

AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E ATIVAÇÃO CELULAR EM CAMUNDONGOS ADULTOS DESCENDENTES DE MÃES ESQUISTOSSOMÓTICAS EM RESPOSTA À OVALBUMINA

Letícia Tavares Rodrigues Melo Silva¹; Valdênia Maria Oliveira de Souza²

¹Estudante do Curso de Biomedicina – CCB – UFPE. E-mail: leka_melo15@hotmail.com,

²Docente/Pesquisador do Departamento de Ciências Farmacêuticas – CCS – UFPE. E-mail: valdenia.souza@gmail.com.

Sumário: Infecções maternas por *Schistosoma mansoni* podem alterar a resposta imune dos descendentes, quando adultos, em infecções pós-natais. Objetivou-se comparar em células esplênicas de camundongos nascidos e/ou amamentados em mães infectadas, submetidos à imunização com ovalbumina, a frequência de células T regulatórias (CD4+/FoxP3+) frente à estimulação policlonal e OVA-específico. Para isso, camundongos recém-nascidos foram divididos em quatro grupos: animais nascidos e amamentados em mães infectadas (MAI), nascidos de mães infectadas (MI) e amamentados por mães não infectadas, animais provenientes de mães não infectadas e amamentados por mães infectadas (AI) e animais nascidos e amamentados em mães não infectadas (Controle). Animais dos diferentes grupos de estudo foram imunizados com OVA+Adjuvante, no 45º dia de vida. No 8º dia, após a imunização, os animais tiveram seus baços retirados e a suspensão de células estimuladas (24 horas) com OVA ou mitógeno (ConA). As células foram submetidas à marcação com anticorpos monoclonais conjugados à substância fluorescente e analisadas por citometria de fluxo. No grupo de descendentes imunizados nascidos ou receberam leite de mães infectadas existe uma maior frequência de linfócitos T regulatórios em resposta ao estímulo mitogênico e OVA, respectivamente.

Palavras-chave: Descendentes; *Schistosoma mansoni*; Treg.

INTRODUÇÃO

Tem sido demonstrado que devido a imunomodulação durante a esquistossomose, as infecções maternas pelo *Schistosoma mansoni* podem modular a resposta imune dos descendentes, quando adultos, em infecções pós-natais (OTHMAN et al., 2010; SANTOS et al., 2014). Diferentes estudos têm relacionado a transferência de antígenos parasitários ou anticorpos anti-parasita *in utero* ou através do leite materno (ATTALLAH et al., 2003; CALDAS et al., 2008) com as alterações na resposta imune dos descendentes. A exposição materna aos alérgenos, citocinas ou os processos infecciosos, podem alterar o grau de competência imune dos seus descendentes (LIMA et al., 2005; FUSARO et al., 2007). O estudo da influência da gestação e da amamentação, separadamente, em mães infectadas pelo *S. mansoni*, mostrou que camundongos adultos previamente amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram uma potencialização na produção de anticorpos anti-OVA, acompanhada de altos níveis de IL-2, enquanto que a gestação levou a um potencial imunossupressivo no descendente, com produção de IL-10 e supressão na produção de anticorpos (SANTOS et al., 2010). As células T regulatórias CD4+/Foxp3+ (Tregs) são componentes da tolerância imunológica e são moduladores na resposta a patógenos, alérgenos, antígenos próprios e células cancerígenas e com isso, vem sendo estudada a possibilidade das células Treg como opção terapêutica para doenças alérgicas, infecciosas,

