

SIMONE CORRÊA DA SILVA

**IMUNOLOGIA DAS INTERAÇÕES MATERNO-FETAIS NA ASMA:
PADRÕES DE REATIVIDADE IMUNOLÓGICA NO COLOSTRO E NO
SANGUE DE MÃES ASMÁTICAS E NO SANGUE DE CORDÃO DE SEUS
RESPECTIVOS RECÉM-NASCIDOS.**

**TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS**

ÁREA DE CONCENTREÇÃO: IMUNOLOGIA

**ORIENTADOR: PROF. DRA. MAGDA
MARIA SALES CARNEIRO-SAMPAIO**

**CO-ORIENTADOR: PROF. DRA. ANA
MARIA CAETANO DE FARIA**

**SÃO PAULO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*À Deus pela oportunidade
e pelo amor e companheirismo da minha família e
de meus amigos tornando este
momento possível*

*À minha família maravilhosa
Do RJ e de SP sempre tão dispostos
a me ajudar e me compreender, obrigada*

À Dra. Magda pela oportunidade de crescimento profissional

À Dra. Ana Maria Caetano de Faria pela oportunidade de conviver com suas idéias tão inovadoras e pela oportunidade de aprendizado extremamente importante para o meu desenvolvimento científico e por sempre ter acreditado em mim, obrigada.

À Dra. Simone Fonseca que me guiou e foi umas das grandes responsáveis pelo desenvolvimento deste projeto. Sua competência e sabedoria foram de extrema importância para a conclusão deste trabalho

Ao Prof. Dr. Charles Kirou Naspitz que sempre acreditou neste projeto e me deu todo o apoio necessário para esta conclusão. Muito obrigada

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pela recepção em seu laboratório

À Dra. Verônica Coelho pela recepção e participação nas discussões em seu grupo

Ao Prof. Dr. Marcelo Zugaib pela oportunidade de trabalhar com o Departamento de obstetrícia

Ao Dr. Rodrigo Ruano pelo auxílio na busca das mães asmáticas

À Dra. Patrícia Palmeira pelo companheirismo e pela amizade e por estar sempre pronta para me ajudar.

À Dra. Gerlândia Pontes pela presença, competência e ajuda com as correções deste trabalho, obrigada.

À Elaine Cardoso pela amizade, ajuda e companheirismo nas madrugadas frias e hostis

À Christina Arslanian Kubo pela amizade, por sua participação neste trabalho sempre de forma competente e pelos seus sempre valiosos ensinamentos

Às amigas do laboratório Mariana Kimiliauskis, Rosana Resende, Fabiana Ghuilardi, Dora L.F. Del Nero, Ana Lúcia Marques, Camila Quinello, Leuridan Torres. Pelas muitas tarde de trabalho e risos.

Às futuras cientistas Gabriela e Juliana que estão se iniciando no mundo científico.

Aos amigos Josias, Paulo, Otávio e Valmir pela amizade e por estarem sempre prontos a ajudar

A amiga e companheira Evelyn Volsi pela amizade, companheirismo e pelas noites em claro para a realização deste trabalho, muito obrigada

À amiga Rosemeire A. Silva pela ajuda, longas conversas, ensinamentos e por força nos momentos difíceis

À amiga Máisa Takenaka pela ajuda, pelas risadas e amizade

À Geórgia Porto pela amizade, conversas e assessoria científica

À Sandra Maria Monteiro pela amizade e ensinamentos em citometria de fluxo

Ao grupo de transplante pela acolhida, amizade e ensinamentos

À Adriana Coutinho pela ajuda e ensinamentos nos experimentos de dosagens de citocinas no sobrenadante de células, pela amizade e companheirismo

À Sandra Emiko e Beatriz Fortunato pela amizade e pelas risadas

À Luciana, pela companhia nos finais de semana e pela amizade

À Camila pela compreensão e doações nos horários do citômetro de fluxo

À Natalie e Sandra Moraes pelos momentos compartilhados na sala de cultura

Ao Carlos do grupo de Alergia pela ajuda nos experimentos de RAST

À Santa Poppe pela amizade e ensinamentos

À Dra. Cristina Kokron pelo auxílio nos experimentos de RAST

Ao grupo de enfermagem do Centro Obstétrico do Hospital Universitário da USP pelo apoio nas coletas

Aos residentes do Centro Obstétrico do HCUSP pelas coletas das pacientes asmáticas

À Deise pelo apoio, ajuda e amizade

Ao time de futebol da ACM pelos momentos de descontração, risadas e relaxamento. Porque nem só de ciência é feita a vida...

À todos aqueles de alguma forma ajudaram neste trabalho e que eu não citei devido as muitas noites insones para elaboração desta tese... obrigada, muito obrigada.

RESUMO

A Asma é uma doença crônica que vem apresentando taxas de prevalência crescentes em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. A Asma está associada ao perfil Th2, que, leva a um predomínio da produção de anticorpos IgE e das citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Visto que ocorre uma intensa troca entre mãe e neonato, tanto no ambiente intra-uterino quanto durante o aleitamento, é legítimo supor que a modulação do sistema imune da criança possa ser influenciada pelo padrão Th1/Th2/Th3 apresentado por sua mãe. Os objetivos deste trabalho são avaliar a presença de elementos celulares e humorais indicativos dos padrões Th1, Th2 e Th3 em sangue e colostro de mães asmáticas, com resposta predominante para Th2, e no sangue e colostro de mães saudáveis e no sangue de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos (RN). Os seguintes ensaios foram realizados: a) imunofenotipagem de leucócitos do sangue e do colostro; d) análise intracelular de IL-4, IFN- γ e IL-13 em células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺; e) dosagem de citocinas no sobrenadante celular; f) dosagem de citocinas no sobrenadante de colostro. Observamos que mães asmáticas e seu RN possuem maiores níveis de IgE total e IgE anti-Derp-1. Os resultados mostram uma menor produção de IgG pelas mães asmáticas. A fenotipagem de células CD123⁺CD80⁺ mostra que células dendríticas CD123⁺ e células dendríticas CD11c⁺ de mães asmáticas possuem maior expressão de CD80 e CD86, quando comparadas com as de mães saudáveis. Na identificação de células CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺, observamos que mães asmáticas possuem valores percentuais mais elevados destas células quando comparamos com mães saudáveis. As análises da produção de IFN- γ mostram que linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de mães asmáticas produzem níveis maiores desta citocinas quando comparamos com células de mães saudáveis. Não houve diferença significativa na produção de IL-4 por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ entre os grupos. Células CD3⁺CD4⁺ de mães asmáticas apresentaram

valores percentuais de células produtoras de IL-13 maiores em relação à mães saudáveis. Mães saudáveis produziram maiores quantidades de IL-10 no sobrenadante celular, Podemos concluir que: Mães asmáticas possuem menores níveis de IgG e IgM em seu soro, o que parece contribuir para um aumento dos níveis de IgE no soro. Mas esta diferença não interfere nas concentrações destas imunoglobulinas de seus RNs. 2. Mães asmáticas possuem elevados valores percentuais de células CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺, características de células de memória central. Linfócitos CD3⁺CD4⁺ produzem maiores quantidades de citocinas como IL-13 e IFN- γ . 3. Células dendríticas mielóides (CD11c⁺) e linfóides (CD123⁺) de mães asmáticas possuem maior expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, Assim como células mielóides de seus RNs possuem maior expressão de CD80. Células mononucleares do sangue periférico de mães asmáticas produzem níveis menores de IL-10 após estimulação inespecífica. 4. O colostro de mães atópicas não possui diferenças entre os parâmetros aqui estudados, podendo então o aleitamento materno ser altamente indicado para mães asmáticas e seus filhos.

SUMMARY

Asthma is a chronic disease that shows high prevalence rates in whole world, even in development countries. Asthma is associated to a Th2 pattern, which leads to an increased production of IgE antibodies and the cytokines IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As occurs an intensive exchange between the mother and the newborn in both intra-uterine environment and during breastfeeding process, it is possible to think that the children's immunological system modulation could be influenced by the Th1/Th2/Th3 pattern of the mother. The objectives of this work is to evaluate: the presence of humoral and cell elements indicatives of Th1, Th2 and Th3 patterns in blood and colostrum from asthmatic mothers, with predominant response of Th2, in blood and colostrum from healthy mothers and in the cord blood of their respective newborns. During this research the following assays were performed: a) immunophenotyping of blood and colostrum leucocytes; d) intracelullar analysis of IL-4, IFN- γ and IL-13 in CD3⁺CD4⁺ cells and CD3⁺CD8⁺ cells; e) measure of cytokines in cellular culture supernatant; f) measure of cytokines in colostrum. We could verify that asthmatic mothers and their newborns have increased levels of total IgE e IgE anti-Derp-1. The results also demonstrate less IgG production by asthmatic mothers. The dendritic cells CD123⁺ and CD11c⁺ from asthmatic mothers have higher expression of CD80 and CD86, when compared to cells from healthy mothers. In identification of CD3⁺CD4⁺CD45RA-CCR7⁺ cells, we observed that asthmatic mothers have higher percentual figures of these cells than healthy mothers. The IFN- γ analysis demonstrate that T CD3⁺CD4⁺ asthmatic mother's lymphocytes produces higher levels of this cytokine than healthy mothers. Significant differences of IL-4 production by CD3⁺CD4⁺ cells and CD3⁺CD8⁺ cells were not perceived in any group. CD3⁺CD4⁺ cells from asthmatic mothers showed higher percentages of IL-13 producing cells than cells from healthy mothers. Healthy mother's cells produced higher amount of IL-10 when stimulated with phytohemagglutinin. We can conclude: 1. asthmatic

mothers have lower levels of IgG and IgM in their serum that seems to contribute to an increase of IgE level in the serum. Even so this difference doesn't seem to interfere in their newborns immunoglobulin concentrations; 2. Asthmatic mothers have high percentage of CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺ central memory cells. CD3⁺CD4⁺ lymphocytes produce higher amounts of cytokines as IL-13 and IFN- γ than healthy mothers; 3. Myeloid (CD11c⁺) and lymphoid (CD123⁺) dendritic cells from asthmatic mothers showed higher expression of CD80 and CD86 costimulatory molecules, as the myeloid cells from their newborns have higher expression of CD80. Peripheral blood mononuclear cells from asthmatic mothers produce lower levels of IL-10 after non-specific stimulation; 4. Colostrum from atopic mothers doesn't present differences in the parameters analyzed here, which enable to conclude that breastfeeding could be high recommended to children from asthmatic mothers.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Asma, alergia e padrões de reatividade imunológica

A asma é uma doença crônica que apresenta taxas de prevalência crescentes em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (SOLÉ et al, 2006; FISCHER & CAMARGOS, 2002). Em países industrializados, a incidência da asma dobrou desde 1980 e, em países em desenvolvimento, essa doença representa um desafio aos sistemas de saúde pública devido a sua alta prevalência e severidade, constituindo grande impacto em sua economia. Países como Brasil e Peru apresentam hoje prevalências maiores que o Canadá e Reino Unido (UMETSU, et al 2002).

No Brasil, estima-se que a asma é responsável por mais de 2.000 mortes por ano, o que representa um valor 50% maior quando comparado com os dados da Austrália. A mortalidade por essa enfermidade é mais freqüente nos extremos de idade (crianças menores de um ano e idosos com mais de 65 anos) (FISCHER & CAMARGOS, 2002). Os resultados de um trabalho realizado em escala mundial denominado Estudo Internacional de Asma e Alergia em Crianças (ISAAC), revelou uma freqüência de 8,7% em escolares e de 13% em adolescentes no Brasil (CAMELO-NUNES et al, 2003).

Na última década, firmou-se o conceito de que a asma é uma enfermidade inflamatória e que está associada ao que se convencionou chamar de padrão de ativação celular do tipo "helper 2" (Th2, células T auxiliadoras). Esse padrão, também chamado perfil Th2, consiste na ativação de subtipos de linfócitos T CD4⁺ (Th) produtores de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 que auxiliam a troca de isotipos e a produção de anticorpos da classe IgE pelos linfócitos B. Inúmeros estudos experimentais e clínicos mostram a associação do perfil Th2 com doenças atópicas e também infestações helmínticas (YAZDANBAKHSI et al, 2002).

