



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

PATRÍCIA D'EMERY ALVES SANTOS

**“DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS
NASCIDOS OU AMAMENTADOS EM MÃES INFECTADAS PELO
Schistosoma mansoni”**

RECIFE - PE

2008

PATRÍCIA D'EMERY ALVES SANTOS

**“DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS
NASCIDOS OU AMAMENTADOS EM MÃES INFECTADAS PELO
Schistosoma mansoni”**

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Malagueño de Santana
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

RECIFE - PE

2008

Santos, Patrícia d'Emery Alves

Determinação do perfil de resposta imune de camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *Schistosoma mansoni* / Patrícia d'Emery Alves Santos. – Recife : O Autor, 2008.

90 folhas: il., graf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2008.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Schistosoma Mansoni*. 2. Imunomodulação. 3. Camundongos – Filhotes. 4. Camundongos – Amamentação. 5. OVA. I. Título.

576.8

CDU (2.ed.)

UFPE

616.963

CDD (22.ed.)

CCS-8/2008



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

REITOR

Profº. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Profº. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profº. José Tadeu Pinheiro

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

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Profª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

CORPO DOCENTE

Profª. Célia Maria Machado Barbosa de castro

Profª. Elizabeth Malagueño de Santana

Profª. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Profª. Maria Amélia Vieira Maciel

Profª. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Profª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Profª. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Profº. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Profª. Silvia Maria de Lemos Hinrichsen

Profª. Vera Magalhães da Silveira



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL – MESTRADO E DOUTORADO

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

PATRÍCIA D'EMERY ALVES SANTOS

No dia 26 de fevereiro de 2008, às 14h00, na Sala de Reunião do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Térreo do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), os Membros Doutores: **Profª Drª Ana Lúcia Coutinho Domingues (UFPE – Membro Externo)**, a Pesquisadora **Drª. Carla Lima (Instituto Butantan – Membro Externo)** e a **Profª Drª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (UFPE – Membro Interno)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda **PATRÍCIA D'EMERY ALVES SANTOS** sobre a sua dissertação intitulada **“DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS NASCIDOS OU AMAMENTADOS EM MÃES INFECTADAS PELO *Schistosoma mansoni*”**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Ana Lúcia Coutinho Domingues

aprovada

Pesquisadora Drª. Carla Lima

aprovada

Profª. Drª. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

aprovada.

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Profª. Drª. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Carla Lima

Pesquisadora Drª. Carla Lima

Mônica C. P. A. Albuquerque

Profª. Drª. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

DEDICO

À memória de vovô Oséas.

*Aos meus pais, Jorge e Madalena, e meus
irmãos, Breno e Tatiana, pelo verdadeiro
sentido da palavra família.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, acima de tudo, e à Santa Rita de Cássia, tantas vezes recorrida, tantas vezes intercessora, fazendo jus ao título de Santa das Causas Impossíveis.

Aos anjos especiais que tenho sempre ao meu lado: Painho, Mainha, Breno e Tati. Sempre presentes, atenciosos, amáveis, carinhosos e extremamente importantes nessa reta final repleta de percalços.

À prof^a. Elizabeth Malagueño e à prof^a Valdênia Souza, as maiores responsáveis pela realização deste trabalho, por todos os ensinamentos transmitidos, por despertarem em mim o desejo de estar sempre me atualizando e por desempenharem tão bem o papel de orientadoras, presentes em todos os momentos, principalmente nos meus vários “ataques de dúvidas”.

À Rafaela, pela ajuda em todos os procedimentos experimentais, pela paciência e dedicação aos nossos “filhotes”, sem a qual tudo teria sido muito mais difícil.

Às grandes amigas Narjara e Thaís, por estarem sempre dispostas a ajudar, pelas muitas palavras de incentivo e pelos bons momentos de descontração. Verdadeiras amigas!

A todos do setor de Imunologia do LIKA: às professoras Elizabeth, Valdênia, Mônica, Vláudia e Silvana, e a todos os estagiários Fernanda, Narjara, Carol, Karina, Djalma, Rafaela, Ricardo, Milena, Marek, Andréa, Juliana, Andrew e Conceição, por tornarem o ambiente tão agradável e tão mais fácil de trabalhar.

A todos do biotério do Aggeu Magalhães: a veterinária Giuliana, a Eduardo e Rodrigo, mas principalmente à Conceição, por cuidar tão bem dos meus animais.

Aos amigos e colegas de mestrado: Millena, Eduardo, Tatiana, Robson, Deyse, Cláudia e Valdenise. Aos funcionários Walter e Jupira, por estarem sempre disponíveis e facilitarem nossas vidas.

*“Viva como se fosse morrer amanhã,
aprenda como se fosse viver para sempre”.*

Mahatma Gandhi

RESUMO

O *Schistosoma mansoni* induz imunossupressão a antígenos homólogos e heterólogos no hospedeiro. Em áreas onde a esquistossomose é endêmica, é comum observar gestantes cronicamente infectadas. Atualmente, todas as espécies de *Schistosoma* infectam aproximadamente 40 milhões de mulheres em idade fértil no mundo, e já é sabido que a exposição *in utero* aos antígenos do parasita provoca alterações na resposta imune do recém-nascido que podem afetar respostas subseqüentes a antígenos homólogos. Neste estudo, investigamos se a exposição à infecção materna por *Schistosoma mansoni* pode influenciar a resposta imune dos descendentes a um antígeno heterólogo, ovalbumina (OVA). Camundongos adultos nascidos e/ou amamentados em fêmeas infectadas pelo *S. mansoni* foram utilizados para formação de três grupos experimentais: filhotes nascidos (MI), amamentados (AI) ou nascidos e amamentados (MIAI) em mães infectadas, e um grupo controle: animais nascidos e amamentados em mães não-infectadas. Os animais foram imunizados s.c. com OVA em adjuvante e após 8 dias, foram desafiados no coxim plantar com OVA agregada para análise das reações de hipersensibilidade e dosagem plasmática de IgG1 e IgG2a OVA-específica. As células esplênicas foram cultivadas para quantificação das citocinas IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes. Em comparação ao grupo controle, as respostas humoral e celular anti-OVA foram potencializadas nos animais MIAI+OVA, enquanto que nos animais AI+OVA esta potencialização foi melhor observada na produção de anticorpos anti-OVA. Nestes dois grupos ocorreu um aumento na produção de IL-2. Por outro lado, os animais MI+OVA apresentaram uma alta produção de IL-10. Mesmo assim, a resposta imune anti-OVA neste grupo só foi parcialmente suprimida. Com base nestes resultados, concluímos que filhotes de mães esquistossomóticas podem sofrer na vida adulta alterações na sua resposta imunológica a um antígeno heterólogo, adquirindo um potencial supressivo através da gestação, mas que com a amamentação vai se tornando mais eficaz. Esses resultados destacam a importância da amamentação.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; Imunomodulação; Gestação; Filhotes; Amamentação; OVA.

ABSTRACT

Schistosoma mansoni induces immunosuppression against homologous and heterologous antigens in the host. In endemic areas for schistosomiasis, chronically infected pregnant women are usual. Currently, schistosomes infect near 40 million women of childbearing age. Neonatal exposure to parasite antigens *in utero* may interfere in the fetal immunity and affect subsequent responses to homologous antigens. Here, we investigated if exposure to maternal *S. mansoni* infection could influence the offspring immune responses to heterologous antigen, ovalbumin (OVA). Adult mice born and/or suckled in *S. mansoni*-infected mothers were studied. Three experimental groups were formed: mice born (BIM) or suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) in infected mothers and one control group: born and suckled mice in non-infected mothers. These mice were immunized by subcutaneous injection with OVA in adjuvant. On 8th day, they were challenged with aggregated OVA in the footpad for hypersensitivity reactions and plasma anti-OVA IgG1 and IgG2a antibodies analyses. Spleen cells were cultured for measuring IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 cytokines contents in the supernatants. Comparing to control, anti-OVA humoral and cellular immune response were increased in BSIM mice, whereas in the SIM mice only the anti-OVA antibody production was remarkably higher. In both the groups an increment in IL-2 production was observed. In contrast, greater IL-10 synthesis was obtained in the BIM group and no nursing. In spite of this, the anti-OVA immune response was not widely impaired in this group. Hence, offspring from *Schistosoma*-infected mothers may have altered their immune response to unrelated antigen in the adult life, acquiring a suppressive potential during the prenatal stage and improvement of immune system through nursing. These results highlight the importance of breastfeeding.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Immunomodulation; Pregnancy; Offspring; Breastfeeding; OVA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1. Formação dos grupos de estudo	40
---	----

ARTIGO

Figura 1. Reações de hipersensibilidade à OVA em camundongos <i>Swiss Webster</i> imunizados com OVA	68
---	----

Figura 2. Níveis dos anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) anti-OVA nos plasma de camundongos <i>Swiss Webster</i> imunizados com OVA	69
--	----

Figura 3. Níveis de IL-2 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C) secretados pelas células esplênicas de camundongos <i>Swiss Webster</i> imunizados com OVA	70
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
APCs	“Antigen Presenting Cells” (Células apresentadoras de antígenos)
Cepa SLM	Cepa São Lourenço da Mata
Con-A	Concanavalina A
DCs	“Dendritic Cells” (Células dendríticas)
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Ensaio imunoenzimático)
IFN-γ	Interferon γ
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
MHC	“Major Histocompatibility Complex” (Complexo de Histocompatibilidade Principal)
OVA	Ovalbumina
PBS	“Phosphate Buffered Saline” (Solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato com 0,05% de Tween 20
RH	Reações de hipersensibilidade
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
TCR	“T Cell Receptors” (Receptores das células T)
Th	Linfócitos T “helper” (auxiliares)
Th1	Linfócitos T “helper” tipo 1
Th2	Linfócitos T “helper” tipo 2
Tregs	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ESQUISTOSSOMOSE	19
2.2 IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE	21
2.3 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS HETERÓLOGOS	27
2.4 A RELAÇÃO MATERNO-FETAL E A IMUNOMODULAÇÃO	29
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 DESENHO DO ESTUDO	38
4.2 ANIMAIS	38
4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	39
4.4 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS	40
4.4.1 Variável independente	40
4.4.2 Variável dependente	41
4.5 PARASITOLÓGICO DE FEZES	41
4.6 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTO	41
4.7 IMUNIZAÇÃO	42
4.8 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE (RH)	42
4.9 SANGRIA TOTAL POR PUNÇÃO CARDÍACA	43
4.10 CULTURA CELULAR PARA DOSAGEM DE CITOCINAS	43
4.11 DOSAGEM DE CITOCINAS	44
4.12 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS	45
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4.14 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
5 ARTIGO	48
ARTIGO: ESQUISTOSSOMOSE MATERNA AFETA A RESPOSTA IMUNE	
ANTI-OVA DOS DESCENDENTES	49
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51

ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS	52
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS	64
FIGURAS	68
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	83
ANEXO 1 - Aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa/UFPE)	84
ANEXO 2 - Normas para publicação na revista	85

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose, segunda parasitose em importância de saúde pública mundial, é endêmica em 74 países (CHITSULO et al., 2000), estimando-se em 200 a 300 milhões o número de pessoas infectadas no mundo por todas as espécies de *Schistosoma*, com cerca de 652 milhões sob risco de contrair a doença (PARISE FILHO & SILVEIRA, 2001; BLANCHARD, 2004; WHO, 2004). No Brasil, a esquistossomose é produzida exclusivamente pela espécie *S. mansoni* (NEVES et al., 2005), e Pernambuco está entre os estados que exibem uma das mais altas prevalências de pessoas infectadas (BARBOSA et al., 2006).

Em áreas onde a esquistossomose é endêmica, é comum observar gestantes cronicamente infectadas pelo *S. mansoni*. A transferência transplacentária de antígenos de *S. mansoni* já foi relatada por alguns pesquisadores (CARLIER et al., 1980; HASSAN et al., 1997). Mais recentemente, ATTALLAH e colaboradores (2003) corroboraram estes achados ao detectarem o antígeno 63-kD (identificado em diferentes fases do ciclo do *S. mansoni*) por Western blotting no leite, soro e cordão umbilical de mães infectadas pelo *S. mansoni*. Quando estudados os recém-nascidos das mães infectadas, o antígeno 63-kD foi observado em todas as amostras de urina e persistiu por 18-24 meses após o parto em recém-nascidos amamentados, enquanto os não-amamentados tiveram o antígeno detectado na urina apenas até 28 dias após o parto, demonstrando a influência da amamentação para manutenção dos níveis do antígeno.

A exposição aos antígenos do parasita durante o período pré-natal provoca alterações na resposta imune do recém-nascido. Com relação aos antígenos homólogos, HANG e colaboradores (1974) demonstraram que camundongos nascidos de mães esquistossomóticas maciçamente infectadas eram tolerantes aos antígenos do parasita, com indução de uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni*. Já em humanos, estudo feito por CAMUS e colaboradores (1976) demonstrou que crianças não-infectadas nascidas de

mães infectadas pelo *S. mansoni* apresentam maior sensibilização ao antígeno de *Schistosoma*, com 48,1% delas reagindo positivamente ao teste de reação intradérmica, quando comparadas às crianças nascidas de mães não-infectadas (7,5%). MALHOTRA e colaboradores (1997), estudando a produção de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 em resposta aos antígenos de *S. haematobium* pelos linfócitos do cordão umbilical e comparando com as células mononucleares do sangue periférico materno, demonstraram que os fetos humanos produzem padrões de citocinas similares aos produzidos pelos adultos, sugerindo que a exposição pré-natal não conduz a uma tolerância nem altera a imunidade fetal.

Embora estudos venham demonstrando que os antígenos parasitários podem modular (suprimir ou potencializar) a resposta imune de filhos de mães esquistossomóticas, essa relação imunológica ainda não está completamente esclarecida, e muito pouco é sabido quando a resposta é direcionada a um antígeno heterólogo. MALHOTRA e colaboradores (1999) estudaram as alterações provocadas na resposta imune do recém-nascido a um antígeno heterólogo e demonstraram que a infecção materna pelo *S. haematobium* ou *Wuchereria bancrofti* durante a gravidez sensibiliza aproximadamente 50% dos recém-nascidos *in utero*, e que esta imunidade pré-natal persiste na criança influenciando sua resposta imune celular ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin) diminuindo a eficácia da vacinação.

Assim, este estudo se propõe estudar a inter-relação “esquistossomose-gravidez”, através da análise do perfil de resposta imunológica a um antígeno heterólogo, ovalbumina, em camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESQUISTOSSOMOSE

A ocorrência das parasitoses é predominante nos países em desenvolvimento por estar fortemente relacionada com a falta de educação sanitária, de investimentos em infra-estrutura e de saneamento básico. Além disso, o baixo nível sócio-econômico e cultural, são fatores determinantes para aumentar as dificuldades de controle das mesmas (PARISE FILHO & SILVEIRA, 2001). No Brasil, o rápido crescimento das cidades aliado à falta de recursos impedem que as atividades sanitárias, como suprimentos seguros de água e rede de esgoto adequada, cheguem às áreas peri-urbanas, favorecendo a alta incidência das doenças parasitárias nas populações mais carentes. Entre as doenças parasitárias mais importantes do mundo em desenvolvimento, está a esquistossomose (MENEZES, SIQUEIRA & SILVA, 1993).

Doença parasitária helmíntica, a esquistossomose é causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, cujas espécies mais importantes que infestam humanos são *S. mansoni*, *S. mekongi* e *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. intercalatum* (FRISTSCHKE & SMITH, 1999). No Brasil, a esquistossomose é causada exclusivamente pela espécie *S. mansoni* (NEVES et al., 2005), e atualmente sua transmissão ocorre em uma vasta área endêmica, do Maranhão ao Espírito Santo, Minas Gerais, e focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COURA & AMARAL, 2004).

O ciclo biológico do *S. mansoni* é do tipo heteroxênico. O homem é o hospedeiro vertebrado definitivo, onde ocorre a fase sexuada do ciclo, no qual os vermes adultos são encontrados acasalados em cópula, no sistema porta hepático. Centenas de ovos são postos diariamente por cada fêmea nas veias mesentéricas inferiores, a maioria atravessa a parede intestinal, sendo encontrados ao longo do intestino e eliminados nas fezes. Em contato com a

água e notavelmente influenciados pela temperatura, esses ovos eclodem e liberam os miracídios, que infectam os caramujos do gênero *Biomphalaria* (hospedeiros intermediários), transformam-se em esporocistos que assexuadamente dão origem a numerosas larvas (as cercárias). Devido à alta motilidade, estas cercárias penetram através da pele do hospedeiro definitivo, perdem a cauda e adquirem a forma de esquistossômulos (verme imaturos), estes migram pelo tecido cutâneo, ganham o sistema sangüíneo ou linfático e chegam aos pulmões. Posteriormente migram para o sistema porta hepático, e dentro de 28 a 30 dias após a penetração, tornam-se vermes adultos, copulam e os ovos começam a ser liberados, reiniciando o ciclo (BATISTA, SANTOS & GOMES, 2001; BLANCHARD, 2004).

