:** devem ser digitadas com espaçamento duplo no final do manuscrito. **Dimensões:** As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

- **Fotografias:** devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato Tiff. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (**Adobe Photoshop, Corel Photo Paint**, etc).
- **Gráficos:** criados usando **Microsoft Excel**, devem ser salvos com a extensão original (.xls).
- **Mapas e Ilustrações:** devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os **softwares Corel Draw** ou **Illustrator** em alta resolução.
- **Imagens:** produzidas em **software** estatístico devem ser convertidas para o formato **Excel** ou se o programa permitir, em formato PDF.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte **Times New Roman**, tamanho 9.

Processo de Envio: os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmtscielo>, seguindo as

instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e Revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá reenviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito. **Revisão:** caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a Aceitação: Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

- a) Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.
- b) Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição, não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las corrigidas, dentro de dois quatro dias.
- c) Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo ao cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.
- d) Os artigos aceitos remanescentes a cada número da revista serão disponibilizados **online** enquanto aguardam a prioridade para publicação na versão impressa.

Re-impressões: a Revista fornece ao autor, gratuitamente, excertos do artigo em formato PDF, via e-mail.

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução são de responsabilidade dos autores. A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** não fornece qualquer tipo de serviço de tradução. Custos de publicação de imagens coloridas são de responsabilidade dos autores.

Workflow

Workflow **do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina

Tropical é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical com acesso aberto. É uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A Revista possui um sistema de revisão por pares para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é

bimestral. Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão **online** no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmtscielo>.

Política de Revisão do Periódico (workflow):

1. Os manuscritos submetidos para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são inicialmente avaliados pela Secretaria quanto à adequação do texto às normas do periódico.
2. Após esta etapa, os manuscritos adequados às Normas Para Publicação da Revista serão avaliados pelo Editor ou Editores Associados quanto ao escopo e a política editorial do periódico. A Secretaria envia o manuscrito para o Editor-Chefe.
3. O Editor-Chefe designa um Editor Associado ou designa revisores.
4. O **paper** será enviado a pelo menos dois revisores num sistema duplo-cego para avaliação e emissão de um relatório fundamentado (**peer review**), que será usado pelos Editores para decidir se o manuscrito será aceito ou não. No caso de conflito de pareceres dos revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro parecerista para validar uma decisão final.
5. Comentários dos Revisores (**Free Form Review**) serão encaminhados ao autor correspondente (autor principal para correspondência editorial) para responder aos questionamentos feitos.
6. Os autores enviam suas respostas aos questionamentos e reenviam a versão revisada do manuscrito. A versão revisada será enviada aos revisores que emitirão um relatório final fundamentado.
7. Depois da análise final dos revisores, a versão corrigida do manuscrito será enviada aos Revisores de Métodos Quantitativos para análise. Sugestões serão enviadas aos autores para correções e resubmetida aos Revisores de Métodos Quantitativos para reavaliação.
8. Os apontamentos dos Revisores e as respostas dos autores serão analisados pelos Editores Associados e/ou Editor-Chefe.
9. O Editor-Chefe emite uma decisão final.

10. A decisão editorial final (aceitação ou rejeição) é enviada aos autores.
11. Após esta etapa, inicia-se o processo de edição. O manuscrito aceito é enviado à edição quanto à qualidade linguística do inglês.
12. A revisão de inglês é enviada aos autores para análise e declaração de aceitação da revisão.
13. Após esta etapa, inicia-se o processo de diagramação, com contato com o autor correspondente no que diz respeito às figuras, tabelas, fotografias, mapas, ilustrações e formatação em geral.
14. Após esta etapa, é requerido aos autores declarar formalmente qualquer conflito de interesse, suporte financeiro e cessão de direitos autorais.
15. Provas são enviadas ao autor correspondente para cuidadosa correção e acuidade tipográfica.
16. A versão final de cada manuscrito é selecionada para compor o próximo número e será enviada ao **Ahead of Print** na plataforma SciELO.
17. A versão impressa é publicada e será disponibilizada em acesso aberto em <http://www.scielo.br/rsbmt>.