Em contraste, o perfil Th1 está associado com linfócitos T auxiliares produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-12 importantes para a

ativação de macrófagos. Esse perfil associa-se com a resistência a infecções bacterianas intracelulares e com outras situações como doenças auto-imunes e infecções virais. É conhecido que o início do evento de sinalização da célula T determina se os precursores desta célula apresentam um padrão Th1 ou Th2, ou seja, produção preferencial de IFN- γ ou IL-4, respectivamente. Mais recentemente outros perfis de secreção de citocinas têm sido descritos para os linfócitos T CD4⁺ (Th3, Tr1, Th17, etc) (REINHARDT et al, 2006).

A diferenciação de precursores de células T helper é determinada por diversos fatores como moléculas co-estimuladoras presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs). A ativação de células T requer a presença do primeiro sinal que ocorre através da ligação do receptor de célula T (TCR) com o antígeno leucocitário humano (HLA, ou complexo maior de histocompatibilidade, MHC, em camundongos). O segundo sinal se dá através da ligação das moléculas co-estimuladoras CD28, presentes nos linfócitos T, com as moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), presentes nas APCs (YANG et al, 2000).

A molécula CD28 está expressa na maioria das células T e a sinalização através de CD28 aumenta a proliferação de células T dependentes de IL-2, aumentando as funções efectoras dos linfócitos T, como produção de citocinas e citotoxicidade (ZDOLSEK & JENMALM, 2003). Trabalhos mostram que a estimulação de CD28 é crítica para que ocorra a diferenciação para o perfil Th2 (SAYEGH et al, 1995). Um estudo mostrou que o bloqueio de CD28 no início da ativação da célula T previne o desenvolvimento da resposta Th2, mas não da resposta Th1 (LENSCHOW et al, 1996).

Tem sido observado que CD28/CD80/CD86 têm importante papel na resposta Th2 e na produção de citocinas como IL-4 e IL-5 (MCARTHUR & RAULET, 1993). Van Rijt (2004) mostra que a ligação de CD28 presente em linfócitos T com CD80 e CD86 de células dendríticas

(DCs) é necessária para o primeiro sinal de células T naive, em células com perfil Th2.

Kuchroo (1995) sugere que a estimulação com CD80 induz a produção de citocinas do perfil Th1, enquanto que a estimulação com CD86 induz a produção de citocinas do perfil Th2. No entanto, várias moléculas na superfície de DCs como B7RP-1 (também conhecida como ICOSL), OX-40L, 4IBBL e CD40 têm sido reportadas por ter capacidade co-estimulatória e podem ser responsáveis pela indução de ativação na ausência de CD80/ CD86 (WATTS & DEBENEDETTE, 1999).

A molécula CD40 foi inicialmente identificada como receptor presente em células B que ativa o crescimento, a diferenciação e mantém a produção de anticorpos por esta célula. A sinalização por CD40 induz a produção de IL-12, a qual direciona células T CD4⁺ para um perfil predominante Th1, estimulando a produção de IFN- γ por estas células. A ligação de CD40 com o seu ligante (CD154), estimularia então o padrão Th1, diminuindo a produção de citocinas do perfil Th2 (HELLINGS et al, 2006; KROCZEK & HAMELMANN, 2005).

Como já foi citado, a ativação de células T depende da apresentação de antígenos no contexto da molécula HLA. Baseado nestas informações, crescem as evidências sobre o papel crucial das células dendríticas (DCs) no estabelecimento dos perfis de linfócitos T auxiliares (Th). As DCs possuem a capacidade de secretar citocinas e expressar diferentes moléculas co-estimulatórias, exercendo grande influência na qualidade e intensidade da resposta imune subsequente. Uma densa rede de DCs vem sendo identificada nas superfícies mucosas de animais e de humanos (CHEN et al, 2006). Um número aumentado de DCs presentes nas vias aéreas de pacientes atópicos pode indicar o importante papel da apresentação de antígenos no desenvolvimento da asma (UPHAM & STUMBLES, 2003). O'Doherty, em 1994, identifica dois subtipos de DCs, os quais denomina como mielóides e linfóides e mostra que esses dois subtipos influenciam de forma diferente células T naive. DCs mielóides expressam CD11c e

induzem preferencialmente a diferenciação para Th1, enquanto DCs linfóides expressam CD123 e são negativas para CD11c. DCs linfóides induzem preferencialmente a diferenciação para Th2 (ROBINSON et al, 1999). A participação de sub-populações distintas de DCs na diferenciação de outros padrões de linfócitos Th (Th3, Tr1 e Th17, por exemplo) não está ainda descrita.

O estabelecimento do perfil Th2 induz a liberação de citocinas, entre elas IL-4 e IL-13, ambas favorecendo a produção de IgE, o que leva conseqüentemente a elevados níveis séricos dessa imunoglobulina (AKBARI et al, 2003). A síntese de IgE frente aos alérgenos inalados se inicia com o processamento destes pelas células dendríticas encarregadas de apresentar o alérgeno processado aos linfócitos T e B (LORENTE et al, 2001). A ligação polivalente dos alérgenos com a IgE ligada aos mastócitos, provoca a liberação de histamina e outros mediadores farmacológicos levando a sintomatologia característica da asma (MIESCHER & VOGEL, 2002). Embora o papel da IgE já esteja bem estabelecido na patogênese da asma, o papel da IgG e de suas subclasses ainda é um assunto controverso. Vários investigadores têm atribuído papel protetor das subclasses de IgG, principalmente IgG4, a qual é produzida como resultado de uma exposição prolongada a antígenos (MORI et al, 2001).

Após constataremos a importância da IgE na asma, não podemos deixar de ressaltar também o importante papel do receptor de baixa afinidade desta imunoglobulina (CD23 ou FCεRII). Pesquisadores vêm mostrando que o maior papel do CD23 *in vivo* é como regulador negativo da produção de IgE (LEWIS et al, 2004). Lewis, em 2004, mostrou que camundongos NZB que não possuem o gene que codifica CD23 rapidamente desenvolveram fenótipo de hiper-produção de IgE, porém não há dados em humanos sobre esse receptor.

Indivíduos asmáticos também possuem quantidades aumentadas de eosinófilos na árvore brônquica, os quais possuem importante papel na inflamação alérgica, sendo capazes de liberar uma variedade de mediadores incluindo a eotaxina, assim como as quimiocinas CC e

CXC, expressando também seus receptores. Esses mediadores podem danificar as células epiteliais das vias aéreas, estimulando outras células, sendo então, amplificadores da resposta alérgica (ELSNER & FORSSMANN, 2002; OLIVEIRA & LUKACS, 2003). Confirmando esta hipótese, o aumento dos níveis de eotaxina encontrados no lavado bronquioalveolar de pacientes com asma alérgica foi correlacionado com o número de eosinófilos presente nesse fluido (ELSNER & FORSSMANN, 2002).

A predisposição para o desenvolvimento desse padrão inflamatório Th2 possui caráter genético e ocorre mais freqüentemente em indivíduos atópicos (AKBARI et al, 2001). Foram identificados vários genes associados com a asma e, desta forma, a história familiar é um critério largamente utilizado para identificação precoce de crianças com riscos para o desenvolvimento de atopia. Estudos realizados com pacientes que possuem história familiar de asma identificaram numerosas regiões cromossômicas e genes que podem contribuir para o seu futuro desenvolvimento. É improvável que estes genes possuam papel dominante, e por esta razão, a asma parece resultar da exposição de indivíduos geneticamente susceptíveis a determinados ambientes (BURKE et al, 2003; VERCELLI, 2003).

Dentro do contexto de interações entre código genético e exposição ao meio ambiente, foi postulada a “hipótese da higiene”, que vem sendo intensamente discutida nos últimos 7 a 8 anos, para explicar o significativo aumento da asma nas populações. Uma primeira versão dessa hipótese sugeria que a diminuição da ocorrência de infecções bacterianas nos primeiros anos de vida resultaria em insuficiente estimulação da resposta Th1, levando à predominância do padrão Th2. Favorecendo a produção de IgE em resposta aos alérgenos inalados e ingeridos, as células Th2 permitiriam o desenvolvimento de doenças atópicas em crianças com predisposição genética para tais distúrbios (MARTINEZ, 2001, SHAUB et al, 2006). Desta forma, a primeira versão da “hipótese da higiene” utilizava o desequilíbrio entre o

padrão de resposta Th1 e Th2 para explicar a relação inversa entre infecções e alergia (SHIRAKAWA et al, 1997; MATRICARDI et al, 2000).

Inúmeros dados comparando populações geneticamente muito próximas, tais como alemãs ocidentais e orientais, suecas e estonianas, chinesas de Hong Kong e de áreas rurais pouco desenvolvidas, mostram que existe uma tendência a taxas mais elevadas de asma nas sociedades afluentes (MARTINEZ, 2001). Trabalhos mostram que crianças das áreas rurais apresentam menor susceptibilidade a doenças atópicas, sugerindo que a exposição aos produtos bacterianos do meio ambiente possa influenciar no padrão de resposta imune. Esse padrão estimularia células Th1, que agem não somente no trato respiratório, mas também no trato intestinal, modulando o desenvolvimento da resposta imune nos primeiros anos de vida e podendo determinar padrões de doenças diferentes conforme o tipo de células T auxiliares (ou tipo de DCs já que um padrão influencia o outro) que foram estimuladas/não estimuladas nos primeiros anos de vida (VON EHRENSTEIN et al, 2000; MARTINEZ, 2001).

Por outro lado, a primeira versão da “hipótese da higiene” encontrou muitas limitações para explicar certos dados clínicos e epidemiológicos. Em 2002, Bager et al. mostram que crianças que apresentaram altas taxas de infecções durante os primeiros 2 anos de vida, desenvolveram também doenças atópicas. Os mesmos autores encontraram também uma alta incidência de atopia em crianças que tiveram sarampo nos primeiros anos de vida.

Assim, uma alternativa para a explicação da correlação inversa entre infecções e alergias é a de que infecções são necessárias para a ativação e expansão de células T reguladoras (Tregs). Essa seria uma segunda versão da “hipótese da higiene” (ROMAGNANI, 2004).

1.2 As células reguladoras e a tolerância

Várias células T com atividade reguladora têm sido descritas recentemente. Dentre elas podemos citar as chamadas “Tregs naturais” ou naturalmente ativadas, as células T CD4⁺CD25⁺, que participam na regulação da reatividade a autocomponentes. Essas células foram descritas em modelos com camundongos que apresentavam várias patologias autoimunes quando timectomizados no período neonatal (SAKAGUCHI et al, 1995). Vários trabalhos já comprovaram a participação das células CD4⁺CD25⁺ na imuno-regulação em várias doenças autoimunes em animais experimentais e em humanos (SHEVACH, 2000). Alguns estudos mostram que a atividade supressora das células T CD4⁺CD25⁺ não parece depender da produção de citocinas, mas do contato celular (TAKASHI et al, 1998). Porém, contradizendo esses dados, outros trabalhos mostram que a capacidade supressora das células CD4⁺CD25⁺ tímicas em humanos é parcialmente bloqueada com anti-TGF- β .

Podemos levantar, então, duas hipóteses: a) a função reguladora destas células pode ser mediada em parte por citocinas, em parte por contato célula-célula (OIDA et al, 2003); b) a citocina TGF- β pode ser importante na diferenciação de células T CD4⁺CD25⁺ embora não participe na sua ação efetora. Aparentemente, ambas as hipóteses são verdadeiras dependendo da população de células Treg analisadas. As células T CD4⁺CD25⁺ tímicas mediam sua função por contato celular (ITO et al, 1995). No entanto, as células T CD4⁺ reguladoras (CD25⁺ e CD25⁻) geradas na periferia podem agir via TGF- β secretado (células T CD4⁺ Th3; FARIA & WEINER, 2005) ou presente na membrana celular na sua forma latente. Essa forma de superfície é o precursor da citocina e está associada a um peptídeo (latency-associated peptide, LAP) que é clivado quando o TGF- β é secretado na forma ativa (ZHANG et al, 2005). Nakamura, em 2001, mostrou que células T CD4⁺ poderiam mediar sua função reguladora pela expressão de TGF- β de membrana na forma latente (NAKAMURA et al, 2001). O mesmo grupo, em 2004, mostrou

que células T CD4⁺LAP⁺, mas não células CD4⁺LAP⁻, são capazes de prevenir a colite induzida em camundongos SCID. Oida e colaboradores, em 2003, já haviam demonstrado que células CD4⁺CD25⁻LAP⁺ também apresentam atividade reguladora no mesmo modelo experimental de colite (OIDA et al, 2003). A partir desses dados, este autor afirma que o LAP pode servir também como marcador para Tregs.