As formas clínicas da esquistossomose são muito variadas. Caracterizam-se por uma fase aguda, na maioria das vezes assintomática, e outra fase crônica, com diferentes manifestações e implicações para o doente (CHITSULO et al., 2000). Algumas espécies podem produzir uma forma aguda de esquistossomose, conhecida como Síndrome de Katayama, que ocorre nos pacientes infectados recentemente (2-6 semanas após a exposição), consiste em uma reação febril à forte infecção, freqüentemente acompanhada por urticária e eosinofilia, é mais comum nas infestações por *S. japonicum*, mas também pode ocorrer na forma mansônica. Em alguns indivíduos previamente infectados, a invasão de cercárias pode induzir uma dermatite com características de hipersensibilidade tanto imediata quanto tardia (WARREN, 1972; BLANCHARD, 2004).

Os vermes atingem o estágio adulto e, após a cópula, as fêmeas começam a liberar os ovos, muitos são eliminados nas fezes, mas alguns se alojam nos tecidos, principalmente hepático e intestinal, onde ocorre liberação de antígenos solúveis dos ovos que estimulam intensamente a resposta imunológica. Há acúmulo de células ao redor dos ovos, com predomínio de eosinófilos, macrófagos e linfócitos T, resultando na formação do granuloma clássico da esquistossomose, evento patogênico mais significativa da fase crônica da doença.

Nas infecções por *S. mansoni*, o principal órgão afetado é o fígado, uma vez que o fluxo sanguíneo leva a maioria dos ovos para este sítio, e em virtude de seu tamanho, ficam retidos nas vênulas e não penetram os sinusóides (HAGAN, NDHLOVU & DUNNE, 1998; PEARCE & MacDONALD, 2002; GRYSEELS et al., 2006).

A doença crônica com manifestações graves é um evento relativamente incomum em humanos, só afetando aproximadamente 10% dos indivíduos infectados. Uma minoria de pacientes com infecção acentuada sem tratamento por muito tempo pode vir a desenvolver esquistossomose hepática crônica ou fibrótica, resultante de uma maciça deposição de colágeno nos espaços periportais. A fibrose pode levar a uma oclusão progressiva das veias portais, com hipertensão portal, esplenomegalia, ascite e varizes gastroesofágicas (HAGAN, NDHLOVU & DUNNE, 1998; GRYSEELS et al., 2006). Alguns pacientes podem vir a apresentar hipersplenismo; já o envolvimento do sistema nervoso central é mais raro, mas causa importantes complicações, podendo estar associado a lesões cerebrais e do cordão espinhal (BLANCHARD, 2004).

2.2 IMUNOMODULAÇÃO NA ESQUISTOSSOMOSE

O estudo da resposta imunológica do hospedeiro aos parasitas continua sendo fonte de importantes descobertas sobre a relação parasita-hospedeiro, proporcionando maior compreensão das doenças parasitárias e apontando mecanismos para o controle das mesmas, bem como para o desenvolvimento de vacinas.

Os linfócitos são as principais células das respostas imunes adaptativas e se subdividem em duas grandes populações principais: os linfócitos B, células produtoras de anticorpos, e os linfócitos T, mediadores da imunidade celular. Os linfócitos T são divididos em linfócitos T auxiliares (Th) ou CD4+, e linfócitos T citotóxicos ou CD8+. As células T

CD4⁺ são as reguladoras centrais da resposta imune e são classicamente subdivididas em Th1 e Th2 (MOSMANN et al., 1986; ROCHA & TANCHOT, 2004; STOCKINGER, BOURGEOIS & KASSIOTIS, 2006). O perfil de resposta modulado por células Th1 é caracterizado pela secreção das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-2, que estão envolvidas na ativação dos macrófagos, proteção contra bactérias intracelulares e eliminação de vírus. Esse perfil também é estimulado por antígenos protéicos administrados com adjuvantes fortes, como ocorre, por exemplo, nas vacinações. O IFN- γ ainda participa da regulação da troca isotípica (“switch”) da IgG2a nos linfócitos B. Por outro lado, no perfil de resposta modulado por células Th2 são produzidas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, citocinas que auxiliam na produção de IgE por células B (e de IgG1 em camundongos) e participam da maturação e ativação de mastócitos e eosinófilos, sendo, portanto, essenciais na proteção contra infecções helmínticas, bem como no desenvolvimento de alergias (MOSMANN & COFFMAN, 1989; LEDERER et al., 1996; STOCKINGER, BOURGEOIS & KASSIOTIS, 2004; ABBAS & LICHTMAN, 2005).

É sabido que infecções parasitárias crônicas levam a um perfil predominante da resposta imunológica. Muitos estudos têm traçado um esboço da importância das citocinas na resposta imune à infecção esquistossomótica, e têm especulado sobre os perfis Th1/Th2, tanto em humanos, quanto em modelos experimentais. Em humanos, a infecção pelo *S. mansoni* está associada a um predomínio da resposta imunológica de perfil Th2 onde os antígenos dos ovos são os principais indutores. Contudo, carboidratos das glicoproteínas imunogênicas do ovo podem estimular a produção de imunoglobulinas da subclasse IgG2 que caracteriza um perfil Th1 (FALCONER et al., 1992; LANGLEY et al., 1994). Em camundongos infectados com *S. mansoni* foi demonstrado a secreção de citocinas Th1 pelas células hepáticas antes da postura dos ovos, e que após a oviposição ocorre uma forte resposta Th2 devido à presença dos antígenos dos ovos, com decréscimo na secreção de IFN- γ e IL-2 coincidindo com

elevação da IL-4 e IL-5 (PEARCE et al., 1991). O mesmo padrão de citocinas observado por GRZYCH e colaboradores (1991) estudando células esplênicas de camundongos infectados pelo *S. mansoni*.

Posteriormente, a IL-10 produzida principalmente pelos clones Th2 foi associada à supressão da resposta Th1, sendo, portanto, o perfil de resposta Th2 associado com a proteção e a geração da cronicidade das infecções esquistossomóticas por controlar a resposta granulomatosa ao redor dos ovos (FINKELMAN et al., 1991; STADECKER & FLORES VILLANUEVA, 1994). Estudos posteriores sobre os mecanismos de modulação do granuloma na esquistossomose murina mostraram que animais IL-10^{-/-} (geneticamente deficiente da produção de IL-10) desenvolvem um perfil misto Th1/Th2, havendo aumento de IFN- γ /IL-5, acompanhado de níveis maiores ou não alterados de IL-4 (WYNN et al., 1997). Atualmente, a IL-10 tem sido considerada uma citocina amplamente regulatória, uma vez que sua ação antiinflamatória não é restrita a um dos subtipos Th1 ou Th2 e sua ação supressora na esquistossomose se deve, principalmente, à sua capacidade de inibir a ativação de macrófagos, diminuir a expressão de moléculas co-estimulatórias e moléculas de histocompatibilidade principal (“major histocompatibility complex” - MHC) nas células apresentadoras de antígenos (“antigen presenting cells” - APCs) (STADECKER & FLORES VILLANUEVA, 1994; MOORE et al., 2001).

A indução das respostas Th1 e Th2 requer um envolvimento inicial das células dendríticas (“dendritic cells” - DCs), que são APCs derivadas da medula óssea. As DCs são as únicas células capazes de capturar, transportar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos virgens para iniciar uma resposta imune adaptativa (SHORTMAN & LIU, 2002). Até pouco tempo atrás, as DCs eram divididas nos seguintes subtipos: DCs de origem linfóide e DCs de origem mielóide que diferiam entre si pelo perfil de citocinas que induziam nas células T, com o subtipo linfóide induzindo altos níveis de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) e pouca ou

quase nenhuma citocina Th2. Em contrapartida, o subtipo mielóide induzindo grandes quantidades de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10), mas também IFN- γ e IL-2 (PULENDRAN et al., 1999).

Entretanto, trabalhos mais recentes estão demonstrando que a indução de determinado fenótipo de células T depende muito mais das condições de ativação e do grau de maturação das células dendríticas do que necessariamente de sua linhagem (CELLA et al., 2000), e atualmente uma nova classificação baseada na expressão da molécula de superfície CD11c pelas DCs vem sendo adotada para diferenciá-las em: DCs convencionais (CD11c+) e DCs plasmocitóides (CD11c-). As DCs convencionais incluem pelos menos três subclasses presentes nos órgãos linfóides secundários: as células CD8a+, as CD4+ e as duplo negativas (CD8a-/CD4-), como também as células de Langerhans, subtipo encontrado no epitélio da pele e tecidos mucosos drenados para linfonodos, que como as demais DCs convencionais expressam altos níveis de marcadores mielóides, entre eles o CD11b e altos níveis da molécula de superfície do MHC de classe II. As DCs plasmocitóides não expressam marcadores mielóides, mas expressam altas quantidades da cadeia α dos receptores da IL-3 (IL-3Ra; CD123), CD68, CD36 e o receptor inibitório ILT3 (CELLA et al., 2000; SHORTMAN & LIU, 2002; KAPSENBERG, 2003).

No perfil de resposta Th1, está bem estabelecido que as DCs, apresentando antígenos bacterianos e de protozoários, promovem a produção de IL-12, IL-18 e IFN- α e regulam a expressão de moléculas co-estimulatórias como a CD80 e a CD86 (REIS E SOUSA et al., 1997; MAIZELS et al., 2004; REIS E SOUSA, 2006). Já para o perfil Th2, ainda é controverso como as DCs estimulam este tipo de resposta, não se sabe se existem citocinas e moléculas de superfície que estimulam a diferenciação em Th2 ou se é a incapacidade de algumas DCs maduras de produzir IL-12 e direcionar a resposta para o perfil Th1 que resulta num perfil Th2 (JANKOVIC, LIU & GAUSE, 2001; REIS E SOUSA, 2006). Muitos estudos

experimentais mostram que a indução da resposta Th2 pode ser reproduzida *in vitro* simplesmente pela exposição das DCs aos produtos helmínticos, entre eles o antígeno de ovo de *S. mansoni* (“soluble egg antigen” - SEA) (MacDONALD et al., 2001). Nenhum novo fenótipo das DCs estimuladas por antígenos helmínticos é detectado, nem ocorre aumento significativo das citocinas IL-4 e IL-10 (que poderiam estar inibindo a resposta Th1). Estas evidências dão suporte à hipótese de que a resposta imune Th2 ocorre devido a uma maturação de DCs incapazes de produzir IL-12 (PEARCE & MacDONALD, 2002; MAIZELS et al., 2004).

Alguns antígenos possuem a capacidade de induzir a produção de IL-10 nas APCs, através de um caminho alternativo de ativação via moléculas DC-SING (“DC-specific C-type lectin”), resultando em uma imunossupressão devido a modulação na função das células dendríticas (GEIJTENBEEK et al., 2003). Os ovos e vermes de *S. mansoni* possuem açúcares potencialmente indutores de IL-10 nas DCs (VAN DIE et al., 2003). Esta IL-10, produzida ainda na fase inicial da resposta imune, é muito importante na geração e manutenção das células T regulatórias (Tregs) (WAKKACH et al., 2003).

As células Tregs podem ser categorizadas em dois subtipos, as naturais e as adaptativas. As Tregs naturais se originam no timo, expressam o FoxP3 (“Forkhead Box P3” - um fator de transcrição que controla o desenvolvimento e a função das células Tregs), exibem um vasto repertório de receptores (“T cell receptor” - TCR) voltados para o reconhecimento de antígenos próprios e, pelo menos *in vitro*, desempenham suas funções por mecanismos independentes de citocinas, envolvendo interações diretas célula-célula (BLUESTONE & ABBAS, 2003; HSIEH et al., 2006). Por outro lado, as células Tregs adaptativas (que incluem as Th3 e Tr1) podem ou não expressar o FoxP3, são induzidas na periferia e produzem citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , que podem modular negativamente a reposta imune (VIEIRA et al., 2004; TANG & BLUESTONE, 2006).

Atualmente, as células dendríticas também estão sendo implicadas na transmissão de sinais regulatórios direcionando as células T para um perfil de tolerância. A ligação dos TCR aos peptídeos derivados do patógeno, apresentado por moléculas do MHC de classe II presentes na superfície das DCs, caracteriza o 1º sinal da apresentação antigênica, mas o início da imunidade protetora também requer a expressão de moléculas co-estimulatórias pelas células T. Na ausência dessa expressão (2º sinal) as células Th tornam-se anérgicas e podem originar as células Tregs adaptativas (KAPSENBERG, 2003). Trabalhos ainda mais recentes, estão identificando DCs capazes de estimular a diferenciação de células T CD4+ produtoras de IL-17, na presença de TGF- β 1 e da citocina pró-inflamatória IL-6 (VELDHOEN et al., 2006). O papel desse novo subtipo de células T efetoras, denominado Th17, na defesa do hospedeiro ainda está começando a ser determinado, mas até o momento a maioria dos estudos está se concentrando no seu potencial destrutivo nas doenças auto-imunes. Também tem sido observada a participação significativa da IL-23 como indutora do desenvolvimento das Th17 em inflamações auto-imunes (WEAVER et al., 2006; STOCKINGER & VELDHOEN, 2007).

Um perfil característico de células regulatórias do tipo Th3, produtoras de IL-10/TGF- β (McGUIRK & MILLS, 2002) foi encontrado em resposta à injeção de ovos de *S. mansoni* (SEWELL et al., 2003). McKEE e PEARCE (2004) relataram que a supressão da resposta Th1 em camundongos esquistossomóticos está relacionada com a produção de IL-10, por ambas populações de células TCD4+, que diferem entre si na expressão da molécula CD25. As células CD4+CD25- são as tradicionais células Th2, que além da IL-10 produzem também IL-5, IL-6 e IL-13, já as CD4+CD25+, são as Tregs naturais (FoxP3+) e produzem exclusivamente IL-10 que pode inibir a produção de IL-12 pelas células dendríticas e parecem ser necessárias para manutenção da resposta Th2. É interessante notar que a essencial participação da IL-10, tendo como fonte de produção as células Tregs sob estímulo de

antígenos de ovos, não foi evidenciada (TAYLOR, MOHRS & PEARCE, 2006). Este dado sugere a participação de outros mecanismos para o controle da resposta Th1 e Th2 pelas células Tregs no processo de imunomodulação presente na esquistossomose.

2.3 MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS HETERÓLOGOS

Como já mencionado, as helmintíases geram um perfil Th2 durante a evolução da resposta imune no hospedeiro, o qual está envolvido na proteção e cronicidade das infecções (FINKELMAN et al., 1991). Além disso, esse perfil Th2 vem sendo relacionado com a modulação da resposta imune a antígenos heterólogos. A infecção pelo *Ascaris lumbricoides* atenuou a severidade da malária cerebral em indivíduos coinfectados com o *Plasmodium falciparum* (NACHER et al., 2000). Pacientes infectados com *A. lumbricoides* e vacinados com toxina colérica recombinante apresentam, após tratamento com droga anti-helmíntica, um aumento na produção de IFN- γ e IL-2 (COOPER et al., 2001).

SOUZA e colaboradores (2002; 2004) estudando experimentalmente a imunização conjunta de extrato de *Ascaris suum* e ovalbumina demonstraram que os extratos solúveis obtidos de vermes adultos ou de ovos de *A. suum* apresentam propriedades imunossupressoras em relação à resposta imune específica a OVA. Ocorreu estímulo da resposta do tipo Th2 pelos extratos do verme, estando a citocina IL-10 envolvida na supressão dos parâmetros da resposta Th2 anti-OVA e atuando em conjunto com a IL-4 na supressão dos parâmetros da resposta Th1.

LIMA e colaboradores (2002), investigando a influência do extrato de *A. suum* no desenvolvimento da inflamação pulmonar eosinofílica em camundongos sensibilizados com OVA, observaram que o *A. suum* possui um potente efeito inibitório na inflamação pulmonar, demonstrado pela redução do número de eosinófilos nas vias aéreas e baixos níveis de IL-5,

IL-4 e eotaxina no lavado bronco-alveolar dos camundongos imunizados com o extrato e desafiados com OVA.

Trabalho de RESENDE CO e colaboradores (2006), estudou o impacto das infecções helmínticas intestinais na resposta imune específica para o *Mycobacterium tuberculosis* durante tuberculose ativa. Eles observaram que as células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com *Strongyloides stercoralis*, *A. lumbricoides* e/ou *Trichuris trichiura* e co-infectados com *M. tuberculosis* produziram baixos níveis de IFN- γ e alta quantidade de IL-10 em comparação às dos pacientes infectados apenas com o *M. tuberculosis*, e que este perfil predominante de citocinas Th2, pode favorecer a persistência da infecção pelo *M. tuberculosis*.

Na esquistossomose murina e humana, a imunomodulação a antígenos heterólogos observado em diferentes infecções parasitárias também se faz presente, onde se observa que o perfil imunossupressor gerado pelas infecções por *S. mansoni* se estende às respostas Th1 específicas para antígenos heterólogos virais ou bacterianos durante infecções concomitantes ou vacinações e às respostas Th2 específicas para os alérgenos.