autoimunes e neoplásicas (TAAMS *et al.*, 2006; TORGERSON *et al.*, 2007). Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar a participação dos linfócitos T regulatórios, nos descendentes previamente amamentados ou gerados em mães esquistossomóticas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo intervencionista, onde um grupo de camundongos fêmeas sofreu a intervenção (infecção com 20 cercárias *S. mansoni*) e o outro grupo (controle) serviu para comparação dos resultados. Após 60 dias, as fêmeas tiveram seus estros sincronizados e foram acasalados. Logo após o nascimento, os descendentes foram divididos em quatro grupos (n=10): 1) Animais apenas amamentados em mães infectadas (AI); 2) Animais nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI); 3) Animais apenas nascidos de mães infectadas (MI) 4) Animais nascidos e amamentados em mães não-infectadas (CONTROLE). Os animais dos diferentes grupos foram imunizados com OA em Adjuvante, no 45º dia de vida. No 8º dia, após a imunização, os animais tiveram seus baços retirados e a suspensão de células estimuladas com OA ou mitógeno (ConA), por 24 horas. As células foram submetidas à marcação com anticorpos monoclonais, conjugados à substância fluorescente, específicos para linfócitos T-CD4+ e FoxP3+ intracelular e analisadas por citometria de fluxo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da marcação de células Treg, através de citometria de fluxo, mostrou que a frequência de células CD4+/FoxP3+ nos descendentes adultos não imunizados não apresentou diferença significativa entre os grupos frente aos estímulos OVA e ConA ou cultivo com meio RPMI (Figura 1A). Analisando a figura 1B, observa-se uma maior frequência dos linfócitos CD4+/FoxP3+ no grupo de animais AI em comparação aos grupos MIAI, MI e CONTROLE quando cultivados com meio (MIAI=0,3%; AI=1,0%; MI=0,5%; CONTROLE=0,35%), ou na presença de OVA (MIAI=0,2%; AI=0,65%; MI=0,2%; CONTROLE=0,25). Com relação ao estímulo mitogênico, houve maior frequência de linfócitos regulatórios no grupo MI em relação aos demais grupos (MIAI=0,75%; AI=0,70%; MI=1,5%; CONTROLE=0,8%).

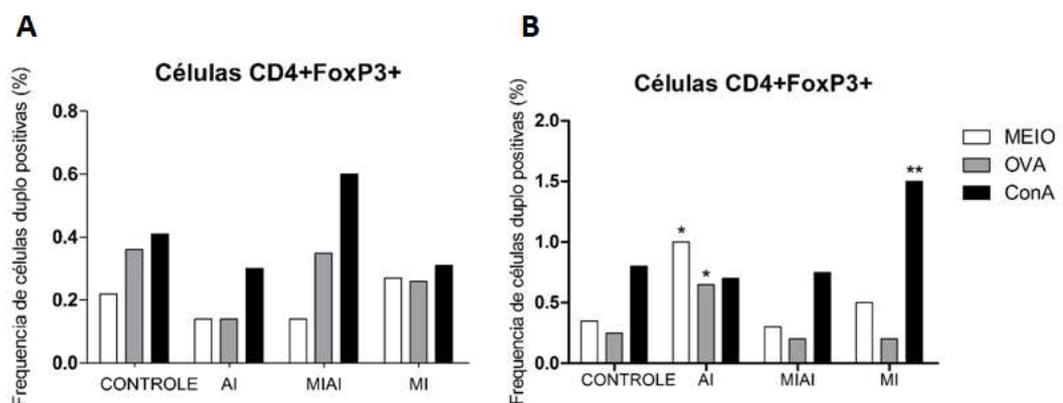


Figura 1: Frequência de células CD4+FoxP3+ de camundongos adultos nascidos de mães infectadas (MI), apenas amamentados em mães infectadas (AI), nascidos e amamentados em mães infectadas (MIAI) e nascidos e amamentados em mães não infectadas (CONTROLE), não imunizados (A) ou imunizados com OVA+CFA (B). 5×10^6 células foram cultivadas com Meio RPMI, OA (500 µg/mL), ConA (5 µg/mL) por 24 horas. Após o cultivo de 24 horas, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-FoxP3 e avaliadas através de citometria de fluxo.