Em geral, as células T CD4⁺ geradas no timo com fenótipo regulador expressam também o fator de transcrição forkhead 3 ou FOXP3. A importância deste fator é ressaltada em camundongos *scurfy* que não possuem células Treg e morrem dentro de 3 a 4 semanas. Similarmente, humanos com IPEX (*immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome*) que também apresentam mutações em FOXP3, desenvolvem uma gama de sintomas que são consistentes com a perda funcional de células T (CAMPELL & ZIEGLER, 2007). Uma parte das células T reg geradas na periferia também expressa esse fator de transcrição (FARIA e WEINER, 2005).

Estudos vêm apontando o papel das Tregs na atopia (LAFAILLE & LAFAILLE, 2004). A exposição crônica frente a antígenos freqüentemente induz resposta de IgG, com predominância para anticorpos IgG4 em indivíduos não atópicos, enquanto indivíduos atópicos respondem com a produção predominante de IgE. Lafaille, em 2002, mostra que camundongos que não expressam o CD23, desenvolvem uma condição de hiper produção de IgE após imunização, e podem ser protegidos pela administração de células CD4⁺CD25⁺, apresentando uma curva de dose-resposta, ou seja, quanto maior os números destas células, menores os níveis de IgE (LAFAILLE & LAFAILLE, 2002). Além dessas células, dois tipos principais de Tregs periféricas ou “adaptativas” têm sido citadas: as células Tr1, descritas em camundongos e em humanos cuja atividade supressora se deve à produção de altas concentrações de IL-10 (GROUX et al, 1997). Essas células foram descritas como importantes na imunorregulação da colite e estão também associadas à indução de tolerância pela administração de antígenos por via nasal (AKBARI et al., 2001). O segundo tipo de

células T regulatórias descrito são as células de perfil Th3. Essas células T são capazes de regular o balanço entre os padrões Th2 e Th1 através da secreção de citocinas imunossupressoras como IL-10 e, principalmente, TGF- β (WEINER, 2001). Como TGF- β é uma citocina de importância fundamental na regulação da reatividade imunológica da mucosa intestinal a antígenos derivados da dieta e da microbiota, e está presente no colostro e no leite materno (FARIA & WEINER, 1999), a análise da participação das células Th3 na interação materno-lactente em mães normais e asmáticas nos parece extremamente relevante.

1.3 A tolerância e as mucosas

As mucosas representam a via natural de contato do organismo com o meio e em condições fisiológicas, a maioria dos antígenos tem acesso ao sistema imune através destas superfícies. Somente a mucosa intestinal apresenta uma área 100 vezes maior que a área da pele, e diferentemente da pele, essa mucosa está recoberta por uma camada de células epiteliais com características adequadas à absorção (MOORE et al, 1981). Além da presença maciça de elementos linfóides na mucosa, existem várias evidências na literatura mostrando que a administração de antígenos por via oral ou nasal pode desencadear não somente eventos locais, como a produção de IgA secretória (NEUTRA et al, 1996), como também eventos imunológicos sistêmicos como a tolerância oral ou mesmo imunização sistêmica (VAZ et al, 1977; FARIA & WEINER, 1999). Esses dados, em conjunto, apontam as mucosas como sítio privilegiado para o estudo da fisiologia do sistema imune.

A presença de antígenos no trato gastrointestinal envolve sua captação e apresentação pela mucosa do intestino, através das células M presentes nos folículos linfóides (SANDERSON & WALKER, 1993; NEUTRA, 1998). APCs, tais como macrófagos e células dendríticas, estão posicionadas imediatamente abaixo das células M, no domo subepitelial, posição estratégica para uma eficiente captação,

processamento e apresentação de antígenos presentes no lúmen intestinal (GEWIRTZ & MADARA, 2001).

As DCs possuem alta capacidade fagocitária quando são ainda imaturas e são numerosas na região do domo sub-epitelial (SHREEDHAR et al, 2003). Após a captação de antígenos, elas se diferenciam em células apresentadoras de antígenos maduras com pouca capacidade de endocitose e migram através dos vasos linfáticos até os linfonodos regionais. Lá, DCs maduras interagem com linfócitos T locais desencadeando sua ativação e diferenciação em células efetoras. O destino dos linfócitos T ativados é controlado pelas circunstâncias nas quais eles reconhecem complexos peptídeos-MHC. Está claro, então, que as DCs devem estar continuamente envolvidas na manutenção da tolerância aos autocomponentes e aos componentes da dieta e da microbiota, assim como nos eventos súbitos das respostas inflamatórias (STEINMAN & NUSSENZWEIG, 2002). Estudos mostram que DCs imaturas podem participar na diferenciação de células T com características reguladoras, porém, o assunto ainda é controverso (JONULEIT et al, 2000). Outra hipótese apresentada é que sub-populações especializadas de DCs maduras poderiam desviar a atividade dos linfócitos T para um padrão regulador relacionado à tolerância (SHORTMAN & HEATH, 2001). Experimentos em tolerância induzida pela via nasal relatados por Akbari (2003) encontraram resultados distintos, demonstrando que a tolerância nasal é dependente da produção de IL-10 por células T ativadas por DCs plenamente maduras (AKABARI et al, 2001).

O MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) é um ambiente extremamente imunomodulado e, embora muito estimulado, é essencialmente não inflamatório em situações fisiológicas. Sugere-se que células T reguladoras intestinais produzam grandes concentrações de citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, e que o estímulo para essa produção seria dado através da interação de células T com DCs imaturas presentes nas placas de Peyer (WITTING & ZEITZ, 2003). TGF- β é considerado um fator chave na imunorregulação, e sabe-se que

ele é essencial na troca de isotipos para IgA pelos linfoblastos da mucosa e na indução de tolerância (RAUTAWA et al, 2002). É claro que a produção de IgA na mucosa é também dependente da ajuda de outras citocinas e contato com células T, visto que essa rede celular presente no MALT é altamente integrada pela expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão e pela produção de citocinas (WITTING & ZEITZ, 2003). A mucosa intestinal tem alto nível basal de IL-4, IL-10 e TGF- β , sendo que, esse microambiente pode ser crucial para um padrão Th2 ou Th3 no intestino. O motivo pelo qual uma reatividade do tipo Th2 e Th3 ocorre preferencialmente nas mucosas é ainda obscuro. Sabe-se que a apresentação de antígenos, feita principalmente pelas células dendríticas, exerce um importante papel na ativação das células T, que são as principais responsáveis pela secreção de citocinas, podendo assim, influenciar na geração deste tipo de reatividade (WEINER, 2001).

Analizando o sistema imune associado às mucosas e o papel chave do balanço entre células T dos diferentes padrões Th1, Th2 e Th3, observa-se que esse equilíbrio deve ser o grande responsável pela tolerância presente neste sítio altamente exposto a antígenos ambientais.

1.4 A tolerância e a gravidez

Com o intuito de elucidar o mecanismo de tolerância imunológica, pesquisadores vêm estudando situações fisiológicas, tais como a gravidez, que geram a homeostase do sistema imune frente a antígenos não próprios (WEINER, 2001; THELLIN & HEINEN, 2003). Um embrião é resultante da união entre indivíduos incompatíveis do ponto de vista imunológico. Ele tem sido comparado com um enxerto semi-alógeno o qual é tolerado por todo período da gestação (THELLIN et al, 2000). O contato íntimo entre tecido materno e fetal garante a nutrição do feto e a adaptação da mãe ao "enxerto", sendo que a placenta, composta de

estruturas maternas e fetais, consiste numa barreira de proteção e numa intensa zona de trocas metabólicas e celulares (ERLEBACHER, 2001).

Interações entre a mãe e o feto são bidirecionais, e o tecido feto-placentário necessita de ambiente adequado em condições de homeostase, enquanto que a mãe é influenciada por fatores de adaptação em seu metabolismo e seu sistema imune. O feto possui vários mecanismos de tolerância que agem em diferentes períodos do desenvolvimento, sendo que estes mecanismos agem à distância no sistema imune materno ou localmente no âmbito da placenta (THELLIN & HEINEN, 2003). Um dos mecanismos identificados foi a constatação de que o HLA de classe I tem sua expressão reduzida no sinciciotrofoblasto, ocorrendo a expressão do antígeno HLA-G, que é capaz de bloquear a atividade citolítica das células "Natural Killer" (NK) (MOREAU et al, 1998). Outro mecanismo descrito foi a presença de um mediador que apresenta atividade imunossupressora: a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase ou simplesmente IDO, que participa do metabolismo do triptofano, o qual é necessário para a ativação de células linfóides (MUNN et al, 1998)

É importante ressaltar que pesquisadores vêm apontando cada vez mais um papel das Treg na gravidez. Sasaki & Saito, em 2003, mostraram que ocorre o aumento do número de células CD4⁺CD25⁺ na decídua e no sangue periférico durante o início da gestação. Aluvihare (2004) mostra, em camundongos, o papel essencial das Treg na tolerância materno-fetal. Seu grupo mostra também a presença de células CD4⁺CD25⁺ no útero expressando FOXP3 (SAITO et al, 2005).

Dentro do balanço Th1/ Th2/ Th3 na gravidez e no período neonatal, há evidências da predominância das atividades definidas como Th2 e Th3, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ , que poderiam colocar a sobrevivência do feto em perigo (CLARK et al, 1999; RAGHUPATHY, 1997). Citocinas oriundas no padrão Th1 como TNF- α e IFN- γ são capazes de agir diretamente no sinciciotrofoblasto, podendo ser potentes indutores de abortamento

espontâneo, que levando à coagulação, impedem o fluxo sanguíneo materno local e agredem as estruturas feto-placentárias. Essas citocinas inibem o desenvolvimento fetal bem como a proliferação de linhagens de trofoblasto humano *in vitro* (CLARK & CROITORU, 2001). Quando injetadas em camundongos fêmeas grávidas, IL-2, IFN- γ e TNF α interrompem a gravidez, podendo danificar a placenta diretamente ou indiretamente via ativação de células citotóxicas (RAGHUPATHY, 1997).

Como já foi dito, células reguladoras Th3 secretam preferencialmente TGF- β , favorecem a troca de isotipo para IgA, e apresentam propriedades supressoras para Th1 e Th2 (WEINER, 2001). Desta forma, estudos vêm indicando que a predominância do padrão Th2/ Th3 é importante para o sucesso da gestação.

De fato, tem sido proposto que o papel das células Th3 seria o de controlar a reatividade dependente de Th1 via citocinas como IL-10 e TGF- β , e que diversos mecanismos ocorrem para esta reatividade (RAGHUPATHY, 1997). Bonney, em 2001, observou que a placenta pode ser capaz de produzir citocinas do tipo Th2/ Th3, assim com Heikkinen e colaboradores (2003) mostraram que macrófagos da decídua humana expressam HLA-DR com baixos níveis de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86, e propõem um papel central para essas células na regulação local da reatividade materna frente ao feto.

1.5 O padrão imunológico do neonato

Pesquisadores vêm constatando que não somente o sistema imune materno, mas também o ambiente imunológico neonatal tem sido considerado imunossupressor ou tolerogênico (RIDGE et al, 1996). Várias hipóteses têm aparecido ao longo desses anos para explicar a susceptibilidade aumentada na fase neonatal à indução de tolerância aos antígenos apresentados ao sistema imune, pois este é o período máximo da produção de linfócitos no timo, consistindo um elemento importante na aquisição da tolerância natural (RIDGE et al, 1996). No

entanto, vários aspectos do microambiente surgido logo após o nascimento, têm sido apontados como fatores determinantes dessa atividade preferencialmente imunossupressora do neonato. Embora já tenha sido demonstrado que respostas imunes inflamatórias podem ser estimuladas em animais neonatos, a maior parte dos encontros antigênicos durante o período fetal e neonatal leva ao desencadeamento de tolerância (RIDGE et al, 1996).