No modelo de infecção murina com *Schistosoma mansoni*, o perfil Th2 estimulado no período de oviposição, modifica a resposta à mioglobina, com redução na produção de IL-2, IFN- γ e anticorpos IgG, e aumento na síntese de IL-4 (KULLBERG et al., 1992). ACTOR e colaboradores (1993; 1994) demonstraram a modulação da resposta imune a antígenos virais. Estes estudos relatam que em camundongos infectados com o *S. mansoni* e inoculados com o vírus da vaccinia expressando a glicoproteína 160 recombinante do HIV-1, a produção de IFN- γ e IL-2 em resposta à gp160 foi diminuída, assim como a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ contra células-alvo expressando gp160. Essa supressão foi acompanhada de um aumento da persistência viral durante a fase de deposição dos ovos. Trabalhos mais recentes demonstram que a gravidade da resposta Th1 na encefalomielite auto-imune

experimental, frente à administração de mielina básica, foi diminuída durante infecção e imunização com antígenos de *S. mansoni* (SEWELL et al., 2003; LA FLAMME, RUDDENKLAU & BACKSTROM, 2003). Em humanos, foi demonstrado que indivíduos infectados com *S. mansoni*, apresentam atenuação na resposta Th1 à vacinação com toxóide tetânico (SABIN et al., 1996).

Uma relação inversa entre as infecções esquistossomóticas e a presença de reações alérgicas também tem sido evidenciada. MEDEIROS e colaboradores (2003), analisando o curso da asma em pacientes infectados ou não pelo *S. mansoni*, observaram atenuação do quadro clínico nos pacientes asmáticos infectados. Trabalho de ARAÚJO e colaboradores (2004), também realizados em pacientes infectados pelo *S. mansoni* e com asma foi demonstrada uma produção menor de IL-5 e IL-4 e maior de IL-10 em resposta a *Dermatophagoides pteronyssinus*, quando comparada com a produção destas citocinas em pacientes asmáticos e não-parasitados. Em camundongos, SMITS e colaboradores (2007) analisaram a susceptibilidade de camundongos infectados pelo *S. mansoni* ao desenvolvimento de inflamação pulmonar alérgica e hiperresponsividade das vias aéreas em diferentes fases e intensidades da infecção, eles observaram que o efeito protetor da esquistossomose na asma alérgica, em resposta à OVA, foi observado durante a fase crônica da infecção e foi dependente da IL-10.

2.4 A RELAÇÃO MATERNO-FETAL E A IMUNOMODULAÇÃO

O fenômeno de imunomodulação induzido durante a gestação, onde ocorre a convivência do sistema imune materno com aloantígenos de origem paterna presentes no feto sem desencadear uma rejeição imunológica, tem despertado interesse de muito pesquisadores (VON RANGO, 2008).

Tem sido observado que citocinas de resposta Th2 e Th3 (IL-10, IL-4 e TGF- β) são predominantes e estão relacionadas com prevenção de aborto. Contudo, o IFN- γ produzido por células “natural killers” (NK) uterinas é requerido no processo inicial de vascularização do útero necessário na fase de implantação (CHAOUAT, 2003). Na interface útero-placenta é encontrado um ambiente potencialmente imunossupressor, com presença de macrófagos inibitórios, células dendríticas imaturas e células T regulatórias (LAGADARI et al., 2004; BLOIS et al., 2004; HEIKKINEN et al., 2004), o qual pode ser mantido no recém-nascido (TAYLOR & BRYSON, 1985; TASKER & MARSHALL-CLARKE, 1997).

A placenta é o órgão que está interposto entre a circulação materna e a fetal, e desempenha papel central em todas as discussões relacionadas às infecções intra-uterinas. Apesar da resposta imune durante a gestação apresentar um perfil predominantemente supressor por uma variedade de fatores, sabe-se que a origem e o desenvolvimento da imunocompetência se desenvolvem muito cedo na embriogênese fazendo com que o feto *in utero* apresente habilidade para montar uma resposta ativa contra antígenos maternos, ou até mesmo contra certos organismos patogênicos que conseguem ultrapassar a barreira placentária. A transferência passiva de anticorpos maternos específicos para os antígenos parasitários também ajuda na proteção fetal (LOKE, 1982).

Em áreas onde a esquistossomose é endêmica, é comum observar gestantes cronicamente infectadas pelo *S. mansoni*. Já é sabido que pode ocorrer transferência de anticorpos maternos parasita-específicos, exposição aos antígenos de *S. mansoni* ou, mais raramente, migração de parasitas inteiros através da placenta que sensibilizam o feto *in utero* (LOKE, 1982; WILLINGHAM III et al., 1999; EL TEMSAHI & EL GOHARI, 1999). ATTALLAH e colaboradores (2003), corroboraram estes achados ao detectarem o antígeno 63-kD (identificado em diferentes fases do ciclo do *S. mansoni*) por Western blotting no soro e cordão umbilical de mães infectadas pelo *S. mansoni*, observaram também a presença desse

antígeno no leite materno e demonstraram a influência da amamentação para manutenção dos níveis do antígeno.

Com relação à amamentação, muitas infecções são prevenidas no recém-nascido através dos fatores de defesa presentes no leite materno, principalmente a IgA secretória produzida por linfócitos que migram do intestino materno para as glândulas mamárias, e é por essa razão que a amamentação proporciona ao lactente proteção eficiente contra septicemia, bem como outras graves infecções cujos patógenos têm a mucosa como porta de entrada (HANSON & KOROTKOVA, 2002; BRANDTZAEG, 2003; VAN de PERRE, 2003). Por outro lado, a amamentação também pode se tornar uma via de transmissão de alguns importantes patógenos que podem resultar em doença no recém-nascido. Mães infectadas pelo HIV sem tratamento antirretroviral podem contaminar de 5-20% dos lactentes e este risco aumenta com o aumento da duração da amamentação (WHO, 2007). Filhos de mães infectadas pela bactéria *Helicobacter pylori* durante a amamentação não só deixam de ser protegidos contra a infecção, como apresentam aumento na prevalência do *H. pylori*, principalmente crianças amamentadas por mais de 6 meses (ROTHENBACHER, BODE & BRENNER, 2002; RODRIGUES et al., 2006). Com relação às infecções parasitárias maternas, há apenas um relato de possível transmissão de toxoplasmose aguda através da amamentação (JONES, 2001). Sendo assim, parece não ocorrer risco de infecções para o lactente, apesar da passagem de antígenos maternos via leite induzir geração de resposta imunológica no recém-nascido.

Muitos trabalhos já demonstraram que a exposição tanto aos anticorpos anti-*Schistosoma* (LENZI et al., 1987) quanto aos antígenos do parasita (HANG et al., 1974; CAMUS et al., 1976; TACHON & BOROJEVIC, 1978) durante o período pré-natal ou durante a amamentação, provocaram alterações na resposta imune do recém-nascido tanto para antígenos homólogos como para heterólogos.

Com relação aos antígenos homólogos, existem estudos onde foram vistas reações exacerbadas antígeno-específicas. CAMUS e colaboradores (1976), estudando humanos, demonstraram que crianças não-infectadas nascidas de mães infectadas pelo *S. mansoni* apresentaram maior sensibilização ao antígeno de *Schistosoma*, com 48,1% delas reagindo positivamente ao teste de reação intradérmica, quando comparadas às crianças nascidas de mães não-infectadas (7,5%). TACHON & BOROJEVIC (1978) encontraram aumento da reatividade cutânea imediata e, principalmente, tardia a antígenos de *S. mansoni* em crianças nascidas de mães esquistossomóticas. Encontraram também, 40% das crianças nascidas das mães infectadas com resultado positivo no teste de inibição de migração de macrófagos na presença de antígenos de *S. mansoni* quando utilizadas células do cordão umbilical. Todos os testes foram negativos nos recém-nascidos de mães não-infectadas.

Posteriormente, LENZI e colaboradores (1987) estudando camundongos recém-nascidos e lactentes de mães infectadas pelo *S. mansoni*, observaram transferência de anticorpos contra antígenos de cercárias, de ovos e de vermes adultos, através da placenta e pelo leite, além de uma diminuição da reação granulomatosa hepática quando comparados a camundongos nascidos de mães não-infectadas, indicando uma hiporresponsividade aos ovos do *Schistosoma*. Trabalho mais recente de ATTALLAH e colaboradores (2006) também demonstraram que a exposição pré-natal dos recém-nascidos aos antígenos ou anticorpos anti-*S. mansoni* pode atenuar a patogênese da esquistossomose numa infecção subsequente. Eles observaram a persistência de anticorpos e/ou antígenos maternos nos filhos de mães infectadas por até 8 semanas após o parto, com altos níveis de IgG nos recém-nascidos com 1 semana de nascimento, que foram decaindo gradualmente até a 8ª semana e presença de antígenos maternos nos tecidos hepático e renais dos filhos. Após 8 semanas, os filhotes foram infectados e foi observado que os níveis de IgG, tamanho e número de granulomas

hepáticos, bem como recuperação de vermes foram significativamente reduzidos nos animais nascidos de mães infectadas quando comparados aos nascidos de mães não-infectadas.

Por outro lado, MALHOTRA e colaboradores (1997), estudando a produção de IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 em resposta aos antígenos de *S. haematobium* pelos linfócitos do cordão umbilical e comparando com as células mononucleares do sangue periférico materno, demonstraram que os fetos humanos produzem padrões de citocinas similares aos produzidos pelos adultos, sugerindo que a exposição pré-natal não conduz a uma tolerância nem altera a imunidade fetal.

A influência do perfil imunológico estabelecido durante a gravidez na imunidade do recém-nascido a um antígeno heterólogo também vem sendo estudado em diferentes modelos experimentais (HERZ et al., 2000). Tem sido demonstrado que exposições a alérgenos, processos infecciosos ou citocinas nas mães podem alterar o grau de competência imune dos seus descendentes.

Observando à influência da interação materno/fetal no desenvolvimento da asma murina no modelo de sensibilização à OVA, LIMA e colaboradores (2005) relatam que recém-nascidos de mães tratadas com IFN- γ durante a gravidez apresentam na vida adulta uma proteção contra provocações alérgicas, com baixos níveis de IL-4 e alta produção de IFN- γ pelas células esplênicas, bem como baixa produção plasmática de IgE e IgG1 anafilática anti-OVA (LIMA et al., 2005). Mais recentemente, FUSARO e colaboradores (2007) estudaram o potencial imunomodulatório da imunização materna com OVA num período anterior a concepção e observaram a resposta alérgica desenvolvida pelos recém-nascidos sobre o efeito de uma exposição alérgica durante a gestação ou amamentação. Eles sugerem que a pré-imunização materna apresenta um notável efeito inibitório podendo ser considerada uma estratégia preventiva de respostas alérgicas nos filhotes destas mães.

Com relação à resposta dos recém-nascidos aos antígenos heterólogos após exposição *in utero* às infecções helmínticas maternas, os estudos ainda são poucos. MALHOTRA e colaboradores (1999) estudaram as alterações provocadas na resposta imune do recém-nascido a um antígeno heterólogo e demonstraram que a infecção materna pelo *S. haematobium* ou *Wuchereria bancrofti* durante a gravidez sensibiliza aproximadamente 50% dos recém-nascidos *in utero*, e que esta imunidade pré-natal persiste na criança influenciando sua resposta imune celular ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin) diminuindo a eficácia da vacinação.

No presente trabalho, nos propusemos estudar a inter-relação “esquistossomose-gravidez”, através da análise da imunidade celular e humoral de camundongos nascidos ou amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*, a partir da determinação do perfil de resposta imunológica produzido por estes filhotes ou lactentes a um antígeno heterólogo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de resposta imune celular e humoral à ovalbumina, produzido por camundongos filhos ou apenas lactentes de mães esquistossomóticas; assim como, nos filhotes nascidos e amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar os resultados obtidos nos filhotes, apenas lactentes ou filhotes nascidos e amamentados em camundongos fêmeas infectados pelo *S. mansoni*, com os resultados produzidos pelos filhotes e lactentes de mães não-infectadas. Utilizando os seguintes parâmetros:

- ❖ Cinética das reações de hipersensibilidade imediata e tardia à ovalbumina no coxim plantar;
- ❖ Níveis plasmáticos das imunoglobulinas IgG2a e IgG1, específicos para a OVA;
- ❖ Produção de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10) pelas células esplênicas, em resposta a estímulos *in vitro* com um antígeno heterólogo não-relacionado ao verme (Ovalbumina - OVA) e o mitógeno Concanavalina A (Con-A).

4 ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

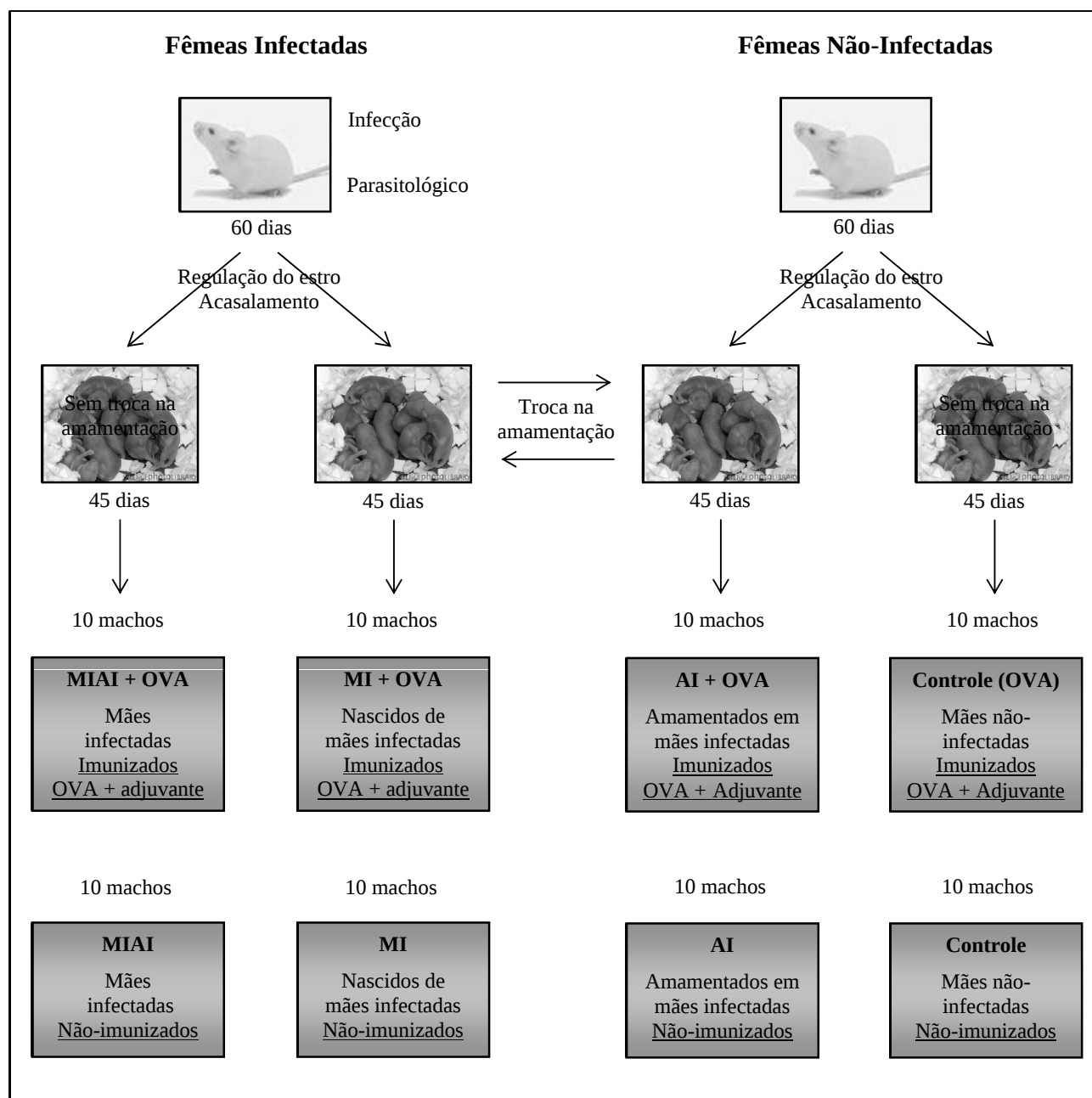
Foi realizado um estudo experimental, com características de um estudo de intervenção. Um grupo de camundongos fêmeas sofreu a intervenção (infecção com cercárias de *S. mansoni*) e o outro grupo serviu para termos de comparação dos resultados. Os filhotes nascidos de ambos os grupos tiveram seu perfil de resposta imune à OVA (antígeno heterólogo) determinado. Os animais foram escolhidos de forma não aleatória, e devido ao processo utilizado, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção avaliada. Como vantagens do estudo, além das condições controladas de observação, tivemos a facilidade de realização uma vez que o mesmo foi desenvolvido em animais experimentais, que apresentam respostas semelhantes aos humanos em relação à esquistossomose e neste modelo animal as dificuldades de realização por questões éticas são menores. Contudo, não se pode afirmar que os resultados obtidos sejam reprodutíveis no homem.