Além da resposta Th2, característica na fase crônica da esquistossomose, os antígenos dos ovos são indutores de linfócitos T regulatórios por terem a capacidade de induzir a produção de IL-10 pelas APCs, a qual é importante para geração e manutenção das Tregs (WAKKACH et al., 2003). Foi demonstrado que células T regulatórias CD4+CD25+, chamadas de Tregs naturais (FoxP3+), eram necessárias para manutenção da resposta Th2 e, portanto essenciais no processo de imunomodulação presente na esquistossomose (MCKEE et al., 2004). Células T CD25+FoxP3+ podem ser encontradas no tecido hepático de animais infectados, principalmente ao redor dos granulomas e a quantidade destas células nesta região aumenta à medida que a doença evolui (EL-AHWANY et al., 2012). No presente estudo, diferenças estatísticas foram observadas nos animais imunizados com OVA, onde o contato com leite materno de mães infectadas favoreceu a geração destas células na presença do meio de cultura ou com OVA. Do contrário, para o grupo de descendentes apenas gerados em mães infectadas as células Tregs foram mais evidentes após estímulo mitogênico. E de modo interessante, animais nascidos e gerados de mães infectadas tiveram caráter supressor amenizado. É sabido que a geração de Treg é dependente de IL-2, secretada por linfócitos T convencionais (ANTONY et al., 2006). Santos et al., 2010 observaram que animais previamente amamentados em mães esquistossomóticas apresentaram altos níveis de IL-2, enquanto que a gestação levou a um potencial imunossupressivo no descendente, com produção de IL-10. O microambiente gestacional é caracterizado principalmente pela produção de IL-10 por células dendríticas (DCs) e macrófagos *in útero*. A presença de antígenos parasitários, como o SEA, na interface útero-placenta pode estar estimulando a capacidade das APCs uterinas em produzir de IL-10. Assim, a condição de infecção esquistossomótica materna, durante a gestação pode influenciar a produção de IL-10 pelas APCs nas células esplênicas dos descendentes adultos. Straw et al. (2003) demonstraram, em um estudo experimental, que a infecção por *S. mansoni* induz nas células dendríticas (DCs) uma elevada expressão de CD80 e CD40, porém não é observado o mesmo perfil para CD86. De modo interessante, Santos et al. (2014) relataram uma falha na expressão de moléculas co-estimulatórias CD86 nas DCs dos animais apenas gerados em mães infectadas. Estes dados em conjuntos nos levam a crer que antígenos parasitários *in útero*, através de uma ação imunomoduladora nas APCs dos descendentes, imprimem uma programação nestas células que durante a apresentação do antígeno heterólogo podem direcionar de produção de IL-10 por linfócitos T em resposta a este antígeno. Em relação ao aleitamento, é visto que um dos componentes do leite materno é o Lacto-N-Fucopentose III (LNFP-III), que também é encontrado nos ovos do *S. mansoni*. Este açúcar é capaz de promover a proliferação de células B e a síntese de mediadores, como IL-10 e prostaglandina (PGE₂), por estas células (THOMAS; HARN, 2005). Mangan et al (2004) relataram que os antígenos dos vermes do *S. mansoni* estão relacionados com a geração de linfócitos B regulatórios, CD5+/CD1d+. De modo interessante, Amu et al. (2010) relataram que células B regulatórias (CD5+/CD1d+/IL-10+), em camundongos adultos infectados pelo *S. mansoni*, foram relacionadas com o recrutamento de células Tregs para o pulmão e consequente supressão de resposta alérgica anti-ovalbumina (OVA). Santos *et al.*, (2014) observaram que animais amamentados tiveram maior frequência de células B que expressam CD80 e CD40, juntamente com alta produção de IL-2, população esta requerida para manutenção dos níveis de Tregs (ZHENG *et al.*, 2010). As propriedades dos antígenos parasitários, presentes no leite materno, em estimular células T regulatórias (EL-AHWANY et al., 2012) em conjunto com o microambiente supressor da mucosa intestinal (WEINER et al., 2011) podem permitir um *upgrade* na geração de Tregs após re-exposição antigênica na vida adulta. Vale à pena ressaltar a frequência alta de células Treg, frente ao estímulo

mitogênico, no grupo MI. SANTOS et al, 2010, demonstrou produção de IL-10 neste grupo em resposta à OA. Em conjunto estes dados corroboram o perfil imunossupressor nos animais nascido de mães esquistossomóticas.

CONCLUSÕES

A prévia amamentação e gestação em mães esquistossomóticas predispõe um potencial imunossupressor em descendentes de mães esquistossomóticas, havendo uma maior frequência de linfócitos T regulatórios anti-OVA nos descendentes sensibilizados com leite materno e um maior potencial de células T regulatórias na população total de linfócitos devido à gestação.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e Propesq/UFPE pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AMU, S. et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.*, v. 125, n. 5, p. 1114-1124, 2010.
- EL-AHWANY E, Bauiomy IR, Nagy F, Zalat R, Mahmoud O, Zada S. T Regulatory Cell Responses to Immunization with a Soluble Egg Antigen in *Schistosoma mansoni*-Infected Mice. *Korean J Parasitol.* 2012; 50(1): 29-35.
- MCKEE AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol* 2004; 173: 1224-31.
- SANTOS, P. A. et al. Maternal schistosomiasis alters costimulatory molecules expression. In antigen-presenting cells from adult offspring mice. *Experimental Parasitology*, v. 141, p. 62-67, 2014.
- WAKKACH, A.; FOURNIER, N.; BRUN, V.; et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation *in vivo*. *Immunity*, v. 18, n.5,p. 605-617. 2003.
- WEINER, H. L. et al. Oral tolerance. *Immunological Reviews*, v. 241. p, 241-259, 2011.
- ZHENG J, Liu Y, LAU, Y, TU, Wenwei. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4 regulatory T cells. *Cell Mol Immunol.* v.7, p. 44-50. 2010.