No entanto, linfócitos T de animais neonatos estimulados *in vitro* proliferam bem especialmente em presença de IL-4 e IL-7, indicando seu grau precário de maturação, e também sua susceptibilidade aumentada à ativação (ADKINS, 1999). Além disto, eles produzem quantidades grandes de citocinas, embora com um desvio drástico com relação à produção de IL-4 e IL-10 e uma clara deficiência na produção de IFN- γ e TNF- α . Há várias evidências *in vivo* mostrando uma tendência para a produção de respostas do tipo Th2 (com predominante secreção de IL-4 e IL-10) em camundongos no período pré-desmame (FORSTHUBERL et al, 1996). Confirmando esses dados, estudos constataram que os linfócitos T de neonatos humanos apresentam um desvio para um padrão Th2 quando comparados com linfócitos T de adultos (HOLT, 1997; PRESCOTT et al, 1998). Assim, longe de se encontrar em um estado de anergia e imunodeficiência, a atividade dos linfócitos T apresenta um padrão diferente do adulto, que tende a produzir uma concentração maior de citocinas como IFN- γ e TNF- α (MURRAY, 1998).

Abordando a imunidade neonatal, não se pode deixar de considerar a potencial influência do leite humano, secreção rica em anticorpos protetores, e também de células e elementos imunomoduladores, tais como as citocinas e os fatores de crescimento. Estudos vêm demonstrando que células presentes no leite humano também podem produzir citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β e TNF- α . As citocinas no leite humano não somente influenciam o sistema imune do neonato, mas também são importantes para o seu desenvolvimento adequado (DAHLGERN et al, 2001). A importância do

TGF- β proveniente do leite materno pode ser observada em experimentos em camundongos deficientes de TGF- β , que sobrevivem durante o período de amamentação, mas morrem após esse período de múltiplas doenças inflamatórias, comprovando o efeito imunossupressor deste fator de crescimento (CUMMINS & THOMPSON, 1997). Outra indicação de que as células do leite modulam o sistema imune é que crianças que foram amamentadas e necessitam de transplante renal têm sua sobrevivência aumentada quando recebem os rins de suas próprias mães (CAMPBELL et al, 1984; KOIS et al, 1984). Esses achados nos mostram que eventos imunossupressores e tolerogênicos acontecem durante as várias fases da gestação, concepção e aleitamento materno.

Apesar do papel protetor anti-infeccioso incontestável do leite materno constatado em diversos estudos clínicos e epidemiológicos, a proteção que o leite materno confere à criança frente a doenças atópicas ainda é um ponto controverso. Alguns trabalhos indicam que o leite humano confere proteção contra doenças atópicas como a Asma, rinite alérgica, eczema atópico e alergia alimentar (GDALEVICH et al, 2001; HALKEN & HOST, 2001). Gdalevich, em 2001, realizou um estudo de meta análise sobre a relação do aleitamento exclusivo durante os primeiros três meses de vida, onde foram analisados 177 trabalhos oriundos de vários países, e observou que apesar das controvérsias, o leite humano oferece uma substancial proteção contra o desenvolvimento de doenças atópicas como a asma.

Contradizendo estes dados, Järvinen, em 2002, observou que o conteúdo celular de mães atópicas difere do de mães saudáveis, havendo uma quantidade maior de neutrófilos e eosinófilos no leite de mães atópicas. Este autor sugere que o leite de mães atópicas pode causar uma maior predisposição ao desenvolvimento de atopias em suas crianças. Atualmente este assunto continua controverso e necessitando assim de mais estudos. Em 2003, Laiho observou que o TGF- β tem papel chave na prevenção de doenças atópicas e que a concentração reduzida de TGF- β observada no leite de mães atópicas

pode interferir negativamente no bom desenvolvimento do sistema imune de mucosas do neonato.

Visto que ocorre uma intensa inter-relação entre mãe e filho, tanto no ambiente intrauterino quanto durante o aleitamento, é legítimo supor que a modulação do sistema imune da criança possa ser influenciada pelo padrão imunológico apresentado por sua mãe. Devido aos dados apresentados, consideramos de grande importância o estudo não só do conteúdo de citocinas, como também a presença de células no leite materno (LAIHO et al, 2003). O leite humano é o único fluido corporal que contém grande número de macrófagos, e que assim como em outros tecidos, derivam dos monócitos do sangue periférico, os quais migram para o epitélio das glândulas mamárias e são secretados no leite. Esses macrófagos mostram alta atividade fagocítica e ingerem uma variedade de componentes do leite humano, resultando no acúmulo citoplasmático de inclusões lipídicas (PITT, 1979; ICHIKAWA et al, 2003).

Ichikawa, em 2003, mostrou que macrófagos do leite humano, mas não monócitos do sangue periférico, foram capazes de produzir fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) espontaneamente e se diferenciaram em DCs CD1⁺ pela estimulação de IL-4 exógena, indicando que o acúmulo de inclusões lipídicas favorece a diferenciação dos macrófagos para DCs. Diante deste fato, este autor reitera a grande importância da apresentação de antígenos no desenvolvimento de doenças atópicas. Em 1999, Randolph e colaboradores, mostram que alguns macrófagos dos tecidos possuem a capacidade de se diferenciar em DCs capazes de estimular células T, migrando para as áreas de células T dos linfonodos drenantes.

Em virtude das informações apresentadas, este trabalho tem como objetivo estudar os possíveis mecanismos geradores de tais diferenças nos perfis de respostas Th1, Th2 e Th3 na gestante asmática e como consequência, no seu recém-nascido. Nossa hipótese de estudo é que os padrões imunológicos associados à asma na mãe possam influenciar, via sangue periférico e via colostro, o desenvolvimento do

sistema imune da criança e, conseqüentemente, o estabelecimento de um quadro asmático posterior. Pretendemos realizar nosso estudo comparando o padrão imunológico de mães asmáticas (que apresentam predominância do padrão Th2) e mães saudáveis com o padrão dos seus respectivos recém nascidos. O objetivo deste estudo comparativo é analisar os fatores determinantes no estabelecimento do padrão Th2 em crianças com potencial genético para atopia. Este estudo poderá ter conseqüências importantes para o desenvolvimento de medidas mais eficazes de prevenção da asma infantil.

2 OBJETIVO GERAL

Comparar os padrões imunológicos de células e imunoglobulinas em sangue e colostro de mães asmáticas e de mães saudáveis, com os padrões do sangue de cordão umbilical de seus respectivos recém-nascidos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar, quantificar e comparar no colostro e sangue da mãe e no sangue do cordão umbilical, células e moléculas indicativos dos padrões Th1, Th2 e Th3 utilizando os seguintes parâmetros:

2.1.1 Presença de IgM e IgG no sangue da mãe e no sangue do cordão e IgA e IgM no colostro

2.1.2 Imunofenotipagem dos linfócitos B, T e das células dendríticas.

2.1.3 Padrão de citocinas intracelulares e no sobrenadante de cultura de células estimuladas com o antígeno do *Staphylococcus aureus* (SEB)

METODOLOGIA

3.1 CASUÍSTICA

Puérperas clinicamente sadias foram selecionadas na Maternidade do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, utilizando-se os seguintes critérios: idade entre 18 e 35 anos, ausência de atopia e de doenças sistêmicas como diabetes ou hipertensão, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e Sífilis, idade gestacional entre 38 e 41 semanas; recém-nascidos sadios a termo com peso adequado para a idade gestacional (RNT/ AIG). Foram coletados, no total, material de 19 puérperas saudáveis.

As puérperas asmáticas foram selecionadas utilizando-se os seguintes critérios: idade entre 18 e 35 anos, diagnóstico prévio de asma brônquica, leve, moderada ou grave. Foram coletados, no total, material de 19 puérperas asmáticas. O diagnóstico de asma foi

realizado de acordo com o GINA (*Global Initiative for Asthma*) atualizado em 2002. A classificação da gravidade da asma foi estabelecida de acordo com o tipo e frequência dos sintomas com base nas diretrizes apontadas pelo GINA se encontra na **tabela 1**.

As medicações em uso foram anotadas com detalhes e foram excluídas as puérperas em uso de corticosteróides por via oral ou parenteral por período superior a uma semana.

Tabela 1: Classificação da gravidade da asma de acordo com GINA (*Global Initiative for Asthma*).

Frequência dos sintomas de asma	Persistente severa	Persistente moderada	Persistente leve	Intermitente
Episódios Diurnos	3X / d	Diariamente ($\leq 2X$ / d)	$\geq 2X$ / semana	$< 2 X$ / semana
Episódios Noturnos	Toda noite / quase toda noite	$\geq 2 X$ / semana	$\geq 2 X$ / mês	$< 2 X$ / mês
Episódios severos nos últimos 12 meses	Diariamente	Diariamente	$\geq 2 X$ / mês	$\leq 1 X$ / mês
Sintomas induzidos por exercícios nos últimos 12 meses	Diariamente	Diariamente	$\geq 2 X$ / mês	$\leq 1 X$ / mês
Frequência de sintomas durante semana típica	8-21 X / semana	7-20 X / semana	3-6 X / semana	$\leq 2 X$ / semana

Fonte: J Allergy Clin Immunol, v.114; n. 1; 2004.

Para confirmar o diagnóstico de asma atópica, realizamos a medida de IgE total, IgE específica para alérgenos presentes na poeira doméstica (HX2 – uma mistura de alérgenos do *D. pteronissinus*, *D. farinae*, pó doméstico e barata) e de IgE específica para o *D. Pteronissinus* (Derp-1). Mães com níveis de IgE total abaixo de 113 U/ml (Zetterstrom, 1981) foram excluídas do estudo.

Cada mãe foi informada dos objetivos do projeto e para que sua amostra seria destinada, e a coleta só foi efetuada após o seu consentimento (parecer do comitê de ética em anexo - e o termo de consentimento também deve estar em anexo). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, assim

como pelos comitês de ética do Hospital Universitário e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

O sangue materno foi coletado de veia periférica, por ocasião do trabalho de parto, aproveitando-se o acesso venoso para administração de medicações e/ou coleta de exames. O sangue de cordão umbilical foi obtido imediatamente após o clampeamento e secção do mesmo. O sangue coletado foi distribuído parte em tubo heparinizado, parte em tubo com EDTA e parte em tubo com gel separador para a obtenção do soro, que foi aliquotado e armazenado a -70°C. A coleta do colostro foi efetuada por ordenha manual nas primeiras 48 horas após o parto em tubo Falcon e transportado imediatamente ao laboratório sob refrigeração.

3.2 CONCENTRAÇÕES DE IMUNOGLOBULINAS DO SANGUE DAS PUÉRPERAS, SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E COLOSTRO

Os isotipos IgM, IgG, IgG2 e IgG4 foram medidos nas amostras de soro da mãe e do cordão. O isotipo IgA foi medido no soro da mãe e no colostro. As análises de IgA, IgM e IgG total foram feitas através de imunodifusão radial (técnica de Mancini et al, 1965). A medida das subclasses de IgG (IgG2 e IgG4) foram realizadas por nefelometria utilizando nefelômetro Behring (BN Prospeg) com padrões e controles apropriados. As medidas de imunoglobulinas foram efetuadas segundo protocolo de ensaio para Nefelômetro (Behringer, EUA). As amostras de soro dos pacientes foram diluídas conforme instruções do fabricante (Behringer, EUA).

Os controles, padrões, as soluções tampão e diluentes, assim como os anticorpos monoclonais utilizados foram obtidos diretamente do fabricante (Dade Behringer, EUA). A medida de IgE total, assim como a medida de IgE específica para o *Dermatophagoides pteronissinus* (Derp-1), HX2 e *Ascaris* (P1) foram realizadas pelo *Radio Allergo Sorbent Test* (RAST).

3.4 IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS

O sangue foi coletado em tubos com EDTA. Aliquotas de 200 µL de sangue foram separadas e marcadas com anticorpos específicos para moléculas de superfície celular capazes de discriminar tipos e subtipos celulares (p.ex., CD19, CD4) assim como atividade funcional da célula (p.ex., HLA-DR, CD40). Após incubação por 30 minutos, foi realizada a lise das hemácias com Solução e BD Facs™ Lysing Solution (BD Bioscience, USA). Após a lise, as células foram lavadas 2 vezes com tampão de lavagem com 2% de soro fetal bovino. As suspensões celulares foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, CA), onde foram analisados 20.000 eventos no *gate* de linfócitos e, para análise de células dendríticas, 500.000 eventos foram adquiridos. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o programa CellQuest (BD Bioscience, USA). Os anticorpos usados na fenotipagem dos leucócitos estão na **tabela 2**:

Tabela 2: Listagem de anticorpos utilizados nos ensaios de imunofenotipagem.