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster*, fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Para a infecção dos camundongos, foram utilizadas cercárias de *S. mansoni*, da cepa São Lourenço da Mata (SLM), obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos no Moluscário do Departamento de Parasitologia (UFPE) pela equipe do Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

4.3 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Foram utilizados 30 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster* com 4 semanas de idade. Destes, 10 fêmeas foram infectadas por via cutânea com 20 cercárias da cepa SLM de *S. mansoni* e monitoradas no 45º dia para confirmação da infecção, através de exames parasitológicos de fezes. No 60º dia, ocorreu sincronização dos estros e acasalamento. Paralelamente, outras 10 fêmeas não-infectadas também tiveram seus estros regulados e acasalaram. Os filhotes destes dois grupos de fêmeas tiveram suas mães trocadas. Assim, filhotes de mães infectadas mamaram nas mães não-infectadas (MI) e filhotes de mães não-infectadas foram amamentados pelas mães infectadas (AI). Após 45 dias, os filhotes machos foram selecionados para formação dos seguintes grupos experimentais e seus controles compostos por 10 animais: Grupo 1 (MI+OVA): animais nascidos de mães infectadas (MI) e imunizados com OVA + adjuvante completo de Freund; Grupo 2 (MI): animais MI e não-imunizados; Grupo 3 (AI+OVA): animais apenas amamentados em mães infectadas (AI) e imunizados com OVA + adjuvante; Grupo 4 (AI): animais AI e não-imunizados. Também utilizamos filhotes nascidos e amamentados em 5 fêmeas infectadas pelo *S. mansoni* (MIAI) e foram formados mais dois grupos: Grupo 5 (MIAI+OVA): dez animais nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI) e imunizados com OVA + adjuvante; Grupo 6 (MIAI): dez animais MIAI e não-imunizados. Como grupo controle, utilizamos filhotes nascidos e amamentados em 5 fêmeas não-infectadas, resultando na formação dos seguintes grupos: Grupo 7 (Controle OVA): dez animais nascidos e amamentados em mães não-infectadas e imunizados com OVA + adjuvante; Grupo 8 (Controle): dez animais nascidos e amamentados em mães não-infectadas e não-imunizados. Todo procedimento foi repetido três vezes, para avaliação da reprodutibilidade dos resultados.



Esquema 1. Formação dos grupos de estudo.

4.4 CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

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

como controle. Os camundongos estudados foram os filhotes de mães infectadas ou não com cercárias da cepa SLM de *Schistosoma mansoni*. A infecção foi determinada pela presença de ovos de *S. mansoni* nos exames parasitológicos de fezes.

4.4.2. Variável dependente: a variável dependente foi o perfil de resposta imunológica produzido pelos grupos estudados após estimulação com a OVA. O perfil produzido pelos filhotes de mães infectadas, pelos filhotes amamentados em mães infectadas, ou pelos filhotes nascidos e amamentados em mães infectadas foi comparado ao perfil produzido pelos filhotes nascidos e amamentados em mães não-infectadas, e foi considerado alterado se este perfil apresentou uma resposta imunológica significativamente diferente. Para comparação, utilizamos os seguintes parâmetros: reações de hipersensibilidade (RH) imediata e tardia, produção de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10) e dosagem dos isótipos IgG1 e IgG2a.

4.5 PARASITOLÓGICO DE FEZES

Após 45 dias de infecção, os camundongos fêmeas infectados foram expostos individualmente para obtenção do material fecal. Foram confeccionadas 3 lâminas parasitológicas por camundongo pelo método de Kato-Katz (KATZ, CHAVES & PELLEGRINO, 1972) para determinação da infecção e quantificação do número de ovos por grama de fezes.

4.6 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E ACASALAMENTO

Após 60 dias de infecção, as 15 fêmeas infectadas tiveram seus estros sincronizados

(FOWLER & EDWARDS, 1957; WANG et al., 2001) com a administração de hormônios. No primeiro dia foi administrado 5UI (100 μ L) de eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) e no terceiro dia 5UI (100 μ L) de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana), posteriormente as fêmeas foram acasaladas individualmente com um único macho e foi observada a formação do “plug” vaginal para confirmação do acasalamento. O mesmo procedimento foi realizado nas 15 fêmeas não-infectadas.

4.7 IMUNIZAÇÃO

Os filhotes machos dos grupos 1, 3, 5 e 7 foram imunizados no 45º dia de nascimento. Para a imunização foi injetado na base da cauda (via subcutânea) 100 μ g/camundongo de ovalbumina (OVA) 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), num volume total de 0,1mL.

4.8 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE (RH)

Para o desafio antigênico nas reações de hipersensibilidade foi utilizada ovalbumina (OVA) 2 vezes cristalizada (Sigma Chemical, St. Louis, Mo, USA). A OVA foi diluída em 2,5mL de solução salina e incubada por 1 hora em banho-maria a 80°C, com agitação de 15 em 15 minutos. Após esse período, foram adicionados 7mL de solução salina e a suspensão homogeneizada cuidadosamente com uma pipeta Pasteur. Foi realizada centrifugação a 3.000rpm por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e a OVA agregada ressuspensa em 2mL de solução salina. Para o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade à OVA, os animais foram desafiados no 8º dia após a imunização, no coxim plantar, com 30 μ L de

OVA agregada (600µg/animal). Foram inoculados também 30µL da salina na pata contralateral. Animais não-imunizados (grupos 2, 4, 6 e 8) foram injetados da mesma forma, para controle da reação inflamatória inespecífica. A espessura da pata foi medida com espessímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan), entre 3 - 24 horas e os resultados foram expressos pela diferença entre as medidas das duas patas.

4.9 SANGRIA TOTAL POR PUNÇÃO CARDÍACA

Os animais foram sangrados no 9º dia após a imunização, por punção cardíaca, após anestesia. O sangue foi coletado com seringa de 1mL heparinizada. O volume de 0,5mL de sangue, colhido de cada animal, foi diluído em 1mL de PBS e centrifugado a 1.500rpm por 3 minutos. Os plasmas (diluição final 1:3) foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem dos isótipos dos anticorpos (IgG1 e IgG2a).

4.10 CULTURA CELULAR PARA DOSAGEM DE CITOCINAS

Os baços dos filhotes, nos diferentes grupos, foram retirados após 9 dias de imunização. As suspensões de células esplênicas de cada animal foram obtidas assepticamente por maceração do órgão em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) complementado com HEPES (10mM), 2-mercaptoetanol (0,05mM), 216mg de L-glutamina e antibiótico gentamicina 50mg/L. Após centrifugação (1.500rpm por 10min. / 4°C), as hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 18 segundos (1mL/baço). As células foram ressuspensas em meio RPMI complementado e mantidas no gelo por 5 min. para deposição dos grumos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, foi realizada uma nova centrifugação (1.500rpm por 10min. / 4°C) e o

precipitado foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA). A contagem das células e o teste de viabilidade foram realizados como o auxílio de câmara de Neubauer e Azul de Trypan a 10%. As células ressuspensionadas foram cultivadas numa concentração de 10^7 células viáveis/poço (24h) e 6×10^6 células viáveis/poço (72h), em duplicata, em placas de 24 poços (Costar Cambridge, MA, USA) e submetidas a diferentes estímulos (OVA - 500µg/mL, Con-A - 5µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ 5%, e após 24h e 72h foram coletados os sobrenadantes e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção das citocinas IL-2 e IL-4 (24h), IFN-γ e IL-10 (72h).

4.11 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IFN-γ e IL-10 no sobrenadante das células esplênicas foram determinados por ELISA sanduíche. Placas de ELISA (Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com os primeiros anticorpos de captura [anti-IL-2 (JES6-IA12 a 4µg/mL) e anti-IL-4 (11B11 a 4µg/mL), diluídos em tampão salina fosfato (PBS 0,01M/ pH 7,2), anti-IFN-γ (XMG 1.2 a 4µg/mL) e anti-IL-10 (C252-2A5 a 8µg/mL), diluídos em tampão carbonato (pH 9,6)] sendo distribuídos 50µL em cada poço da placa e incubadas “overnight” a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (tampão salina fosfato com 0,05% de Tween-20) e bloqueadas por 30 min. à temperatura ambiente com 150µL de PBS-T com 10% de SBF. Após esse período, as placas foram novamente lavadas 3x com PBS-T e, em seguida, adicionados 50µL dos respectivos padrões recombinantes de camundongos: rIL-2, rIL-4, rIFN-γ e rIL-10 ou das amostras, em duplicata, nas diluições adequadas em meio RPMI 1640 com 5% de SBF. As placas foram incubadas “overnight” a 4°C, posteriormente foram lavadas com PBS-T e 50µL dos segundos anticorpos

biotinilados [anti-IL-2 (JES6-5H4 a 2µg/mL), anti-IL-4 (BVD6.24G2 a 1µg/mL), anti-IFN-γ (AN18 a 2µg/mL) e anti-IL-10 (SXC-1 a 2µg/mL)], diluídos em PBS-T + 0,1% de BSA, foram adicionados, seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBS-T e o conjugado enzimático diluído 1/6000 (estreptoavidina marcada com peroxidase - Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em PBS-T + 0,1% de BSA foi adicionado às placas (75µL/poço) e estas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas mais três vezes e reveladas pela adição do substrato contendo H₂O₂ 30% e o cromógeno 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato fosfato de sódio (pH 5,5). A reação foi parada com ácido cítrico 0,2M (50µL/poço) e a leitura realizada em leitor de ELISA (OD₄₀₅). As quantidades de citocinas nos sobrenadantes serão calculadas com base nas curvas-padrão, obtidas com concentrações de 0,3125 a 10ng/mL (rIL-2, rIL-4 e rIL-10) ou de 1,25 a 20 ng/mL (rIFN-γ).

4.12 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS

O plasma dos animais foi analisado individualmente por ELISA específico para IgG1 e IgG2a de camundongos. Placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas "overnight" a 4°C com 20 µg/mL de OVA, diluídos em PBS 0,01M/ pH 7,2 (100µL/poço). As placas foram lavadas três vezes com PBS-T (tampão de lavagem) e os poços foram então bloqueados com 200µL/poço de PBS-T contendo 3% de leite por 3h a 37°C. As placas foram lavadas com PBS-T e 200µL dos plasmas diluídos na razão 1:256 (IgG1) e 1:8 (IgG2a), em PBS-T com 0,5% de leite, foram adicionados a cada poço (diluição seriada). As placas foram incubadas por 1h a 37°C, após esse período foram novamente lavadas (3x), e 100µL de anticorpos de cabra específicos para IgG1 (1/1.000) ou anti-mouse

IgG2a (1/250) conjugadas à biotina (Southern Biotechnology Associates, Inc, AL, USA) foi adicionado a cada poço, com posterior incubação de 1h a 37°C. As placas passaram por um novo ciclo de lavagens com PBS-T. Um conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase na diluição 1/6.000 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) foi acrescentado (100µL/poço) e as placas reincubadas por 1h a 37°C. Foram novamente lavadas e 100µL/poço do substrato contendo 10mg de cromógeno OPD (Ortho-phenyldiamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA), 10mL de tampão citrato 0,1M / pH 5,5 e 10µL de água oxigenada 30% foi adicionado a cada poço. Dez minutos depois, a reação foi parada pela adição de 100µL de ácido cítrico 0,2M e as placas foram lidas no leitor de ELISA (OD₄₅₀).

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os animais utilizados nesse estudo são heterogêneos. Deste modo, para os resultados dos testes de RH e das imunoglobulinas os grupos foram comparados utilizando-se testes não-paramétricos, primeiro foi realizado o teste de Wilcoxon dupla-entrada (tratamento x tempo) e Kruskal-Wallis, respectivamente, e nos casos em que esta análise se mostrou significativamente diferente ($p < 0,05$), 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 uma análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos, uma vez que para a realização da cultura celular e dosagens das citocinas foram formados subgrupos em cada grupo de estudo. Nos casos em que esta análise se mostrou significativamente diferente ($p < 0,05$), procedeu-se a comparação múltipla segundo o método de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Nos testes estatísticos foram considerados significativos valores

de $p < 0.05$. O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 3.02.

4.14 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco - CEEA/UFPE (Processo nº 008554/2007-51) e encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA/UFPE.

**ESQUISTOSSOMOSE MATERNA AFETA A RESPOSTA IMUNE
ANTI-OVA DOS DESCENDENTES**

**MATERNAL SCHISTOSOMIASIS AFFECT PROGENY
ANTI-OVA IMMUNE RESPONSE**

Patrícia d'Emery Alves Santos¹

Valdênia Maria Oliveira de Souza¹

Iana Rafaela Fernandes Sales¹

Giuliana Viegas Schirato²

Elizabeth Malagueño de Santana^{1*}

¹Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo
Asami, Universidade Federal de Pernambuco - LIKA/UFPE -
Brasil.

²Biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz - CPqAM/Fiocruz - Brasil.

*Endereço para correspondência:

Elizabeth Malagueño de Santana

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

Tel.: + 55 81 2101 2515; Fax: + 55 81 2126 8485. E-mail: malagueno@nlink.com.br.

Abstract

Schistosoma mansoni induces immunosuppression against homologous and heterologous antigens in the host. In endemic areas for schistosomiasis, chronically infected pregnant women are usual. Currently, schistosomes infect near 40 million women of childbearing age. Neonatal exposure to parasite antigens *in utero* may interfere in the fetal immunity and affect subsequent responses to homologous antigens. Here, we investigated if exposure to maternal *S. mansoni* infection could influence the offspring immune responses to heterologous antigen, ovalbumin (OVA). Adult mice born and/or suckled in *S. mansoni*-infected mothers were studied. Three experimental groups were formed: mice born (BIM) or suckled (SIM) or born and suckled (BSIM) in infected mothers and one control group: born and suckled mice in non-infected mothers. These mice were immunized by subcutaneous injection with OVA in adjuvant. On 8th day, they were challenged with aggregated OVA in the footpad for hypersensitivity reactions and plasma anti-OVA IgG1 and IgG2a antibodies analyses. Spleen cell were cultured for measuring IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 cytokines contents in the supernatants. Comparing to control, anti-OVA humoral and cellular immune response were increased in BSIM mice, whereas in the SIM mice only the anti-OVA antibody production was remarkably higher. In both the groups an increment in IL-2 production was observed. In contrast, greater IL-10 synthesis was obtained in the BIM group and no nursing. In spite of this, the anti-OVA immune response was not widely impaired in this group. Hence, offspring from *Schistosoma*-infected mothers may have altered their immune response to unrelated antigen in the adult life, acquiring a suppressive potential during the prenatal stage and improvement of immune system through nursing. These results highlight the importance of breastfeeding.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; Immunomodulation; Pregnancy; Offspring; Breastfeeding; OVA.

1. Introdução

Atualmente, todas as espécies de *Schistosoma* infectam aproximadamente 40 milhões de mulheres em idade fértil no mundo, e dados da Organização Mundial de Saúde (“World Health Organization” - WHO) indicam que, só na África, anualmente 10 milhões têm a esquistossomose durante a gestação (Friedman et al., 2007). No Brasil, a esquistossomose é produzida exclusivamente pela espécie *S. mansoni* (Neves et al., 2005), e Pernambuco está entre os estados que exibem uma das mais altas prevalências de pessoas infectadas (Barbosa et al., 2006).

Foi demonstrado que camundongos infectados com *S. mansoni* secretam citocinas Th1 antes da postura dos ovos, e após a oviposição desenvolvem uma forte e predominante resposta Th2 devido à presença dos antígenos dos ovos (Pearce et al., 1991; Grzych et al., 1991). A IL-10 produzida principalmente pelos clones Th2 foi associada à supressão da resposta Th1 (Flores Villanueva et al., 1993). Atualmente, a produção de IL-10 não está sendo relacionada apenas às células Th2, mas também às células T regulatórias naturais (FoxP3+) específicas para antígenos de ovos (McKee and Pearce, 2004). É interessante notar que a essencial participação da IL-10, produzida pelas Tregs, não vem sendo evidenciada na regulação das respostas Th (Taylor et al., 2006). Este dado sugere a participação de outros mecanismos para o controle da resposta Th1 e Th2 pelas células Tregs no processo de imunomodulação presente na esquistossomose.

Na esquistossomose murina e humana, esse perfil Th2 também vem sendo relacionado com a modulação da resposta imune a antígenos heterólogos. Observa-se que o perfil imunossupressor gerado pela infecção esquistossomótica se estende às respostas Th1 específicas para antígenos heterólogos virais ou bacterianos durante infecções concomitantes ou vacinações assim como às respostas Th2 específicas para os alérgenos (Kullberg et al., 1992; Actor et al., 1993; 1994; Sabin et al., 1996; Sewell et al., 2003; La Flamme et al., 2003; Smits et al., 2007).

Já é bem conhecida a transferência de anticorpos maternos parasita-específicos (Lenzi et al., 1987) e antígenos de *S. mansoni* (Hassan et al., 1997; Attallah et al., 2003) através da placenta e

pelo leite. Diversos trabalhos já demonstraram que a exposição aos anticorpos anti-*Schistosoma* e aos antígenos do parasita, durante o período pré-natal ou a amamentação, provocam alterações na resposta imune dos descendentes para antígenos homólogos. Tem sido relatada uma resposta granulomatosa menor ou até ausente aos ovos de *S. mansoni* em camundongos nascidos de mães esquistossomóticas maciçamente infectadas (Hang et al., 1974; Lenzi et al., 1987; Attallah et al., 2006).

Com relação à resposta do recém-nascido aos antígenos heterólogos, ainda são poucos os estudos realizados. Trabalho desenvolvido com a espécie *S. haematobium* demonstra que a infecção materna pelo *S. haematobium* ou pelo *Wuchereria bancrofti* durante a gravidez sensibiliza aproximadamente 50% dos recém-nascidos *in utero*, e que esta imunidade pré-natal persiste na criança influenciando sua resposta imune celular ao BCG (Bacilo Calmette-Guérin) diminuindo a eficácia da vacinação (Malhotra et al., 1999).

No presente trabalho, nos propusemos estudar a inter-relação “esquistossomose-gravidez”, através da análise do perfil de resposta imunológica, a um antígeno não relacionado (ovalbumina), de camundongos em idade adulta que foram nascidos ou previamente amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*. Nossos resultados mostraram que os descendentes adquirem um potencial supressivo através da gestação e uma potencialização da resposta imune pela amamentação em mães esquistossomóticas.

2. Animais, materiais e métodos

2.1. Animais

Estudo realizado em camundongos da linhagem *Swiss Webster*, fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Camundongos fêmeas com 4 semanas foram infectados por via cutânea com 20 cercárias de *S. mansoni*, da cepa São Lourenço da Mata (SLM), obtidas de caramujos infectados da espécie *Biomphalaria glabrata*, mantidos pela equipe do

Setor de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Filhotes machos com 6 semanas foram utilizados para formação dos grupos de estudo. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA/UFPE).

2.2. Grupos de estudo

Camundongos fêmeas, 4 semanas de idade, foram infectados e monitorados no 45º dia pelo método de Kato-Katz ([Katz et al., 1972](#)) para determinação da infecção. No 60º dia, ocorreu sincronização dos estros e acasalamento. Paralelamente, outras fêmeas não-infectadas também tiveram seus estros regulados e acasalaram. Os filhotes tiveram suas mães trocadas. Assim, filhotes de mães infectadas mamaram em mães não-infectadas (MI) e filhotes de mães não-infectadas em mães infectadas (AI). Os filhotes machos, 6 semanas de idade, foram selecionados para formação dos seguintes grupos (n=10): Grupo 1 - MI+OVA: animais MI e imunizados com OVA + adjuvante completo de Freund; Grupo 2 - MI: animais MI e não-imunizados; Grupo 3 - AI+OVA: animais AI e imunizados; Grupo 4 - AI: animais AI e não-imunizados. Também agrupamos filhotes nascidos e amamentados em fêmeas infectadas pelo *S. mansoni* (MIAI): Grupo 5 - MIAI+OVA: animais MIAI e imunizados; Grupo 6 - MIAI: animais MIAI e não-imunizados. Como grupo controle, utilizamos filhotes nascidos e amamentados em fêmeas não-infectadas: Grupo 7 - Controle (OVA): animais nascidos e amamentados em mães não-infectadas e imunizados; Grupo 8 - Controle: animais não-imunizados. Todo procedimento foi repetido três vezes, para avaliação da reprodutibilidade dos resultados.

2.3. Sincronização do estro e acasalamento

Para sincronizar o estro, após 60 dias de infecção, foi administrado 5UI (100µL) do hormônio eCG (Gonadotrofina Coriônica Equina) às fêmeas. Dois dias depois, administrou-se 5UI (100µL) de hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) ([Fowler and Edwards, 1957](#); [Wang et al.,](#)

2001). Posteriormente, as fêmeas foram acasaladas individualmente e foi observada a formação do “plug” vaginal para confirmação do acasalamento. Mesmo procedimento realizado nas fêmeas não-infectadas.

2.4. *Imunização e desafio*

Filhotes machos dos grupos 1, 3, 5 e 7, com 6 semanas de idade, foram injetados subcutaneamente com OVA 5 vezes cristalizada 100µg/animal (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), na base da cauda (0,1mL/animal). No 8º dia, os animais foram desafiados, no coxim plantar, com 30µL de OVA 2% agregada (600µg/animal) para o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade à OVA. Com inoculação de 30µL da salina na pata contralateral. Animais não-imunizados (grupos 2, 4, 6 e 8) foram injetados da mesma forma, para controle da reação inflamatória inespecífica. A espessura da pata foi medida periodicamente com espessímetro Mitutoyo (Mitutoyo Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan), entre 3 - 24 horas e os resultados foram expressos pela mediana ± erro padrão da diferença entre as medidas das duas patas de cada grupo.

2.5. *Cultura celular e dosagem de citocinas*

Nove dias após a imunização, suspensões de células esplênicas dos animais nos diferentes grupos foram preparadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) suplementado com HEPES (10mM), 2-mercaptoetanol (0,05mM), 216mg de L-glutamina, gentamicina (50mg/L) e 5% de Soro Bovino Fetal - SBF (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA). As células foram cultivadas numa concentração de 10^7 (24h) e 6×10^6 (72h) células/mL, em duplicata, em placas de 24 poços (Costar Cambridge, MA, USA) e estimuladas com OVA (500µg/mL) ou Con-A (5µg/mL). Os sobrenadantes foram coletados após 24h e 72h e imediatamente congelados (-20°C) para posterior análise da produção das citocinas IL-2 e IL-4

(24h), IFN- γ e IL-10 (72h). As citocinas foram analisadas por ELISA sanduíche, utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: para IL-2, JES6-IA12 e JES6-5H4 biotinilado, para IL-4, 11B11 e BVD6.24G2 biotinilado, para IFN- γ , XMG 1.2 e AN18 biotinilado e para IL-10, C252-2A5 e SXC-1 biotinilado. Os anticorpos biotinilados foram detectados usando o conjugado enzimático estreptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) e a revelação foi realizada com ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenze-thiazoline-6-sulfonic acid) - Sigma) dissolvido em tampão citrato fosfato de sódio (pH 5,5) e H₂O₂ 30%. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (OD₄₀₅). As amostras foram quantificadas com base nas curvas-padrão dos recombinantes purificados (rIL-2, rIFN- γ , rIL-4 ou rIL-10).

2.6. Dosagem de imunoglobulinas

Animais anestesiados foram sangrados por punção cardíaca no 9º dia após a imunização. Os plasmas dos animais foram analisados individualmente por ELISA específico para IgG1 e IgG2a de camundongos, utilizando placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) sensibilizadas com OVA (20 μ g/mL) e anticorpos biotinilados de cabra anti-mouse IgG1 ou anti-mouse IgG2a (Southern Biotechninology Associates, Inc, AL, USA). Os anticorpos biotinilados foram detectados usando o conjugado enzimático estreptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) e a revelação foi realizada com OPD (Ortho-phenylenediamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvido em tampão citrato 0,1M (pH 5,5) e H₂O₂ 30%. As placas foram lidas no leitor de ELISA (OD₄₅₀). Diluições seriadas foram realizadas para cada amostra. Os resultados foram expressos pela a mediana $\pm$ erro padrão das absorbâncias dos plasmas de cada grupo numa diluição apropriada (dentro da parte linear na curva de titulação) para cada isótipo (1:8192 para IgG1 e 1:16 para IgG2a).

2.7. Análises estatísticas

Para os resultados dos testes de RH e das imunoglobulinas os grupos foram comparados utilizando-se o teste de Wilcoxon dupla-entrada (tratamento x tempo) e Kruskal-Wallis, respectivamente, e procedeu-se a comparação das médias utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Nos resultados das dosagens de citocinas, para comparação dos grupos utilizou-se o ANOVA e procedeu-se a comparação múltipla segundo o método de Tukey. Nos testes estatísticos foram considerados significativos valores de $p < 0.05$. O programa utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 3.02.

3. Resultados

*3.1. Efeito da infecção pelo *S. mansoni* em camundongos fêmeas nas reações de hipersensibilidade imediata e tardia anti-OVA dos seus descendentes*

Animais imunizados com OVA foram desafiados, oito dias depois, com OVA agregada na pata e as reações de hipersensibilidade imediata (3 e 6 horas) e tardia (24 horas) foram comparadas às reações de filhotes nascidos ou apenas amamentados em mães esquistossomóticas imunizados com OVA que receberam o mesmo desafio. Esta mesma análise foi realizada em filhotes nascidos e amamentados em mães infectadas.

Como ilustrado na figura 1, a reação de hipersensibilidade imediata, medida às 3 horas, esteve aumentada (~30%) nos filhotes nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* (MI+OVA) em relação ao grupo controle. Esta reação foi também maior no grupo de animais apenas amamentados (AI+OVA) e nos animais nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI+OVA), sendo este aumento mais potente neste primeiro grupo (50%). Com relação à reação imediata medida às 6 horas, no grupo MI+OVA observamos uma significativa diminuição, em contraste ao aumento significativo desta reação no grupo AI+OVA e um aumento nos animais do grupo MIAI+OVA. Nove horas após o desafio antigênico, notamos que a supressão da resposta anti-OVA foi mantida

no grupo de animais nascidos de mães infectadas, bem como o aumento da resposta anti-OVA nos animais que foram amamentados. A análise da reação de hipersensibilidade tardia anti-OVA, às 24 horas, nos mostra um aumento significativo desta reação no grupo de animais apenas nascidos de mães infectadas, assim como no grupo de animais nascido e amamentados. Não houve alteração da reação tardia no grupo de animais que só recebeu leite de mães infectadas.

(Figura 1)

Nenhum dos grupos não-imunizados apresentaram resposta inespecífica à OVA (dados não mostrados).

3.2. Esquistossomose materna altera a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA nos descendentes

Nove dias após a imunização, todos os grupos foram sangrados e os níveis de anticorpos no plasma foram medidos por ELISA. A produção de anticorpos IgG1 anti-OVA no grupo MI+OVA sofreu uma sutil diminuição em relação à dos filhotes que não sofreram contato prévio com antígenos parasitários (controle), frente à imunização com OVA (Fig. 2A). Por outro lado, um aumento (duas vezes) nos níveis de IgG1 anti-OVA pôde ser notado no grupo AI+OVA e no grupo MIAI+OVA.

A figura 2B mostra que a síntese dos anticorpos IgG2a anti-OVA foi modificada nos três grupos de estudo. Nos animais nascidos de mães infectadas níveis bem menores de anticorpos IgG2a anti-OVA foram detectados, em contraste ao aumento significativo de quatro e duas vezes na produção deste isótipo nos grupos AI+OVA e MIAI+OVA, respectivamente.

(Figura 2)

Em nenhum dos grupos não-imunizados ocorreu produção de IgG1 ou de IgG2a específica à OVA (dados não mostrados).

3.3. Altos níveis de IL-10 são produzidos por células esplênicas de descendentes nascidos de mães esquistossomóticas, em contraste a elevada produção de IL-2 nos descendentes apenas amamentados nestas mães

Células esplênicas dos animais dos grupos acima estudados foram cultivadas com OVA ou com Con-A por 24 ou 72 horas e os sobrenadantes coletados para quantificação das citocinas secretadas. A citocina IL-2 pôde ser mensurada apenas quando as células foram estimuladas com Con-A (Fig. 3A). Sob esta condição, uma notável síntese de IL-2 foi observada em ambos os grupos AI+OVA e MIAI+OVA, enquanto no grupo MI+OVA os níveis desta citocina foram semelhantes aos do grupo controle-OVA.

Com relação à síntese de IL-10, não houve produção desta citocina sob estímulo mitogênico. Entretanto, as células do grupo MI+OVA, quando re-estimuladas *in vitro* com OVA, secretaram altos níveis de IL-10, enquanto que esta citocina não foi detectada no sobrenadante das células do grupo AI+OVA e do controle-OVA (Fig. 3C). As células do grupo MIAI+OVA também secretaram IL-10, contudo em quantidade muito inferior quando comparada a produção de IL-10 do grupo MI+OVA.

Não houve diferença na quantidade de IFN- γ produzida pelos grupos de animais nascidos em relação ao grupo controle-OVA para ambos os estímulos de OVA e Con-A. Contudo, uma diminuição na síntese de IFN- γ foi verificada nos camundongos dos grupos AI+OVA e MIAI+OVA frente ao estímulo *in vitro* com OVA e Con-A, respectivamente (Fig. 3B).

(Figura 3)

As condições de cultura destes experimentos não renderam níveis detectáveis de IL-4 (<0.312 ng/mL) em nenhuma das amostras testadas.

4. Discussão

Em áreas endêmicas de esquistossomose, poucos indivíduos desenvolvem manifestações crônicas graves como a hepatoesplenomegalia (Bina and Prata, 2003). Uma alta prevalência de infecção pelas espécies de *Schistosoma* em mulheres em idade fértil (~ 40 milhões) e gestantes (10 milhões por ano só na África) vem sendo registrada (Friedman et al., 2007). Diferentes estudos vêm associando a infecção materna com a atenuação dos sintomas da esquistossomose em infecções pós-natal (Lenzi et al., 1987; Attallah et al., 2006). Aqui, neste estudo experimental, nós demonstramos que mães infectadas podem predispor imunologicamente seus descendentes a um perfil supressor a um antígeno heterólogo na vida adulta. Contudo, a amamentação em mães esquistossomóticas pode proporcionar uma melhor resposta imune a este antígeno, podendo, ainda, amenizar o potencial imunossupressivo adquirido durante a gestação.

Com a finalidade de mimetizar os aspectos parasitológicos e imunológicos da infecção pelo *S. mansoni* em áreas endêmicas, nos nossos experimentos, camundongos fêmeas foram infectados com baixa carga parasitária, e o acasalamento ocorreu durante a deposição dos ovos (60º dias da infecção), fase em que se inicia a imunomodulação estabelecida na esquistossomose (Pearce et al., 1991). Os grupos de animais descendentes nascidos ou amamentados em mães infectadas foram submetidos a um modelo de imunização com ovalbumina emulsificada em adjuvante, para ótima condição de ativação das células T, metodologia bem definida para avaliar a modulação induzida pelos helmintos na resposta imune a antígenos não-relacionados (Ferreira et al., 1995; Souza et al., 2004).

Nossos resultados demonstraram que animais nascidos de mães infectadas pelo *S. mansoni* produziram uma quantidade elevada de IL-10 em resposta a OVA, a qual não foi detectada no grupo controle. É sabido que um microambiente peculiar e imunossupressor está presente na interface útero-placenta a fim de evitar a resposta imune materna contra os antígenos paternos. Uma maior população de APCs encontradas na decídua (mucosa uterina) são macrófagos (CD14+), que

produzem espontaneamente IL-10 (Heikkinen et al., 2003). As DCs apresentam intracelularmente maiores quantidades de IL-10 do que IL-12 durante a maior parte da gestação (Blois et al., 2004) e 14% das células T CD4⁺ são células CD25⁺ (Tregs) que secretam fatores imunomodulatórios como IL-10 e TGF- β (Heikkinen et al., 2004). Tem sido postulado que a geração de linfócitos Treg, específicas para antígenos paternos, é realizada nos órgãos linfóides periféricos da mãe e é mantida durante a gestação pela liberação de antígenos paternos da placenta (Zenclussen et al., 2007). É possível que a presença desses altos níveis de IL-10 nos animais adultos, filhos de mães esquistossomóticas, esteja refletindo o efeito da presença de antígenos do *S. mansoni* nas células da barreira placentária e útero que acentuaria a presença de APCs facilitadoras da produção de IL-10. Realmente, produtos derivados do *Schistosoma* atuam sob as células dendríticas levando a um perfil DC2 (Thomas and Harn, 2004). Então, na presença da infecção este perfil de DCs pode ser sustentado por um período maior ao longo da vida adulta e induzir células T anti-OVA produtoras de IL-10.

Contudo, esta alta produção de IL-10, sugerindo um perfil supressor associado à gestação em mães infectadas, parece não afetar de forma intensa a resposta anti-OVA no nosso modelo de imunização. Foi notado que apenas a produção de anticorpos IgG2a anti-OVA é prejudicada, acompanhada de uma supressão da reação de hipersensibilidade imediata medida às 6 horas, enquanto houve uma sutil diminuição da produção de IgG1 anti-OVA. Em contraste, a quantidade das citocinas IL-2 e IFN- γ é mantida e ocorre um aumento da resposta imediata (3 horas) e tardia anti-OVA verificada *in vivo*. Essa ausência de efetiva supressão poderia estar relacionada com a baixa infecção sofrida pelas mães (apenas 20 cercárias). A hiporresponsividade imunológica pós-natal específica para antígenos homólogos, medida pela diminuição da resposta granulomatosa ao redor dos ovos de *S. mansoni* no fígado, só foi observada nos camundongos nascidos de mães altamente infectadas (Hang et al., 1974). Um outro ponto a ser destacado é a administração do antígeno heterólogo em ACF, o qual é um adjuvante altamente pró-inflamatório com alto poder facilitador da resposta imune (Stills, 2005). Entre suas funções está a indução da molécula co-

estimulatória CD28 (2º sinal de ativação para os linfócitos T), que nas APCs dos descendentes levaria a perda parcial da capacidade supressora destas células (adquirida durante a gravidez na presença de antígenos do parasita), permitindo a ativação e expansão de células T efectoras anti-OVA (Sakaguchi et al., 2001). Uma outra hipótese é a necessidade da geração/manutenção de células Tregs anti-*Schistosoma* nos descendentes, e a supressão seria um efeito parcialmente independente de IL-10. Para a manutenção de células Tregs a presença de antígenos parasitários é requerida (Sakaguchi, 2003), os quais estão ausentes nos descendentes (Attallah et al., 2006). Estudos recentes vêm demonstrando que a IL-10 não participa efetivamente da imunomodulação exercida pelas células Tregs geradas durante a infecção pelo *S. mansoni* (Taylor et al., 2006). Vem sendo proposto à necessidade de contato das Tregs, através de moléculas de membrana (CTLA-4; CD103), com as células T efectoras (Th1 ou Th2) para uma efetiva supressão (von Boehmer, 2005). Então, a falta na manutenção das células Tregs anti-*Schistosoma* poderia permitir a resposta efectora anti-OVA por nós observada.