Anticorpo	Marca	Concentração
Anti-CD3 PE Cy5	Pharmingen	1/20
Anti-CD4 PE Cy5	Pharmingen	1/10
Anti-CD4 FitC	Pharmingen	1/10
Anti-CD8 FitC	Pharmingen	1/20
Anti-CD8 PE	Pharmingen	1/20
Anti-CD5 PE	Pharmingen	1/20
Anti-CD11c PE	Pharmingen	1/20
Anti-CD11c PE Cy5	Pharmingen	1/20
Anti-CD19 FitC	Pharmingen	1/20
Anti-CD23 PE	Pharmingen	1/20
Anti-HLA-DR FitC	Pharmingen	1/20
Anti-CD28 PE	Pharmingen	1/20
Anti-CD40 PE Cy5	Pharmingen	1/20
Anti-CD45RA PE	Pharmingen	1/20
Anti-CD80 PE	Pharmingen	1/20
Anti-CD86 FitC	Pharmingen	1/20
Anti-CD123 PE Cy5	Pharmingen	1/20
Anti-CD154 PE	Pharmingen	1/20

As marcações realizadas no presente trabalho estão listados na **tabela 3**.

Tabela 3: Marcações realizadas nos ensaios de imunofenotipagem.

Anticorpos	Marcação
CD3/CD4/CD8	População de linfócitos auxiliares e citotóxicos
CD4/ CD8/ CD28	Molécula co-estimulatória CD28 em linfócito T
CD3/ CD4/ CD8/ CD154	Molécula co-estimulatória CD154 (CD40L) em linfócitos auxiliares e citotóxicos
CD19/ CD23/ CD40	Receptor de baixa afinidade de IgE e molécula co-estimulatória CD40 em linfócito B
CD19/ CD5/ IgM / CD27	População de memória em linfócito B1 e B2
CD3/ CD4/ CD45RA/ CCR7	População de memória em linfócito T
CD4/ CD8/ CD45RA/ CD27	População de memória em linfócito T
Lin 1/ HLA-DR/ CD11c/ CD80	Molécula co-estimulatória CD80 em Células dendríticas mielóides
Lin 1/ HLA-DR/ CD11c/ CD86	Molécula co-estimulatória CD86 em Células dendríticas mielóides
Lin 1/ HLA-DR/ CD123/ CD80	Molécula co-estimulatória CD80 em Células dendríticas linfóides
Lin 1/ HLA-DR/ CD123/ CD86	Molécula co-estimulatória CD86 em Células dendríticas linfóides

3.5 PADRÃO INTRACELULAR E NO SOBRENADANTE DE CITOCINAS

3.5.1 Obtenção e congelamento de células mononucleares do sangue:

Células mononucleares do sangue periférico da mãe e do sangue do cordão umbilical foram isoladas por gradiente de densidade em solução de Ficoll-Hypaque. A contagem das células foi feita com auxílio da câmara de Neubauer e a viabilidade celular verificada pela utilização do Azul de Trypan (Sigma Chemical Co, USA). Realizou-se o congelamento das células no nitrogênio líquido em solução de congelamento contendo 10% de DMSO e 90% de soro fetal bovino (SFB).

A partir dessa técnica, foi realizado o ensaio de obtenção do sobrenadante de cultura celular para medida de citocinas e ensaio de marcação intracelular de citocinas.

3.5.2 Análise intracelular de citocinas em células mononucleares do sangue da mãe e do cordão após estimulação *in vitro*

Após o descongelamento, as células foram lavadas rapidamente em meio DMEM suplementado com 5% de soro AB humano. Novamente foi realizada a contagem das células com Azul de Trypan (Sigma Chemical Co, USA), onde se verificou a viabilidade celular. As células foram estimuladas com 2 µg/ ml de SEB (enterotoxina B do *Staphylococcus aureus*– Sigma, MO, USA), e cultivadas por 12 horas para medida de IFN-γ e 72 horas para medida de IL-4 e IL-13 em tubos de polipropileno numa concentração de 2x10⁶ células/ ml em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Nas últimas 12 horas, foi adicionado 1µl de BD golgi Plug (BD Bioscience, USA), pois esse reagente contém Brefeldina A, a qual paralisa a exportação de proteínas pelo complexo de Golgi e, portanto, retém as citocinas no interior desse complexo. Após a incubação, centrifugou-se a cultura por 10 minutos, a 1800 RPM a 18°C. Foram adicionados os anticorpos para marcação de superfície anti-CD3 marcado com PE Cy5 e anti-CD4 marcado com FitC com posterior incubação por 30 minutos. As células foram centrifugadas por 10 minutos, a 1800 rpm a 18°C. O sobrenadante foi descartado e as células, então, fixadas com BD Cytophix/ Cytopherm (solução contendo paraformaldeído como fixador e saponina, um detergente capaz de permeabilizar a célula) por 20 minutos. As células foram lavadas com solução *perm wash* (BD) 1x e foram adicionados os anticorpos anti-IFN-γ, IL-4 e IL-13, todos marcados com PE e utilizados na concentração de 1/20, realizando-se em seguida uma incubação por 30 minutos. As células foram lavadas e ressuspensas com PBS SFB 2% por 2 vezes. No final, a mistura celular foi ressuspensa com 200µl de solução PBS com 2% de SFB. As suspensões celulares a serem adquiridas foram transferidas para tubos de 5 ml e, posteriormente, submetidas à aquisição no citômetro de fluxo onde foram adquiridos 10.000 eventos no

gate de linfócitos. (FACScan-Becton-Dickinson). A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o programa CellQuest.

3.5.3 Medida de citocinas do sobrenadante de cultura celular

No momento em que as células mononucleares das mães e do seu cordão foram descongeladas para ser realizado o ensaio de marcação intracelular de citocinas, uma alíquota de 1×10^6 foi utilizada para que fosse realizada a medida dos níveis de citocinas no sobrenadante celular.

PBMC foram cultivadas numa concentração de 1×10^6 células/ ml em placa de cultura celular de 96 *wells* (Costar, EUA) na presença de 10 µg/ ml de PHA durante 48 horas. Após esse período, os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados em freezer -70°C para medida de citocinas. As citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ foram medidas por *Cytometric Bead Array* e a citocina IL12p70 foi medida pelo kit *OptEIA* ambos da BD (BD Bioscience, USA).

As medidas realizadas pelo método CBA foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante com posterior análise em citometria de fluxo BD FACSCalibur™ usando o software BD CBA. Primeiramente, foi realizada a obtenção da mistura dos *beads* magnéticos. Uma alíquota de 20 µL dessa mistura foi colocada em tubos para leitura em citômetro. Os *beads* conjugados a cada anticorpo têm intensidades de fluorescência diferentes; apresentando-se em uma ordem crescente de fluorescência as citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ . Após essa etapa, foi adicionado 50 µL da amostra em seu respectivo tubo previamente identificado. Adicionou-se, então, os anticorpos conjugados com o fluorocromo PE e reativos com as citocinas citadas. A mistura contendo os *beads* com anticorpos anti-citocinas, as amostras e os anticorpos conjugados com PE foi incubada por 3 horas no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação, os tubos foram lavados e centrifugados por 1500 rpm por 5 minutos foi realizada a aquisição 1800 eventos no *gate* indicado pelo fabricante.

A medida de IL-12p70 foi realizada pelo kit *OptEIA* da BD (BD Bioscience, USA) como descrito a seguir. Placas de 96 wells (Maxisorp, Nunc.) foram revestidas com o anticorpo de captura anti-IL-12p70 na concentração de 1/250. A placa foi incubada *overnight* em câmara úmida e à temperatura de 4°C. No dia seguinte, após a lavagem com PBS contendo 0,1% de *Tween*, realizou-se o bloqueio com tampão PBS contendo 5% de BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação e lavagem, as amostras puras foram colocadas na placa e foi realizada a diluição seriada. A placa foi incubada *overnight* em câmara úmida e à temperatura de 4°C. No dia seguinte, após a lavagem, colocou-se o anticorpo conjugado com streptavidina e incubou-se à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, foi adicionado o TMB responsável pela coloração da placa. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico e lida em leitor óptico utilizando-se filtro de 450nm.

3.6 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO COLOSTRO

3.6.1 Obtenção de células mononucleares do colostro:

As amostras de colostro foram coletadas com volume variando entre 5 a 20 ml. Essas amostras foram transportadas para o laboratório em banho de gelo, onde o colostro foi centrifugado por 10 minutos a 1800 rpm sob refrigeração a 4°C. Após centrifugação, foi coletado o “botão” celular. As células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM (Sigma St. Louis, USA) e separadas em gradiente de densidade com Ficoll Paque (Pharmacia) por 45 minutos a 1800 rpm a 4°C, formando um anel rico em células mononucleares na interface entre o meio de cultura e o Ficoll-Paque. As células foram retiradas, lavadas duas vezes em meio de cultura DMEM e, então, realizou-se a sua contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi verificada pela utilização de Azul de Trypan (Sigma Co, USA). As células foram congeladas em nitrogênio líquido em solução de congelamento contendo 10% de DMSO e 90% SFB.

3.6.2 Imunofenotipagem das células do colostro

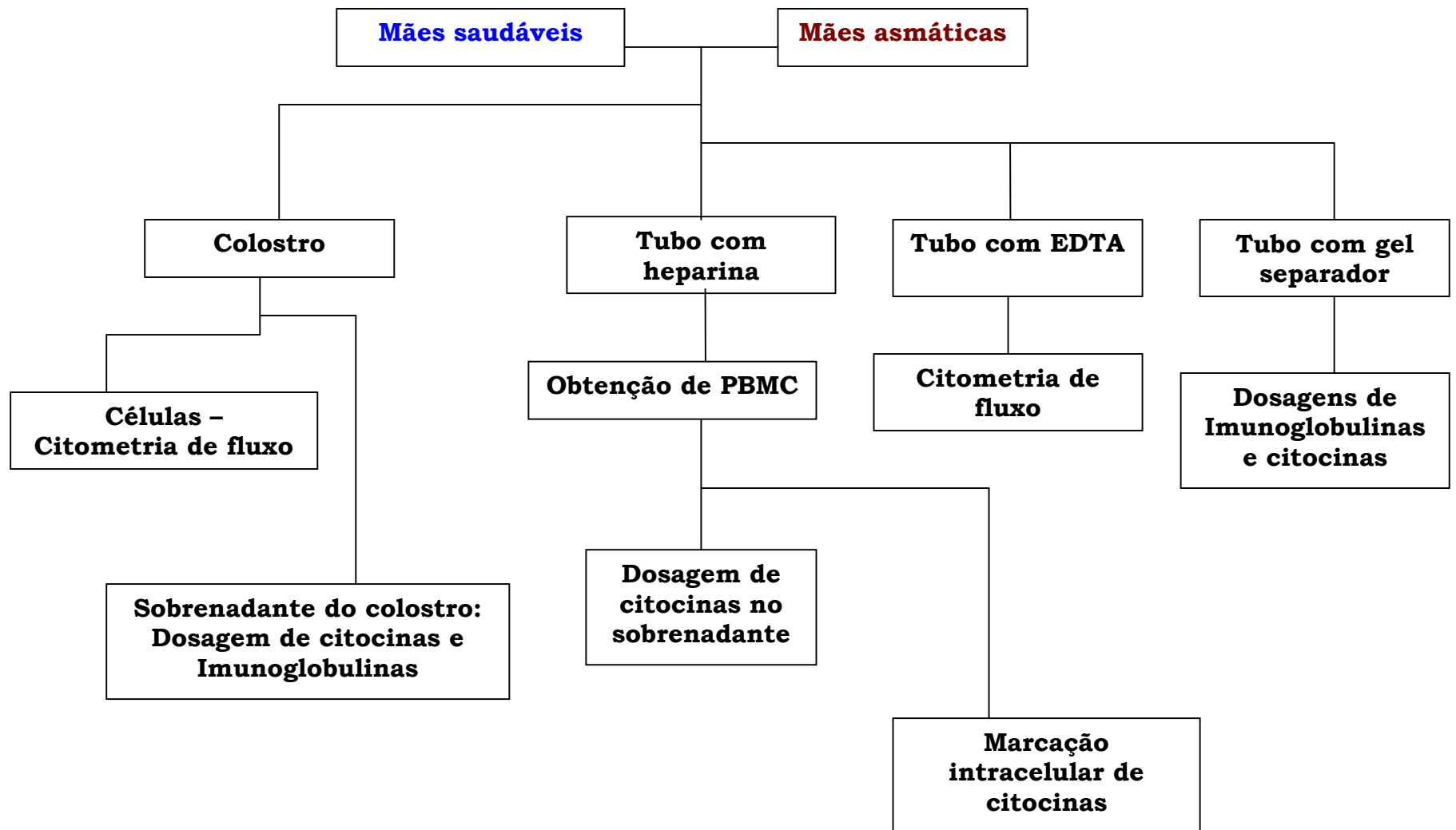
As células foram descongeladas e lavadas rapidamente em meio DMEM suplementado. Novamente realizou-se a contagem com Azul de Trypan (Sigma Co, USA) para avaliar a viabilidade celular. As células foram então marcadas com anticorpos específicos para marcadores de superfície celular determinados. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScan – Becton Dickinson, CA), onde foram analisados 10.000 eventos. A análise dos resultados foi feita utilizando-se o programa CellQuest.