De modo contrário, os animais descendentes de mães não-infectadas, mas que foram amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram uma potencialização da resposta imune efectora humoral anti-OVA, com aumento da reação de hipersensibilidade imediata (3 horas) e alta produção de IgG1 e IgG2a. Presença de IFN- γ , marcante aumento na produção de IL-2 e ausência da produção de IL-10 corroboram o perfil muito mais respondedor para OVA nestes animais.

No grupo AI+OVA, o recém-nascido entrou em contato com o antígeno de *S. mansoni* pelo leite materno e a resposta imune a estes antígenos foi gerada primeiramente através da mucosa intestinal. Nesse caso, a administração do antígeno parasitário por via oral pode gerar nestes filhotes um perfil tolerogênico ao antígeno de *S. mansoni* (Sadigursky et al., 1987). Alpan et al. (2001), já havia relatado a função das DCs dos linfonodos mesentéricos, e não dos LB ou das células M, na geração de resposta imune de mucosa. Atualmente, com a classificação fenotípica das DCs em camundongos, com base na expressão das moléculas de superfície CD8 α e CD11b, demonstrou-se que nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos, são encontradas DCs convencionais

CD11c^{high}CD11b+CD8α⁻, CD11c^{high}CD11b-CD8α⁺ e CD11c^{high}CD11b-CD8α⁻. Em adição, populações de DCs plasmocitóides CD11c^{int} também estão presentes nestes locais (Coombes and Maloy, 2007). Essas DCs plasmocitóides podem induzir a diferenciação de células Tregs (Tr1) que exibem propriedades supressoras e estão implicadas na manutenção da tolerância oral, embora essas DCs plasmocitóides estejam presentes no baço e nos linfonodos mesentéricos, só as DCs dos linfonodos mesentéricos (mas não as esplênicas) são capazes de diferenciar células T virgens em células Tregs (Tr1) com propriedades regulatórias (Bilsborough et al., 2003). As DCs intestinais que expressam a molécula CD103 também estão relacionadas com o desenvolvimento de células Tregs. As DCs CD103⁺, presentes no cólon e nos linfonodos mesentéricos, podem induzir células Tregs Foxp3⁺ antígeno-específicas através de mecanismos dependentes de TGF-β. Podendo representar uma geração local de regulação específica, por antígenos não timicamente expressos (Izcue and Powrie, 2008).

Os mecanismos de tolerância oral à determinada proteína podem levar à supressão da resposta imune a antígeno não-relacionado, quando este é administrado por via imunogênica concomitantemente com a proteína “tolerada” (Carvalho et al., 2002). A administração conjunta é crucial para que se observe este fenômeno denominado “efeito indireto”. Caso o antígeno não-relacionado seja administrado após longo período da indução da tolerância a hiporresponsividade heteróloga não ocorre (Carvalho et al., 1997). Portanto, em nossas condições experimentais, seria esperado obter resposta imune anti-OVA visto que foi administrada OVA na vida adulta e a tolerância exercida pelos antígenos parasitários foi estabelecida durante a amamentação na tenra infância. Porém, os nossos resultados demonstraram uma potencialização desta resposta anti-OVA. É possível que divergências nas condições experimentais expliquem este achado. Entre elas, a presença do leite, a mucosa do recém-nascido e características antigênicas do parasita.

Foi demonstrado que anticorpos maternos no leite facilitam a formação do repertório de células B no animal com sistema imune ainda imaturo (Malanchère et al., 1997), podendo aprimorar a produção de anticorpos anti-OVA. Contudo, a presença do antígeno do verme no leite também

parece interferir na produção de anticorpos anti-OVA, visto que filhotes que tiveram contato com leite de mães não-infectadas não produzem níveis de anticorpos tão altos quanto os das mães infectadas. É possível que no baço, compartimento linfóide ausente de TGF- β , as células do sistema imune imaturo do recém-nascido (em especial as DCs) na presença de antígenos do parasita, mantenham um perfil estimulador da resposta imune na vida adulta, marcado pela produção aumentada de IL-2 frente ao mitógeno nas células destes animais. Por outro lado, é importante mencionar que a potencialização da resposta imune humoral a antígenos heterólogos administrado após imunização com antígenos de helmintos é demonstrada independente do contexto de mucosa oral, recém-nascido ou amamentação (Barriga, 1984; Barriga and Ingalls, 1984). Este fato ressalta uma propriedade intrínseca dos antígenos dos helmintos em modular positivamente a resposta imune do hospedeiro a antígenos heterólogos quando administrado posteriormente no hospedeiro.

De modo interessante, ao analisarmos conjuntamente o efeito da gestação e amamentação em mães infectadas, nossos resultados demonstram um comportamento intermediário desse grupo, com produção de IFN- γ e altos níveis de IL-2 e IgG1 anti-OVA (semelhante ao grupo AI + OVA), porém com produção intermediária de IL-10 e de IgG2a. Estes dados confirmam o potencial da exposição *in utero* aos antígenos do *S. mansoni* na indução de IL-10 e a modulação positiva na resposta anti-OVA na vida adulta de descendentes que muito precocemente entraram em contato com antígenos parasitários durante a amamentação.

Em resumo, nossos achados mostram que mães esquistossomóticas afetam a resposta imune pós-natal a um antígeno não-relacionado e ressaltam a importância da amamentação em mães infectadas em estimular a resposta imune a este antígeno. Este fato pode ser relevante para rever a estratégia de vacinação ou predisposição às doenças relacionadas ao sistema imune (alergias ou autoimunidade) após o período de lactação em áreas endêmicas para *S. mansoni*.

Referências

- Actor, J.K., Shirai, M., Kullberg, M.C., Buller, R.M., Sher, A., Berzofsky, J.A., 1993. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (3), 948-952.
- Actor, J.K., Marshall, M.A., Eltoun, I.A., Buller, R.M., Berzofsky, J.A., Sher, A., 1994. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. *Eur. J. Immunol.* 24 (12), 3050-3056.
- Alpan, O., Rudomen, G., Matzinger, P., 2001. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in gut-oriented immune response. *J. Immunol.* 166, 4843-4852.
- Attallah, A.M., Ghanem, G.E., Ismail, H., El Waseef, A.M., 2003. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68 (6), 647-651.
- Attallah, A.M., Abbas, A.T., Dessouky, M.I., El-emshaty, H.M., Elsheikha, H.M., 2006. Susceptibility of neonate mice born to *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mothers to subsequent *S. mansoni* infection. *Parasitol. Res.* 99, 137-145.
- Barbosa, C.S., Favre, T.C., Wanderley, T.N., Callou, A.C., Pieri, O.S., 2006. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I), 55-62.
- Barriga, O.O., 1984. Immunomodulation by nematodes: a review. *Vet. Parasitol.* 14 (3-4), 299-320.
- Barriga, O.O., Ingalls, W.L., 1984. Potentiation of na IgE-like response to *Bordetella bronchiseptica* in pigs following *Ascaris suum* infection. *Vet. Parasitol.* 16 (3-4), 343-345.
- Bilsborough, J., George, T.C., Norment, A., Viney, J.L., 2003. Mucosal CD8 α ⁺ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108, 481-492.
- Bina, J.C., Prata, A., 2003. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi. I - *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (2), 211-216.
- Blois, S.M., Soto, C.D.A., Tometten, M., Klapp, B.F., Margni, R.A., Arck, P.C., 2004. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol. Reprod.* 70, 1018-1023.
- Carvalho, C.R., Verdolin, B.A., Vaz, N.M., 1997. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand. J. Immunol.* 45 (3), 276-281.
- Carvalho, C.R., Lenzi, H.L., Correa-Oliveira, R., Vaz, N.M., 2002. Indirect effects of oral tolerance to ovalbumin interfere with the immune responses triggered by *Schistosoma mansoni* eggs. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (10), 1195-1199.

- Coombes, J.L., Maloy, K.J., 2007. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Seminars Immunol.* 19, 116-126.
- Ferreira, A.P., Faquim, E.S., Abrahamsohn, I.A., Macedo, M.S, 1995. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. *Cell. Immunol.* 162 (2), 202-210.
- Flores Villanueva, P.O., Chikunguwo, S.M., Harris, T.S., Stadecker, M.J., 1993. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal t helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 151 (6), 3192-3198.
- Fowler, R.E., Edwards, R.G., 1957. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J. Endocrinol.* 15 (4), 374-384.
- Friedman, J.F., Mital, P., Kanzaria, H.K., Olds, G.R., Kurtis, J.D., 2007. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol.* 23 (4), 159-164.
- Grzych, J.M., Pearce, E., Cheever, A., Caulada, Z.A., Caspar, P., Heiny, S., Lewis, F., Sher, A., 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis *mansoni*. *J. Immunol.* 146 (4), 1322-1327.
- Hang, L.M., Boros, D.L., Warren, K.S., 1974. Induction of immunological hyporesponsiveness to granulomatous hypersensitivity in *Schistosoma mansoni* infection. *J. Infect. Dis.* 130 (5), 515-522.
- Hassan, M.M., Hassounah, O.A., Hegab, M., Salah, K., El-Mahrouky, L., Galal, N., 1997. Transmission of circulating schistosomal antigens from infected mothers to their newborns. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 27, 773-780.
- Heikkinen, J., Möttönen, M., Komi, J., Alanen, A., Lassila, O., 2003. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 498-505.
- Heikkinen, J., Möttönen, M., Alanen, A., Lassila, O., 2004. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 373-378.
- Izcue, A., Powrie, F., 2008. Special regulatory T-cell review: regulatory T cells and the intestinal tract - patrolling the frontier. *Immunology* 123, 6-10.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis *mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 14, 397-400.
- Kullberg, M.C., Pearce, E.J., Hieny, S.E., Sher, A., Berzofsky, J.A., 1992. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. *J. Immunol.* 148, 3264-3270.
- La Flamme A.C., Ruddenklau, K., Backstrom, B.T, 2003. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect. Immun.* 71, 4996-5004.
- Lenzi, J.A., Sobral, A.C., Araripe, Jr., Grimaldi Filho, G., Lenzi, H.L., 1987. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82 (4), 257-267.

- Malanchère, E., Huetz, F., Coutinho, A., 1997. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. *Eur. J. Immunol.* 27 (3), 788-793.
- Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J.H., Kazura, J.W., King, C.L., 1999. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. *J. Immunol.* 162, 6843-6848.
- Mckee, A.S., Pearce, E.J., 2004. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J. Immunol.* 173, 1224-1231.
- Neves, D.P., Melo, A.L., Linardi, P.M., Vitor, R.W.A., 2005. Parasitologia Humana. In: Melo, A.L., Coelho, P.M.Z., *Schistosoma mansoni* e a doença. Atheneu, São Paulo, 11^a ed., pp. 193-212.
- Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.M., Lewis, F.A., Sher, A., 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173, 159-166.
- Sabin, E.A., Araújo, M.I., Carvalho, E.M., Pearce, E.J., 1996. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.* 173, 269-272.
- Sadigursky, M., Falangola, M.F., Santos, R.O., Cardoso, S.A., David, J., 1987. Induced tolerance to schistosoma mansoni antigens modulates periovular granuloma. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82 (4), 269-271.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., Takahashi, T., 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Reviews* 182, 18-32.
- Sakaguchi, S., 2003. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nature Immunol.* 4 (1), 10-11.
- Sewell, D., Qing, Z., Reinke, E., Elliot, D., Weinstock, J., Sandor, M., Fabry, Z., 2003. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int. Immunol.* 15, 59-69.
- Smits, H.H., Hammad, H., van Nimwegen, M., Soullie, T., Willart, M.A., Lievers, E., Kadouch, J., Kool, M., Kos-van Oosterhoud, J., Deelder, A.M., Lambrecht, B.N., Yazdanbakhsh, M., 2007. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120 (4), 932-940.
- Souza, V.M.O., Jacysyn, J.F., Macedo, M.S., 2004. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. *Cytokine* 28, 92-100.
- Stills, H.F.J., 2005. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 46 (3), 280-293.

- Taylor, J.J., Mohrs, M., Pearce, E.J., 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J. Immunol.* 176 (10), 5839-5847.
- Thomas, P.G., Harn, D.A.J., 2004. Immune biasing by helminth glycans. *Cell. Microbiol.* 6 (1), 13-22.
- von Boehmer, H., 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunol.* 6 (4), 338-344.
- Wang, H., Herath, C.B., Xia, G., Watanabe, G., Taya, K., 2001. Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. *Reproduction* 122, 809-816.
- Zenclussen, A.C., Schumacher, A., Zenclussen, M.L., Wafula, P., Volk, H.D., 2007. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert Rev. Mol. Med.* 9 (10), 1-14.

Figuras

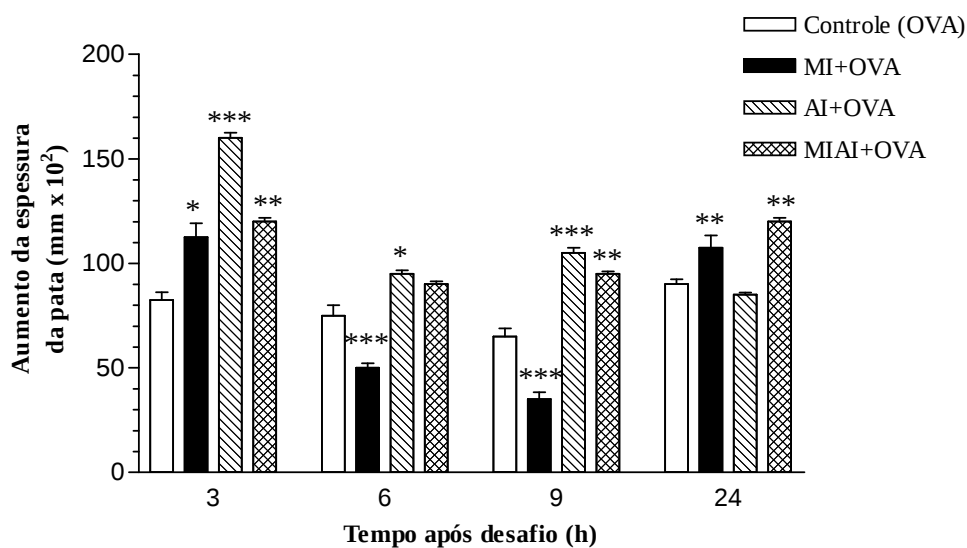


Figura 1. Reações de hipersensibilidade à OVA em camundongos *Swiss Webster*, filhos (MI), lactentes (AI) ou filhos e lactentes (MIAI) de mães infectadas com *S. mansoni*, imunizados s.c. com OVA (100µg/animal) em ACF e desafiados no 8º dia após a imunização, no coxim plantar, com OVA agregada (600µg/animal). Camundongos nascidos e amamentados em mães não-infectadas imunizados com OVA também foram desafiados nas mesmas condições (controle OVA). A espessura da pata foi medida entre 3-24 horas e os resultados representam a mediana dos valores da diferença entre as medidas das duas patas de 10 animais/grupo $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (OVA).

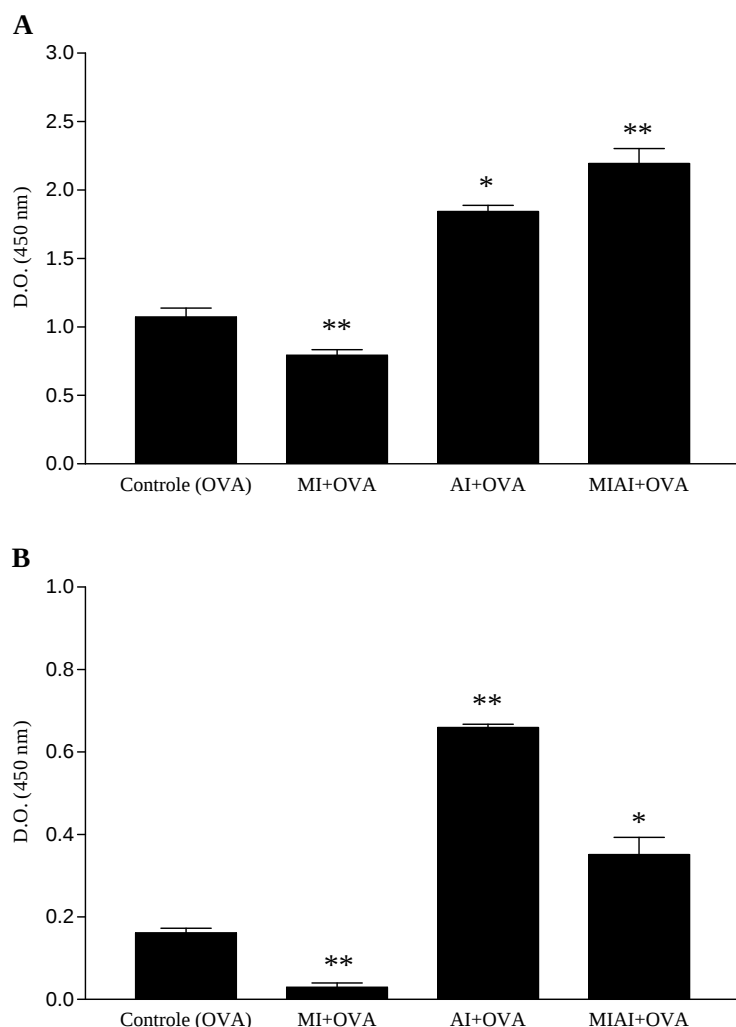


Figura 2. Níveis dos anticorpos IgG1 (A) e IgG2a (B) anti-OVA nos plasma de camundongos *Swiss Webster*, filhos (MI), lactentes (AI) ou filhos e lactentes (MIAI) de mães infectadas com *S. mansoni*, imunizados s.c. com OVA (100µg/animal) em ACF, 9 dias antes. Camundongos imunizados nascidos e amamentados em mães não-infectadas (controle OVA) também tiveram seus níveis de anticorpos dosados por ELISA nas diluições 1:8192 (IgG1) e 1:16 (IgG2a). Os resultados representam a mediana da D.O. de 5-10 animais/grupo $\pm$ erro padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle (OVA).

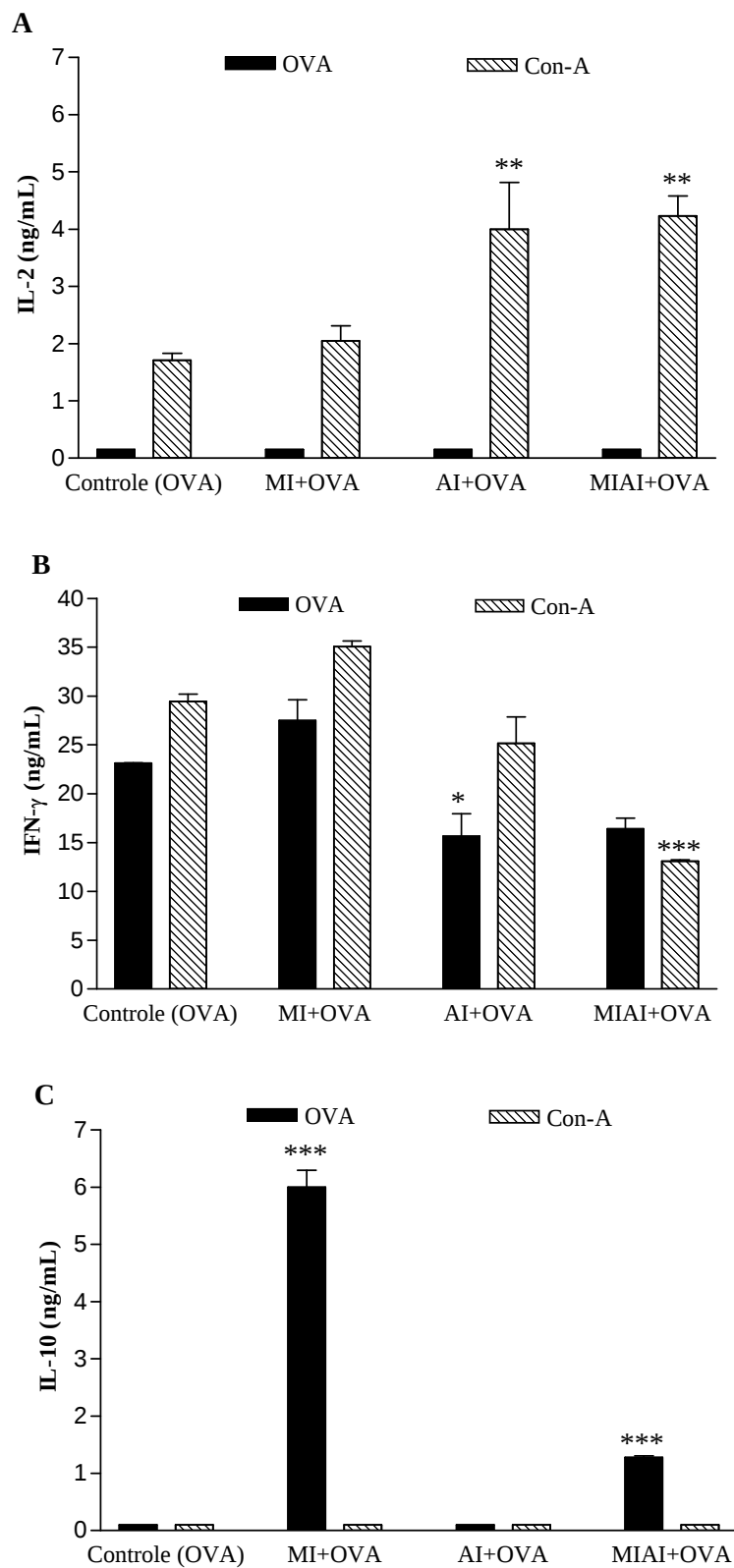


Figura 3. Níveis de IL-2 (A), IFN- γ (B) e IL-10 (C) secretados pelas células esplênicas de camundongos *Swiss Webster*, filhos (MI), lactentes (AI) ou filhos e lactentes (MIAI) de mães infectadas com *S. mansoni* imunizados s.c. com OVA (100 μ g/animal) em ACF, 9 dias antes. Camundongos imunizados nascidos e amamentados em mães não infectadas (controle OVA)

também tiveram suas dosagens de citocinas determinadas nas mesmas condições. 10^7 ou 6×10^6 células não-estimuladas ou estimuladas com OVA (500 μ g/mL) ou Con-A (5 μ g/mL) foram cultivadas por 24 ou 72 horas, respectivamente. As citocinas foram dosadas nos sobrenadantes coletados após 24 (IL-2) ou 72 horas (IFN- γ e IL-10) por ELISA sanduíche. Os resultados representam a mediana das culturas em duplicata de 5-10 animais/grupo $\pm$ erro padrão. Células não-estimuladas produziram < 0,44ng/mL de IL-2, < 1,25ng/mL de IFN- γ e < 0,31ng/mL de IL-10. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 comparado ao grupo controle (OVA).

6 CONCLUSÕES

Ao compararmos o perfil de resposta imune celular e humoral anti-OVA, produzido por camundongos nascidos, amamentados, e nascidos e amamentados em mães infectadas pelo *S. mansoni*, ao perfil produzido por animais controles (nascidos e amamentados em mães não-infectadas), observamos os seguintes aspectos:

- ❖ Animais nascidos de mães infectadas apresentam respostas aumentadas em relação aos controles, nas reações de hipersensibilidade imediata (3 horas) e tardia (24 horas), mas a reação imediata medida às 6 horas se encontra suprimida. Animais amamentados em mães esquistossomóticas apresentam potencialização de resposta nas reações de hipersensibilidade imediatas, e animais nascidos e amamentados em mães infectadas, além de apresentarem resposta potencializada nas 3 horas, potencializam também a reação tardia.
- ❖ Animais nascidos em mães esquistossomóticas apresentam níveis plasmáticos diminuídos de IgG1 e IgG2a anti-OVA em comparação aos animais controles, enquanto que os animais amamentados e os nascidos e amamentados em mães infectadas, produzem altos níveis destas duas imunoglobulinas.
- ❖ Com relação à produção de citocinas, camundongos nascidos de mães infectadas produzem altos níveis de IL-10 em resposta ao estímulo de OVA. Já os animais amamentados ou nascidos e amamentados em fêmeas esquistossomóticas produzem altos níveis de IL-2 em resposta à Con-A, diminuição na quantidade de IFN- γ frente ao estímulo de OVA e Con-A, respectivamente, e o último grupo ainda apresenta um aumento intermediário nos níveis de IL-10 frente ao estímulo com OVA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H. Imunologia Celular e Molecular. In: _____. **Mecanismos Efetores da Imunidade Mediada por Células**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 5ª ed., p. 307-326.

ACTOR, J.K.; SHIRAI, M.; KULLBERG, M.C.; BULLER, R.M.; SHER, A.; BERZOFSKY, J.A. Helminth infection results in decreased virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 3, p. 948-952, 1993.

ACTOR, J.K.; MARSHALL, M.A.; ELTOUM, I.A.; BULLER, R.M.; BERZOFSKY, J.A.; SHER, A. Increased susceptibility of mice infected with *Schistosoma mansoni* to recombinant vaccinia virus: association of viral persistence with egg granuloma formation. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 12, p. 3050-3056, 1994.

ARAUJO, M.I.; HOPPE, B.; MEDEIROS, M.JR.; ALCANTARA, L.; ALMEIDA, M.C.; SCHRIEFER, A.; OLIVEIRA, R.R.; KRUSCHEWSKY, R.; FIGUEIREDO, J.P.; CRUZ, A.A.; CARVALHO, E.M. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **J. Infect. Dis.**, v. 190, n. 10, p. 1797-1803, 2004.

ATTALLAH, A.M.; GHANEM, G.E.; ISMAIL, H.; EL WASEEF, A.M. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 6, p. 647-651, 2003.

ATTALLAH, A.M.; ABBAS, A.T.; DESSOUKY, M.I.; EL-EMSHATY, H.M.; ELSHEIKHA, H.M. 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.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; WANDERLEY, T.N.; CALLOU, A.C.; PIERI, O.S. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, suppl. 1, p. 55-62, 2006.

BATISTA, R.S.; SANTOS, S.S.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansoni. **Rev. Fac. Med. Teresópolis**, Rio de Janeiro, RJ, v. 3, n. 2, p. 21-33, 2001.

BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 2, n. 1, p. 5-11, 2004.

BLOIS, S.M.; SOTO, C.D.A.; TOMETTEN, M.; KLAPP, B.F.; MARGNI, R.A.; ARCK, P.C. 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.

BLUESTONE, J.A.; ABBAS A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 253-257, 2003.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3382-3388, 2003.

CAMUS, D.; CHARLIE, Y.; BINA, J.C.; BOROJEVIC, R.; PRATA, A.; CAPRON A. Sensitization to *Schistosoma mansoni* antigen in uninfected children born to infected mothers. **J. Infect. Dis.**, v. 134, n. 4, p. 405-408, 1976.

CARLIER, Y.; NZEYIMANA, H.; BOUT, D.; CAPRON. A. Evaluation of circulating antigens by sandwich radioimmunoassay and of the antibodies and immune complexes in *Schistosoma*

mansoni infected Africans parturants and their newborn children. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 1, p. 74-81, 1980.

CELLA, M.; FACCHETTI, F.; LANZAVECCHIA, A.; COLONNA, M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. **Nat. Immunol.**, v. 1, n. 4, p. 305-310, 2000.

CHAOUAT, G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 131, n. 3, p. 393-395, 2003.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v. 77, n. 1, p. 41-51, 2000.

COOPER, P.J.; CHICO, M.E.; SANDOVAL, C.; ESPINEL, I.; GUEVARA, A.; LEVINE, M.M., GRIFFIN, G.E.; NUTMAN, T.B. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CDC 103-HgR. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 3, p. 1574-1580, 2001.

COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, suppl.1, p. 13-19, 2004.

EL TEMSAHI, M.M.; EL GOHARI, S.H. The possibility of transplacental transmission of experimental schistosomiasis. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, v. 29, n. 2, p. 599-608, 1999.

FALCONER, A.E.; FRIEDMANN, P.S.; BIRD, P.; CALVERT, J.E. Abnormal immunoglobulin G subclass production in response to keyhole limpet haemocyanin in atopic patients. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 89, n. 3, p. 495-499, 1992.

FINKELMAN, F.D.; PEARCE, E.J.; URBAN, J.F.; SHER, A. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. **Immunol. Today**, v. 12, n. 3, p. A62-A66, 1991.

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

FRITSCHÉ, T.R.; SMITH, J.W. Parasitologia Médica. In: HENRY, J.B., **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. São Paulo: Manole Ltda., 1999. 19ª ed., p. 1292-1293.

FUSARO, A.E.; BRITO, C.A.; VICTOR, J.R.; RIGATO, P.O.; GOLDONI, A.L.; DUARTE, A.J.S.; SATO, M.N. Maternal-fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 107-115, 2007.

GEIJTENBEEK, T.B.; VAN VLIET, S.J.; KOPPEL, E.A.; SANCHEZ-HERNANDEZ, M.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; APPELMELK, B.; VAN KOOYK, Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 1, p. 7-17, 2003.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.

GRZYCH, J.M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; LEWIS, F.; SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, v. 146, n. 4, p. 1322-1327, 1991.

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

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

HANSON, L.A.; KOROTKOVA, M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. **Semin. Neonatol.**, v. 7, n. 4, p. 275-281, 2002.

HASSAN, M.M.; HASSOUNAH, O.A.; HEGAB, M.; SALAH, K.; EL-MAHROUKY, L.; GALAL, N. Transmission of circulating schistosomal antigens from infected mothers to their newborns. **J. Egypt Soc. Parasitol.**, v. 27, n. 3, p. 773-780, 1997.

HEIKKINEN, J.; MÖTTÖNEN, M.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 136, n. 2, p. 373-378, 2004.

HERZ, U.; JOACHIM, R.; AHRENS B.; SCHEFFOLD, A.; RADBRUCH, A.; HENZ, H. Prenatal sensitization in a mouse model. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 162, n. 3, p. S62-S65, 2000.

HSIEH, C.S.; ZHENG, Y.; LIANG, Y.; FONTENOT, J.D.; RUDENSKY, A.Y. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 401-410, 2006.

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

JONES, C.A. Maternal transmission of infectious pathogens in breast milk. **J. Paediatr. Child Health**, v. 37, n. 6, p. 576-582, 2001.

KAPSENBERG, L.M. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 12, p. 984-993, 2003.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KULLBERG, M.C.; PEARCE, E.J.; HIENY, S.E.; SHER, A.; BERZOFSKY, J.A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine response to a non-parasite antigen. **J. Immunol.**, v. 148, n. 10, p. 3264-3270, 1992.

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

LAGADARI, M.; BLOIS, S.; MARGNI, R.; MIRANDA, S. Analysis of macrophage presence in murine placenta: influence of age and parity status. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 51, n. 1, p. 49-55, 2004.

LANGLEY, G.; KARIUKI, H.C.; HAMMERSLEY, A.P.; OUMA, J.H.; BUTTERWORTH, A.E.; DUNNE, D.W. Human IgG subclass responses and subclass restriction to *Schistosoma mansoni* egg antigens. **Immunology**, v. 83, n. 4, p. 651-658, 1994.

LEDERER, J.A.; PEREZ, V.L.; DESROCHES, L.; KIM, S.M.; ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 397-406, 1996.

LENZI, J.A.; SOBRAL, A.C.; ARARIPE, JR.; GRIMALDI FILHO, G.; LENZI, H.L. Congenital and nursing effects on the evolution of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, suppl. 4, p. 257-267, 1987.

LIMA, C.; PERINI, A.; GARCIA, M.B.L.; MARTINS, M.A.; TEIXEIRA, M.M.; MACEDO, M.S. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 32, n. 11, p. 1659-1666, 2002.

LIMA, C.; SOUZA, V.M.; FAQUIM-MAURO, E.L.; HOSHIDA, M.S.; BEVILACQUA, E.; MACEDO, M.S.; TAVARES-DE-LIMA, W.; VARGAFTIG, B.B. 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.

LOKE, Y.M. Transmission of parasites across the placenta. **Adv. Parasitol.**, v. 21, p. 155-228, 1982.

MacDONALD, A.S.; STRAW, A.D.; BAUMAN, B.; PEARCE, E.J. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. **J. Immunol.**, v. 167, n. 4, p. 1982-1988, 2001.

MAIZELS, R.M.; BALIC, A.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; NAIR, M.; TAYLOR, M.D.; ALLEN, J.E. Helminth parasites - masters of regulation. **Immunol. Reviews**, v. 201, p. 89-116, 2004.

MALHOTRA, I.; OUMA, J.; WAMACHI, A.; KIOKO, J.; MUNGAI, P.; OMOLLO, A.; ELSON, L.; KOECH, D.; KAZURA, J.W.; KING, C.L. *In utero* exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 7, p. 1759-1766, 1997.

MALHOTRA, I.; MUNGAI, P.; WAMACHI, A.; KIOKO, J.; OUMA, J.H.; KAZURA, J.W.; KING, C.L. Helminth- and Bacillus Calmette-Guérin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 162, n. 11, p. 6843-6848, 1999.

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

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

MEDEIROS, M.JR.; FIGUEIREDO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; MATOS, M.A.; ARAÚJO, M.I.; CRUZ, A.A.; ATTA, A.M.; REGO, M.A.; DE JESUS, A.R.; TAKETOMI, E.A.; CARVALHO, E.M. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 5, p. 947-951, 2003.

MENEZES, L.E.Q.; SIQUEIRA, R.B.; SILVA, O.L. Treatment of schistosomiasis. **Rev. Bras. Med.**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 358-387, 1993.

MOORE, K.W.; de WALL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

NACHER, M.; GAY, F.; SINGHASIVANON, P.; KRUDSOOD, S.; TREEPRASERTSUK, S.; MAZIER, D.; VOULDOUKIS, I.; LOOAREESUWAN, S. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 107-113, 2000.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. Parasitologia Humana. In: MELO, A.L., COELHO, P.M.Z., *Schistosoma mansoni* e a doença. São Paulo: Atheneu, 2005. 11ª ed., p. 193-212.

PARISE FILHO, R., SILVEIRA, M.A.B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 2, p. 123-135, 2001.

PEARCE, E.J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J.M.; LEWIS, F.A.; SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med.**, v. 173, n. 1, p. 159-166, 1991.

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

PULENDRAN, B.; SMITH, J.L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C.R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 3, p. 1036-1041, 1999.

REIS E SOUSA, C.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; JANKOVIC, D.; CHAREST, H.; GERMAIN, R.N.; SHER, A. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 11, p. 1819-1829, 1997.