3.7 MEDIDAS DE CITOCINAS NO COLOSTRO

Após a coleta manual, as amostras de colostro foram centrifugadas a 3400 rpm a 4°C. Retirou-se então o sobrenadante do colostro e descartou-se a camada de gordura. O colostro foi dividido em alíquotas de 500 µl em microtubos e congelado a -70°C. A citocina IL12p70 foi determinada através do kit *OptEIA* da BD (BD Bioscience, USA), conforme descrito no item 3.5.3. As citocinas IL-2, TNF- α , IL-4, IL-5, IFN- γ e IL-10 foram medidas pelo método de *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Bioscience, USA) conforme descrito no item 3.5.3.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva está representada pela mediana. As comparações estatísticas entre 2 grupos (mãe e cordão; mãe asmática e mãe saudável) foram realizadas pelo teste T não paramétrico (*Mann-Whitney*). As comparações estatísticas entre 4 grupos (células sem estímulo e células com estímulo) foram realizadas pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. A correlação entre as imunoglobulinas foi testada de acordo com o *Spearman "r" coefficient*.



4 RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÕES DE IMUNOGLOBULINAS DO SANGUE DAS PUÉRPERAS, SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E COLOSTRO

As mães asmáticas que participaram do trabalho chegaram à maternidade do HCUSP com o diagnóstico prévio de asma. A **tabela 4** mostra a classificação da gravidade da asma das mães participantes do trabalho, de acordo com critério do GINA (*Global Initiative for Asthma*).

Classificação da gravidade	Pacientes
Asma leve	7 (33,3%)
Asma moderada	5 (23,8%)
Asma grave	5 (23,8%)
Asma intermitente	4 (19,04%)

Tabela 4: Diagnóstico de gravidade da asma das mães asmáticas participantes deste estudo.

É importante também salientar que, das 21 pacientes estudadas no presente estudo, no momento da coleta 8 pacientes não faziam uso de medicamentos, 8 pacientes utilizavam medicação via nasal e somente 5 faziam uso de corticóides sistêmicos por um período inferior a uma semana.

Numa segunda triagem, foram feitas medidas de IgE total e específica (RAST), na tentativa de delinear o trabalho somente com a participação de mães consideradas atópicas. De acordo com Zetterstrom (1981), são considerados níveis elevados de IgE, aqueles acima de 113

U/ml, portanto, mães asmáticas com níveis abaixo desse valor, foram excluídas do trabalho.

Em nossas medidas das concentrações séricas, observamos que mães asmáticas e seus RNs possuem níveis elevados de IgE total ($P = 0,0001$ e $P = 0,0153$ respectivamente), quando comparamos com os níveis séricos encontrados em mães e RN saudáveis. Resultados semelhantes foram observados quando analisamos os níveis de IgE anti-Derp-1 ($P = 0,0001$), e IgE anti-HX2 ($P = 0,0013$) nas amostras de mães asmáticas, mas essa diferença, estatisticamente significativa, não foi verificada nas dosagens específicas de seus RNs, quando comparamos com RNs saudáveis. No entanto, observamos que nem toda mãe asmática, possuidora de níveis elevados de IgE, possuía IgE específica para os dois antígenos estudados. Os resultados estão presentes na **figura 1**.

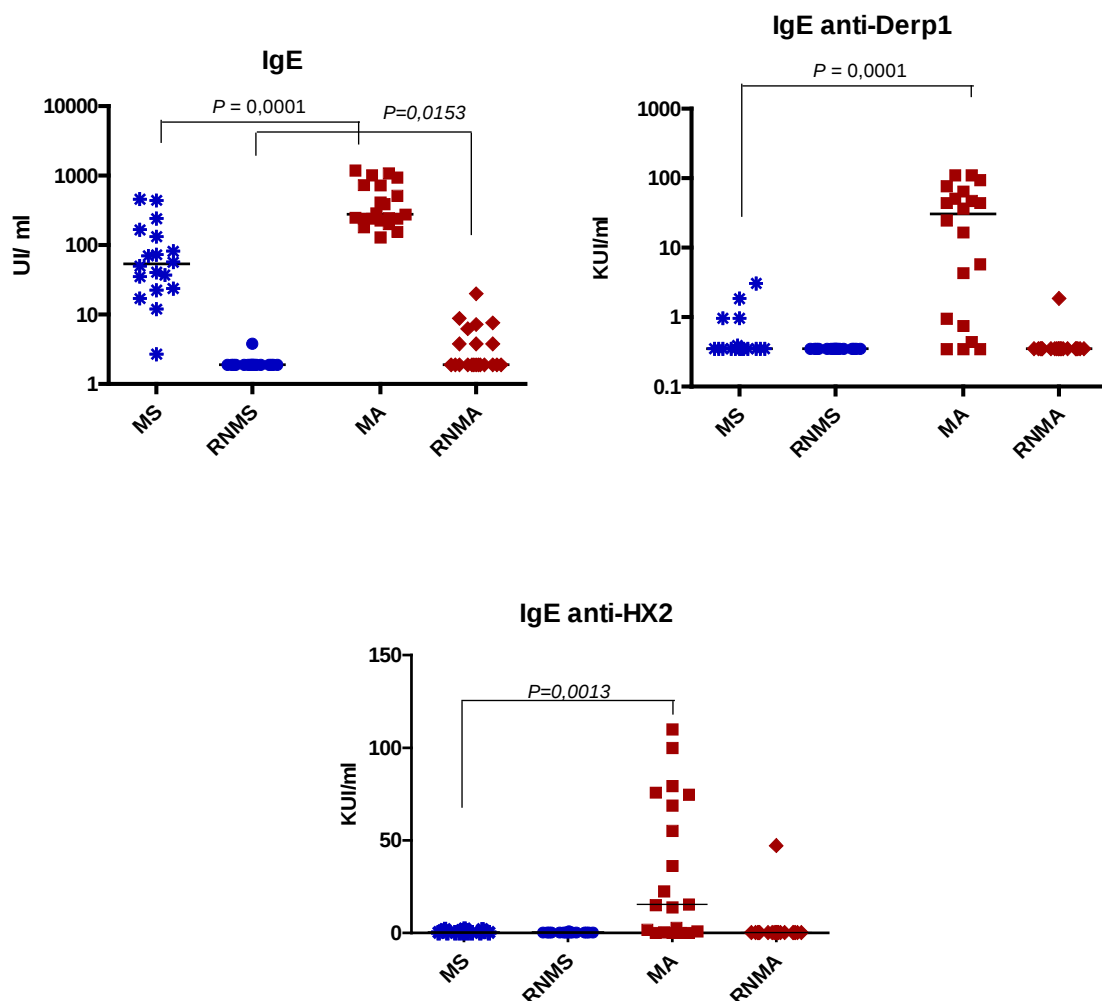


Figura 1: Medida de IgE total (UI/ml), IgE específica para Derp-1 (KUI/ml) e IgE específica para HX2 (KUI/ml) no soro das mães, saudáveis e asmáticas, e no soro de cordão de seus respectivos recém-nascidos (RNs). A dosagem de IgE foi feita por nefelometria, e as dosagens de IgE específica para Derp-1 e HX2 foi feita pelo RAST. **MS:** Mãe saudável; **RNMS:** RN de mãe saudável; **MA:** mãe asmática; **RNMA:** RN de mãe asmática (n população asmática = 18; n. população saudável = 20).

Como citado anteriormente, na asma ocorre um desbalanço do padrão Th1/ Th2 com polarização e predomínio de citocinas como IL-4, IL5 e IL-13 (Th2). Tal desequilíbrio afeta também os mecanismos fisiológicos de produção de imunoglobulinas como IgM, IgG e IgA (Ribeiro, 1999). Os resultados das medidas de IgM no colostro e soro

das mães e de seus RNs indicam que mães saudáveis possuem níveis mais elevados desta imunoglobulina no soro quando comparado com mães asmáticas. No entanto, não observamos o mesmo resultado em relação aos RNs e ao colostro. (**Figura 2**).

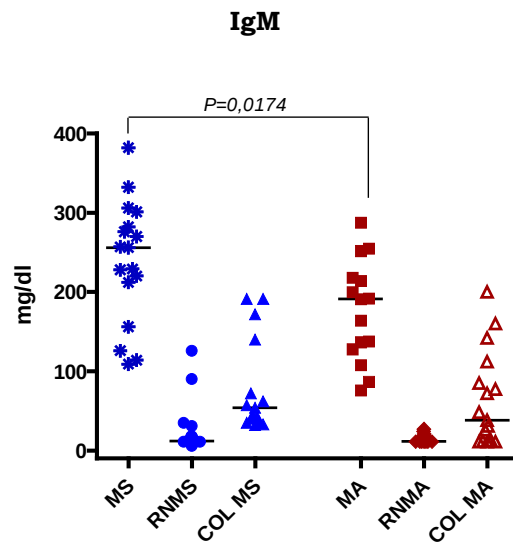


Figura 2: Medida de IgM (mg/dl).no soro e no colostro de mães saudáveis e asmáticas e no soro de cordão de seus respectivos RNs. A medida foi realizada por Imunodifusão Radial. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **COL MS:** Colostro de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas; **COL MA:** Colostro de mães asmáticas (n população saudável = 18; n. população asmática = 20).

Os resultados das medidas de IgA no soro e no colostro materno mostram que não há diferenças, estatisticamente significativas, entre os níveis dessa imunoglobulina, quando comparamos mães asmáticas com mães saudáveis (**Figura 3**).

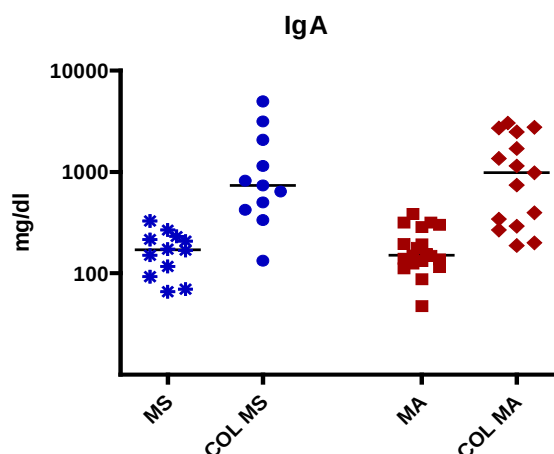


Figura 3: Medida de IgA (mg/dl) no soro e colostro materno. A medida foi realizada por Imunodifusão Radial. **MS:** Mães saudáveis; **COL MS:** Colostro de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **COL MA:** Colostro de mães asmáticas (n população saudável = 13; n. população asmática = 15).

Como vários trabalhos atestam, fatores maternos influenciam o desenvolvimento da imunidade neonatal. Os anticorpos IgG que passam pela placenta podem influenciar o desenvolvimento da resposta imune aos mesmos alérgenos (Prescott, 2000). Em relação às subclasses de IgG, o assunto ainda é controverso. Enquanto alguns estudos indicam que as subclasses IgG1 e IgG4 apresentam papel no desencadeamento do evento atópico (Jenmalm, 1999), outros estudos indicam que essas subclasses, principalmente IgG4, teriam efeito protetor, pois os plasmócitos que produzem IgG4, não produzem IgE (Mori, 2001).