REIS E SOUSA, C. Dendritic cells in a mature stage. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 6, p. 476-483, 2006.

RESENDE CO, T.; HIRSCH, C.S.; TOOSSI, Z.; DIETZE, R.; RIBEIRO-RODRIGUES, R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-*Mycobacterium tuberculosis*

immunity and clinical response to tuberculosis therapy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, n. 1, p. 45-52, 2006.

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

RODRIGUES, M.N.; QUEIROZ, D.M.M.; BRAGA, A.B.C.; ROCHA, A.M.C.; EULAILO, E.C.; BRAGA, L.L.B.C. History of breastfeeding and *Helicobacter pylori* infection in children: results of a community-based study from northeastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 5, p. 470-475, 2006.

ROTHENBACHER, D.; BODE, G.; BRENNER, H. History of breastfeeding and *Helicobacter pylori* infection in pre-school children: results of a population-based study from Germany. **Int. J. Epidemiol.**, v. 31, n. 3, p. 632-637, 2002.

SABIN, E.A.; ARAÚJO, M.I.; CARVALHO, E.M.; PEARCE, E.J. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 1, p. 269-272, 1996.

SEWELL, D.; QING, Z.; REINKE, E.; ELLIOT, D.; WEINSTOCK, J.; SANDOR, M.; FABRY, Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. **Int. Immunol.**, v. 15, n. 1, p. 59-69, 2003.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 151-161, 2002.

SMITS, H.H.; HAMMAD, H.; VAN NIMWEGEN, M.; SOULLIE, T.; WILLART, M.A.; LIEVERS, E.; JONATHAN, K.; KOOL, M.; OOSTERHOUD, J.K.; DEELDER, A.M.; LAMBRECHT, B.N.; YAZDANBAKHS, M. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 4, p. 932-940, 2007.

SOUZA, V.M.; FAQUIM-MAURO E.L.; MACEDO M.S. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 1, p. 81-89, 2002.

SOUZA, V.M.; JACYSYN, J.F.; MACEDO, M.S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine**, v. 28, n. 2, p. 92-100, 2004.

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

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. CD4 T-cell memory. **Semin. Immunol.**, v. 16, n. 5, p. 295-303, 2004.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSIOTIS, G. CD4⁺ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. **Immunol. Rev.**, v. 211, p. 39-48, 2006.

STOCKINGER, B.; VELDHOFEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 281-286, 2007.

TACHON, P.; BOROJEVIC, R. Mother-child relation in human schistosomiasis mansoni: skin test and cord blood reactivity to schistosomal antigens. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 605-609, 1978.

TANG, Q.; BLUESTONE, J.A. Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship? **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 551-553, 2006.

TASKER, L.; MARSHALL-CLARKE, S. Immature B cells from neonatal mice show a selective inability to up-regulate MHC class II expression in response to antigen receptor ligation. **Int. Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 475-484, 1997.

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

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

VAN de PERRE, P. Transfer of antibody via mother's milk. **Vaccine**, v. 21, n. 24, p. 3374-3376, 2003.

VAN DIE, I.; VAN VLIET, S.J.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D.; BANK, C.M.C.; APPELMELK, B.; GEIJTENBEEK, T.B.H.; VAN KOOYK, Y. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 471-478, 2003.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R.J.; ATKINS, C.J.; LOCKSLEY, R.M.; STOCKINGER, B. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports *de novo* differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v.24, n. 2, p. 179-189, 2006.

VIEIRA, P.L.; CHRISTENSEN, J.R.; MINAEE, S.; O'NEILL, E.J.; BARRAT, F.J.; BOONSTRA, A.; BARTHLOTT, T.; STOCKINGER, B.; WRAITH, D.C.; O'GARRA, A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells1. **J. Immunol.**, v. 172, n. 10, p. 5986-5993, 2004.

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

WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; BREITTMAYER, J.P.; COTTREZ, F.; GROUX, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. **Immunity**, v. 18, n. 5, p. 605-617, 2003.

WANG, H.; HERATH, C.B.; XIA, G.; WATANABE, G.; TAYA, K. Superovulation, fertilization and in vitro embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum. **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 809-816, 2001.

WARREN, K.S. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 3, p. 417-434, 1972.

WEAVER, C.T.; HARRINGTON, L.E.; MANGAN, P.R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K.M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, v. 24, n. 6, p. 677-688, 2006.

WILLINGHAM III, A.L.; JOHANSEN, M.V.; BØGH, H.O.; ITO, A.; ANDREASSEN, J.; LINDBERG, R.; CHRISTENSEN, N.Ø.; NANSEN, P. Short report: congenital transmission of *Schistosoma japonicum* in pigs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 2, p. 311-312, 1999.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis, 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/schisto/>>. Acesso em: 17 nov. 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. HIV transmission through breastfeeding, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/topics/Paper_5_Infant_Feeding_bangkok.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2008.

WYNN, T. A.; MORAWETZ, R.; SCHARTON-KERSTEN, T.; HIENY, S.; MORSE, H. C., 3RD; KUHN, R.; MULLER, W.; CHEEVER, A. W.; SHER, A. Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. **J. Immunol.**, v. 159, n. 10, p. 5014-5023, 1997.

ANEXO 1

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 82/07

Recife, 22 de agosto de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Elizabeth Malagueno de Santana**
Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami/LIKA - UFPE
Processo nº 008554/2007-51

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS NASCIDOS OU AMAMENTADOS EM MÃES INFECTADAS PELO *Shistosoma mansoni*".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

ANEXO 2

International Journal for Parasitology **INSTRUCTIONS TO AUTHORS** (see also <http://www.elsevier.com/locate/ijpara>)

Submission: All papers should be submitted on-line via: <http://ees.elsevier.com/ijpara>.

General enquiries prior to submission should be directed to the Editorial Office: editor@IJP.org.au.

Prior to submitting a paper it is best to prepare information and a set of files for submission. These files together with preferred file types are listed below. Formatting and style issues are listed further below:

Required Information:

- Name, affiliation, email and mail address information for one corresponding author. This must be the same person nominated as corresponding author on the manuscript title page and this person must submit the manuscript on-line.

- Name and affiliations of all other authors.

- The type of paper you are submitting (Research paper or Rapid Communication).

- **(Note: Current Opinions and Invited Reviews are by invitation only).**

Files: Submission files should be arranged in the following order prior to pdf conversion by the system.

Author agreement (optional at submission, mandatory with or before revision).

Cover letter is mandatory for all submissions and should address the novelty, significance and implications of the work, together with four suggested referees.

Manuscript containing (in order) Title, Authors and addresses, Corresponding Author and address, Abstract, Keywords. In numbered sections: 1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results; 4. Discussion; then Acknowledgements; References; Legends to Figures. Tables with their legends (in separate or combined files, numbered, in order). Figures (in separate files); preferred formats: jpg, tif or gif. Supplementary and multimedia files.

For the text: The preferred text format is Microsoft Word. The title page, abstract and text should be formatted with line numbers. In Word, go to file/page setup/layout/line numbers. Click on .add line numbering., then click on .continuous. then .OK. and .OK. again. The manuscript should be formatted to A4 size paper, in English, double spaced and with 2 cm margins.

Author agreements: The electronic submission should be followed by a letter including the manuscript title, author names, a statement confirming that each author has read the manuscript and accepts responsibility for its contents, a statement of financial or other relationship that might lead to a conflict of interests, together with the signatures of all authors. This letter should be faxed or e-mailed to:

Editor-in-Chief, International Journal for Parasitology

Fax: +61 (0) 3 9345 2130; E-mail: editor@IJP.org.au.

During submission you will also have to agree to an .Ethics in Publishing. document.

General. The journal publishes the results of high quality original research in all aspects of basic and applied parasitology, including all the fields covered by its Specialist Editors, and ranging from parasites and host-parasite relationships of intrinsic biological interest to those of social and economic importance in human and veterinary medicine and agriculture. Original research includes the development of new concepts and techniques, as well as experimental and observational science. Because of its breadth of discipline coverage, the aims and significance of all contributions should be made clear to readers who are not expert in the particular subject of papers. In applied parasitology, it will tend to favour contributions of broader significance to the subject rather than narrow, highly specialised applications. All papers are peer reviewed.

There are no page or submission charges. Twenty-five free reprints will be provided.

There are two types of papers, structured as follows:

Original Research Papers

Title page. Contains the title, authors. names, addresses, name and contact details of the corresponding author.

Abstract. The second page contains an Abstract of not more than 300 words in a single paragraph. At the foot of this page a list of up to 8 Index Keywords should be provided.

Text. (see sections above) In addition to major headings two forms of subheadings are used: (a) the numbered italicised side subheading referring to several paragraphs; (b) the italicised paragraph subheading at the beginning of a single paragraph used only in Materials and methods.

Rapid Communications

The journal offers particularly rapid publication of highly significant findings. The covering letter must contain an explanation as to why the work is of such significance to justify publication as a Rapid Communication. Authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief prior to submission to see if their paper merits rapid publication and the final decision on acceptance will be influenced not only by scientific assessment but also by considerations of priority and suitability for this section of the Journal. Articles will be limited to 4,000 words and not display items (figures or tables). The article must not be preliminary but will describe significant and substantial new findings, be complete in itself and not be published at a later date in greater detail. The typescript should be marked "*RAPID COMMUNICATION*" on the top left-hand corner of the title page. The first page should show title, author and address details. A short Abstract of not more than 100 words in the same style as for full papers plus up to six Keywords should follow. The text of the paper is next, written with a minimum number of paragraphs and no headings. Not more than 20 essential references should be given. Other instructions are the same as those for full papers.

Acknowledgements. Authors should provide confirmation of consent from persons acknowledged in manuscripts eg. personal communications. This can be provided in a covering letter or by e-mail to the editorial office.

References

Correct references are the responsibility of the author. Please ensure that all references cited in the text are included in the reference list. References in the text start with the name of the author(s), followed by the publication date in brackets, e.g. 'Combes (2001) has shown the importance of ...', or '... has been described (Combes, 2001; Kumar et al., 2004) ...', using date order. More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by two authors, use (Sangster and Dobson, 2002) or for more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. There is an output style available for EndNote. Please refer to the EndNote website or contact the Editorial Office for a copy of this style file. The references in the reference list should be in alphabetical order. References to journal articles should contain names and initials of all author(s), year of publication, article title, abbreviation of the name of the journal according to the *List of Serial Title Word*

Abbreviations (International Serials Data System, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8), volume number and page numbers. Unpublished data, personal communications and papers "in preparation" or "submitted", abstracts (whether published or not) and theses should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work "in press" may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter or e-mail from the named person(s) giving permission to quote such information. References to books should also include the title (of series and volume), initials and names of the editor(s) and publisher and place of publication.

Examples:

Combes, C., 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. University of Chicago Press, Chicago and London.

Kumar, N., Cha, G., Pineda, F., Maciel, J., Haddad, D., Bhattacharyya, M.K., Nagayasu, E., 2004. Molecular complexity of sexual development and gene regulation in *Plasmodium falciparum*. Int. J. Parasitol. 34, 1451-1458.

Pettersson, E.U., Ljunggren, E.L., Morrison, D.A., Mattsson, J.G., in press. Functional analysis and localisation of a delta-class glutathione S-transferase from *Sarcoptes scabiei*. Int. J. Parasitol.

Sangster, N.C., Dobson, R.J., 2002. Anthelmintic resistance. In: Lee, D.L. (Ed.), The biology of nematodes. Taylor and Francis, London and New York, pp. 531-567.

Tables. These should be self-explanatory, each on a separate page with its title at the top, numbered consecutively. There should be no vertical lines in tables. Abbreviations if used at all, should be explained as footnotes identified by small superscript alphabetical characters.

Abbreviations. Avoid the use of abbreviations, but if necessary, authors should use the list printed at the end of these Instructions as a guide to those terms that need not be given in full, or define each abbreviation on first use.

Figures. Illustrations of all kinds should be listed together under "Legend to Figures" numbered consecutively and their positions indicated in the text. Figures should be high quality, of an adequate size to ensure clarity, and letters and numbers should be at least 4 mm in height. Magnification should be indicated by inclusion of a scale bar in the figure and its value should be indicated on the figure or in the legend. Each figure should be obvious from its file name. If images have been altered, describe the nature of changes made and software used. This information should be included in the Materials and methods. section of the manuscript. In general, figures will be printed and appear on electronic versions of papers in black and white. Where appropriate, colour figures can be provided on the electronic version, but black and white in the printed version. Authors should note that the figure legend will be the same in both versions. While there is no charge for colour in electronic versions, there generally is a fee for printed colour figures. Please contact the Editorial Office for the current policy.

Supplementary files. For non-integrated supplementary files, a footnote should be typed on the title page of the manuscript: Note: Supplementary data associated with this article.. A copy of supplementary material should be submitted at the same time as the manuscript. Preferred formats are Microsoft Office for text or graphics and avi for movie files. Maximum size of files is 10 MB. Files too large to submit online should be sent to the journal office on CD.

Submission of sequence data to databases. Novel nucleotide or protein sequence data must be deposited in the GenBank., EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript: 'Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank., EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by the World Wide Web to either GenBank (via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>), EMBL (via WebIn: <http://www.ebi.ac.uk/subs/allsubs.html>) or to DDBJ (via SAKURA: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>). Special types of

submissions, such as genomes, bulk submissions, segmented sets, and population/ phylogenetic/ mutation studies, can be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

GenBank/DNA sequence linking. In order for automatic links to be made between papers and GenBank, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See the example). When published they will appear in normal type.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**"). Additionally, any multiple alignments of nucleotide or protein data must be submitted to a recognised database and must also receive a unique accession number. The accession number can appear in the text in the relevant section of the Results, as: .Alignment files are available by anonymous FTP from FTP.EBI.AC.UK in directory/ pub/ databases/ emb1/ align or via the EMBLALIGN database via SRS at <http://srs.ebi.ac.uk>; under accession(s). The usual method for submitting alignments is by the World Wide Web to the European Bioinformatics Institute (via Webin-Align: <http://www.ebi.ac.uk>). Microarray data, in MIAME-compliant format, should be submitted to ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) or GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Accession identifiers relating to the data should be provided in the manuscript text.

Policy on bioinformatics papers. In silico analysis: The following guidelines apply to papers that exclusively use in silico analysis or rely heavily on this approach for analysis and conclusions. Such papers should address a significant biological issue or issues. Bioinformatic data should be supported by novel or published biological data. Work would typically use information from a number of databases and even from a number of parasite or host species and use a number of analytical methods. Types of "metaanalysis" are encouraged either across a wide range of parasites or, say, at a number of points in a metabolic or signalling pathway or an immune cascade. In silico analysis may be especially suitable for review articles.

Taxonomic publications. Taxonomic papers should be of broad interest, going beyond purely morphological descriptions which are best suited to specialist journals. Examples of contributions of broader interest include description of new taxa which do not fit within accepted classifications, analyses which are of phylogenetic or biogeographic significance employing a range of analysis techniques or which include information on host-parasite relationships or deleterious effects on the host. Presentations which include description of new species should conform to a prescribed pattern as follows: where the new species name is written for the first time, "n.sp." should succeed it. The name should be followed by: (1) a description, in telegraphic style, i.e. without articles and verbs, of the specific characters; accompanied by illustrations depicting the main differentiating characters; (2) a diagnosis, emphasising the characters of the new species or genus; (3) the details of type material, (host, location in host, geographic locality, collector, place of deposition and registration). Synopses (a brief summary of a small taxonomic group of parasites) and checklists (a list of parasites from particular hosts in particular localities) are acceptable, provided species named are critically evaluated and identifications are sound. Specimens upon which new host or locality records are based must be deposited in a museum or recognised collection to be available for further study and registration numbers must be cited. Names, authors and years of publication of original descriptions of named species should be cited in the text in the manner recommended by the International Code of Zoological Nomenclature.

Care of experimental animals. It is the responsibility of authors to ensure that their practices conform with their national animal ethics guidelines. Submitted papers must contain precise details on the care and use of animals and of experimental procedures, especially interventions such as surgery and tissue sampling, and methods of euthanasia. Referees are asked to indicate whether there is any reason to consider that experimental animals were not well treated or care not taken to avoid distress, and papers may ultimately be rejected on such grounds.

Statistical analysis. Authors should seek advice on data analysis prior to submission. A commentary (Morrison, D.A., 2002. How to improve statistical analysis in parasitology research publications. *Int. J. Parasitol.* 32, 1065-1070) may also be consulted. Papers may be sent to referees with particular expertise in statistics and modelling.

The review process. The corresponding author, through the web access, is responsible for actions with respect to each paper. E-mail prompts will be delivered only to the corresponding author. Articles can also be tracked by the corresponding author via the online system.

Proofs. Page proofs for correction will be e-mailed to the corresponding author in pdf format by the Publisher. **It is the responsibility of the author to ensure that the proof contains no errors and any corrections are returned to the Publisher within 48 hours of receipt. Only one set of changes will be made to a proof.**

Authors should not correct changes that may have been made by the Editor-in-Chief or the Publisher to conform with required presentation, but may refer to them in an accompanying letter to the Production Editor. Proofs, copyright transfers and order for reprints should be returned to:

**Elsevier Ireland Ltd, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland
Tel.: +353-61-709600; fax: +353-61-709100**

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/ijpara>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.