Os resultados das medidas de IgG, IgG2 e IgG4 totais no soro materno e no soro de cordão de seus respectivos recém-nascidos, mostram uma menor produção de IgG pelas mães asmáticas (MS *vs.* MA $P = 0,0132$). Curiosamente, o mesmo resultado não é observado quando comparamos os RNs de mães saudáveis com RNs de mães asmáticas (RNMS *vs.* RNMA $P = 0,0903$). Porém, quando comparamos o conjunto de mães saudáveis com seus RNs e mães asmáticas com seus

RNs observamos diferença estatisticamente significativas (MS + RNMS vs MA + RNMA $P=0,0356$). Os níveis das subclasses IgG2 e IgG4 não apresentam diferenças, estatisticamente significativas, entre os dois grupos. Os resultados estão apresentados na **figura 4**.

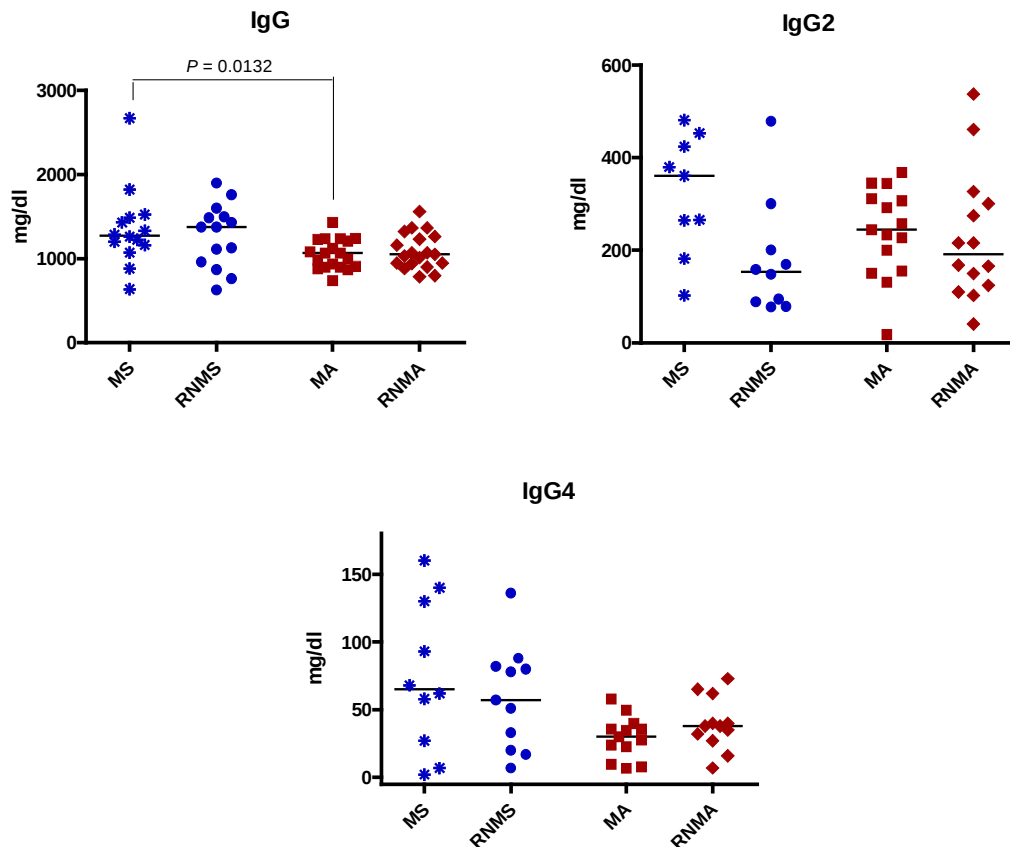


Figura 4: Medidas de IgG, IgG2 e IgG4 no soro materno e no soro de cordão de seus respectivos RNs. As medidas de IgG foram feitas por Imunodifusão Radial e as dosagens de IgG2 e IgG4 foram realizadas por nefelometria. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas. (IgG: n população saudável = 14; n. população asmática = 19; IgG2 e IgG4: n população saudável = 10; n. população asmática = 13).

Quando correlacionamos os valores de IgG com os valores de IgE, observamos que não há correlação das imunoglobulinas estudadas.

4.2 IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS

Os resultados da marcação de CD3CD4 e CD3CD8 nos mostram que o sangue periférico de mães saudáveis possui maiores valores percentuais de células CD3⁺CD4⁺ quando comparados ao sangue de seus respectivos RNs ($P = 0,0014$), o mesmo não é observado na população asmática. Em relação às células CD3⁺CD8⁺, observou-se também que as mães asmáticas possuíam valores elevados de células com este fenótipo em relação aos seus respectivos RNs ($P = 0,0009$), porém mães saudáveis também apresentaram esta diferença ($P = 0,0001$) no sangue periférico (**Figura 5**)

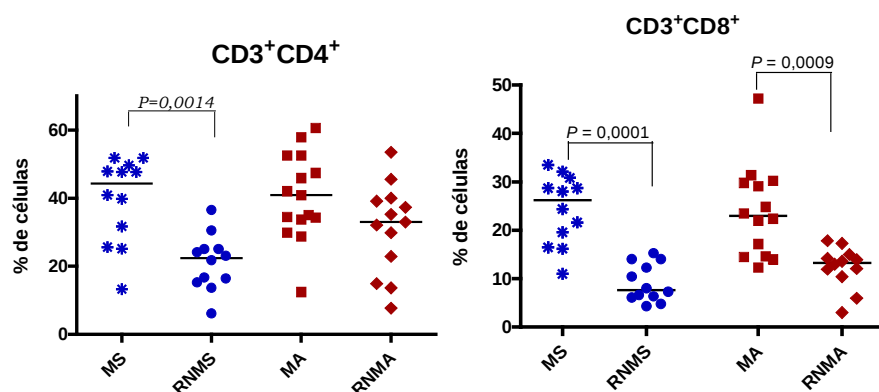


Figura 5: Análise fenotípica de células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas. (n população saudável = 12; n. população asmática = 13).

Quando comparamos as medianas de intensidade de fluorescência (MFI) de CD3CD4, observamos que não há diferenças entre os grupos estudados. Apesar de haver uma diferença acentuada entre as medianas de mães saudáveis e seu RN, não foi estatisticamente significativa ($P = 0,0889$). Em relação à MFI de CD3CD8, não observamos diferenças entre os grupos de estudo (**Figura 6**).

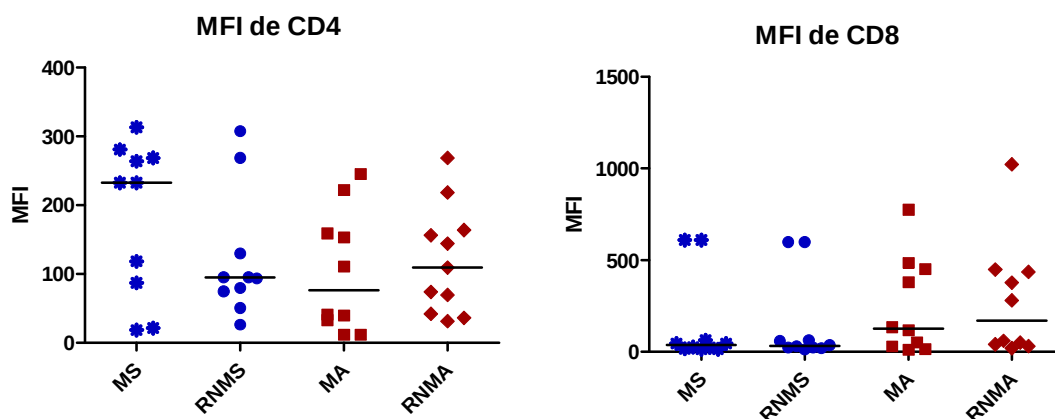


Figura 6: Mediana de intensidade de fluorescência de CD4⁺ e CD8⁺ em linfócitos CD3⁺ de leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 10; n população asmática = 11).

O CD28 é uma proteína de membrana de 44 kDa expressa em células T ativadas. A ligação de CD28 com CD80 ou CD86 induz a proliferação e diferenciação de células T efectoras. Em modelos animais, tem sido demonstrado que a estimulação de CD28 induz a proliferação celular e produção de IgE (Neuber, 2006). Durante a análise fenotípica de células CD4⁺CD28⁺ observou-se que os RNs de mães asmáticas apresentaram valores percentuais destas células maiores que RNs de mães saudáveis ($P=0,0477$). Em relação a CD8⁺CD28⁺, se observou diferenças estatisticamente significativas na expressão destes

marcadores, na comparação entre mães asmáticas e seus filhos ($P=0,0082$) (**Figura 7**).

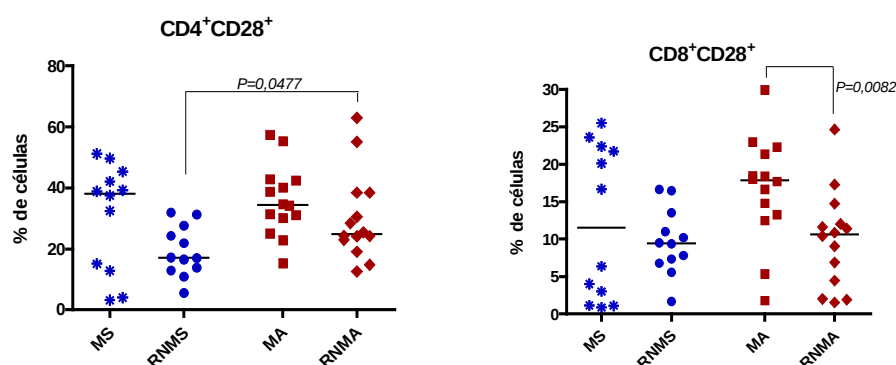


Figura 7: Análise fenotípica de células $CD4^+CD28^+$ e $CD8^+CD28^+$ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas. (n população saudável = 13; n. população asmática = 14).

Quando analisamos a MFI, observamos que mães saudáveis apresentam valores menores de fluorescência em comparação com seus RNs ($P=0,0288$). O mesmo não acontece em relação às mães asmáticas e seus RNs (**Figura 8**).

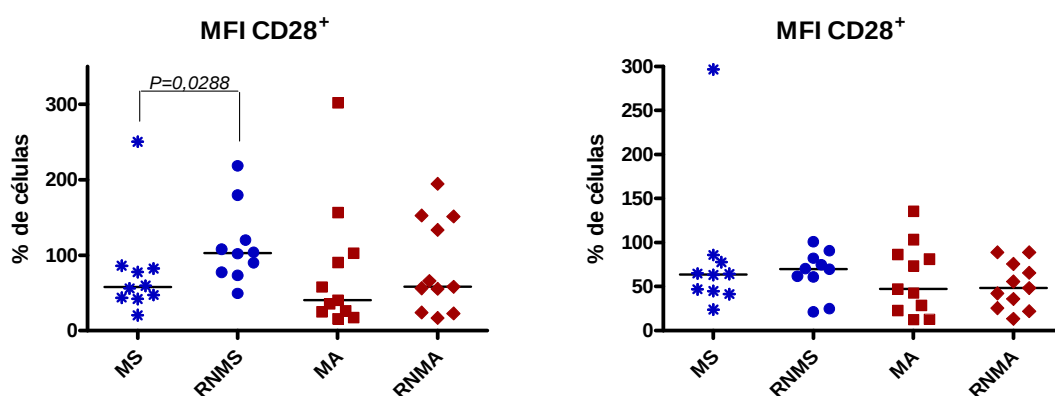


Figura 8: Mediana de intensidade de fluorescência de $CD28^+$ em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ de leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas. (n população saudável = 10; n população asmática = 11).

O CD 154 ou CD40L é expresso na superfície de células T ativadas, e ao se ligar ao CD40 na superfície de células B, que expressam CD19, promove a síntese e troca de isotipo de cadeia pesada de imunoglobulinas. O CD40 também é expresso em monócitos e quando se liga ao CD154 nas células T resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (Mehlhof, 2000).

Observamos dentro da população de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ a expressão da molécula $CD154^+$, e podemos observar que mães asmáticas apresentam maiores valores percentuais na expressão desta molécula em relação a mães saudáveis ($P = 0,0069$). Já dentro da população de linfócitos T $CD3^+CD8^+$, observamos que a expressão de $CD154$ não apresentou valores percentuais diferentes entre os grupos do estudo. Os valores podem ser vistos na **figura 9**.

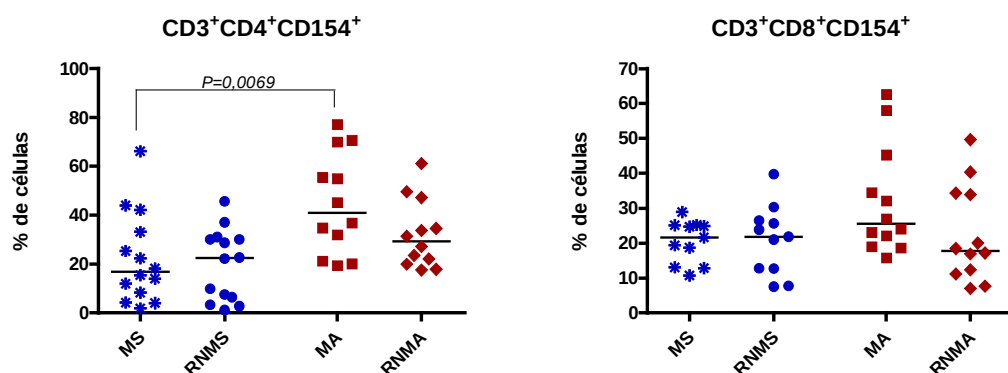


Figura 9: Análise fenotípica de células $CD154^+$ na população de células $CD3^+CD4^+$ e de $CD154$ na população $CD3^+CD8^+$ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** Mães asmáticas. (n população saudável = 14; n. população asmática = 12).

As análises da MFI de $CD154$ em populações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ indicam que não houve diferença nos valores de MFI desta molécula nos grupos estudados (**Figura 10**).

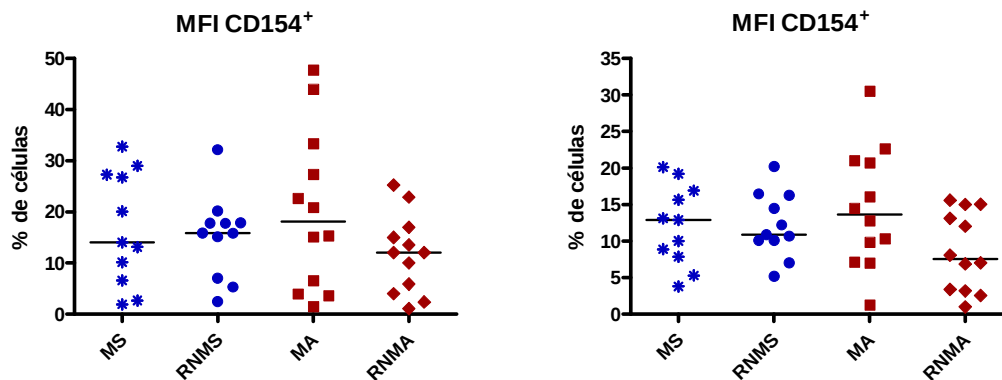


Figura 10: Mediana de intensidade de fluorescência de CD154 em linfócitos T CD4⁺ e em linfócitos T CD8⁺ no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 11; n população asmática = 12).

Células T CD4⁺ auxiliares podem ser subdivididas na expressão de isoformas da molécula CD45R (antígeno comum de leucócito). A molécula CD45 está associada com a ativação de linfócito T. Baseada na expressão de duas diferentes isoformas de CD45 – CD45RA e CD45RO – produzidas por *splicing* alternativo, células T CD4⁺ podem ser subdivididas em duas subpopulações: CD4⁺CD45RA⁺ e CD4⁺CD45RO⁺ que representam fenótipo de células T virgem e de memória, respectivamente (Lara-Marquez, 2001).

Os resultados da análise de células positivas para CD3CD4CD45RA, assim como CD3CD8CD45RA, nos mostram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, asmático e controle nos valores percentuais de células com o fenótipo citado (**Figura 11**).

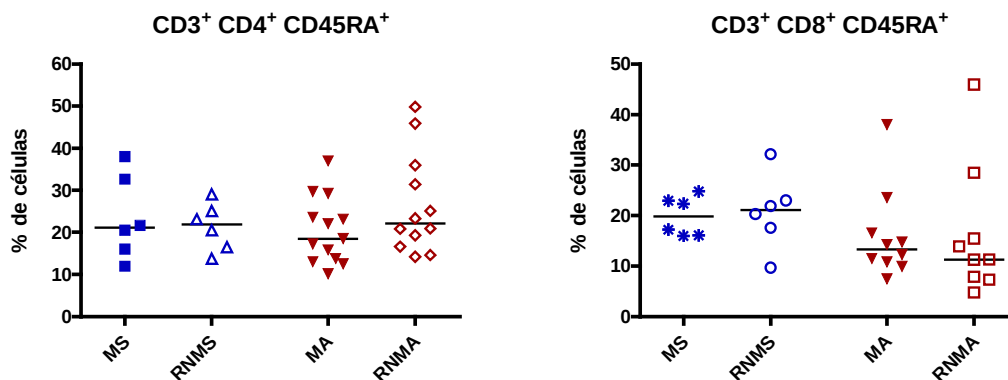


Figura 11: Análise fenotípica de células CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ e CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e no sangue de cordão dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 6; n. população asmática = 6).

Quando identificamos células CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺, observamos que em conjunto, mães asmáticas possuem valores percentuais mais elevados destas células quando comparamos com os seus respectivos RNs ($P = 0,0003$), o que não foi observado no grupo controle, de mães saudáveis. Na análise fenotípica de células CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ podemos observar que mães saudáveis possuem valores mais elevados quando comparados com os seus respectivos RNs ($P = 0,0411$), o que também foi observado em mães asmáticas quando comparadas aos seus RNs ($P = 0,0318$). Os resultados podem ser observados na **figura 12**.

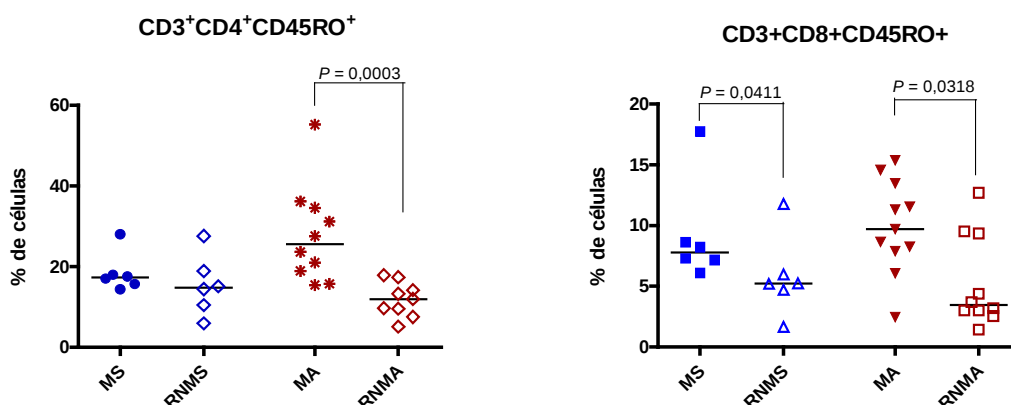


Figura 12: Análise fenotípica de células CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ e CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população asmática = 10; n. população saudável = 6).

Estudos recentes em humanos e camundongos indicam que o compartimento de células T de memória é composto por células T de memória central e memória efetora, caracterizado pela capacidade distinta de “*homing*” e funções efetoras (Sallusto et al, 1999). Assim, as células T de memória têm sido subdivididas em memória central (TCM, CD45RA⁻CCR7⁺), memória efetora (TEM, CD45⁻CCR7⁻) e em memória efetora altamente diferenciada (TEMRA, CD45RA⁺CCR7⁻) com base na expressão de CCR7, CD62L e CD45RA e em sua capacidade de produzir citocinas e proliferar (Sallusto et al, 1999). As células de memória central migram preferencialmente para os linfonodos e podem se diferenciar em células de memória efetora, sendo importantes para a manutenção do *pool* de memória.

Nossos resultados sugerem que mães asmáticas apresentam maior percentual ($P = 0,0006$) de células TCD4⁺ de memória central (CD45RA⁻CCR7⁺) no sangue periférico quando comparado com mães saudáveis. Essa diferença não foi observada em linfócitos T CD8⁺. Porém, o maior percentual de células TCD8⁺ de memória central foi observada entre RNs de mães asmáticas quando comparados com mães

asmáticas. No entanto o aumento da população de CD8⁺ em RNs pode ser relacionado com o fato de que o CCR7 também é uma molécula de migração para a mucosa intestinal.

No entanto, atualmente estudos no contexto de células de memória nos mostram que dentro desta população há diferenciações. A população de células T de memória é subdividida em memória central (T_{cm}) e memória efetora (T_{em}). Esta subdivisão é baseada na expressão de receptores de *homing*, que fazem com que as células migrem para órgãos linfóides secundários e para tecido não linfóides, e também diferem em suas características funcionais. Recentemente foi demonstrado que, células de memória central possuem o fenótipo CCR7⁺CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻ e células de memória efetora possuem o fenótipo CD45⁺CCR7⁻CD27⁻ (Halwani, 2006). Baseado nesses dados, decidimos por realizar a marcação destas células de forma mais adequada para definirmos melhor a população de células T de memória nos dois grupos (**Figura 13**).

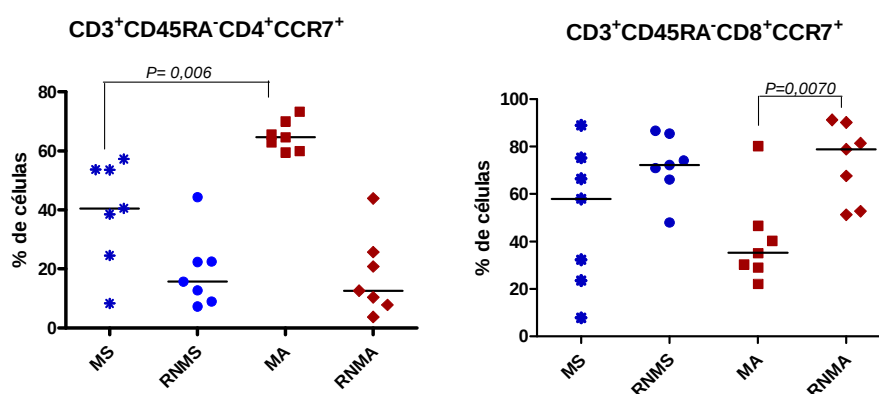


Figura 13: Análise fenotípica de células CD3⁺CD45RA⁻CD4⁺CCR7⁺ e CD3⁺CD45RA⁻CD8⁺CCR7⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 7; n. população asmática = 7).

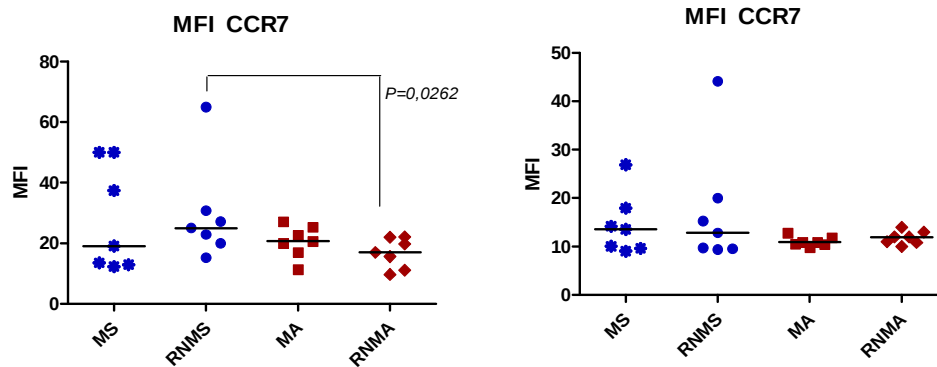


Figura 14: Mediana de intensidade de fluorescência de CCR7 em população de linfócitos T CD3⁺CD45RA⁻CD4⁺ e em população de linfócitos T CD3⁺CD45RA⁻CD8⁺ respectivamente no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (mesmo n do experimento anterior).

A análise estatística do estudo fenotípico de células $CD19^+CD40^+$ mostra que não há diferença nessa análise entre o grupo asmático e o grupo controle (**Figura 15**).

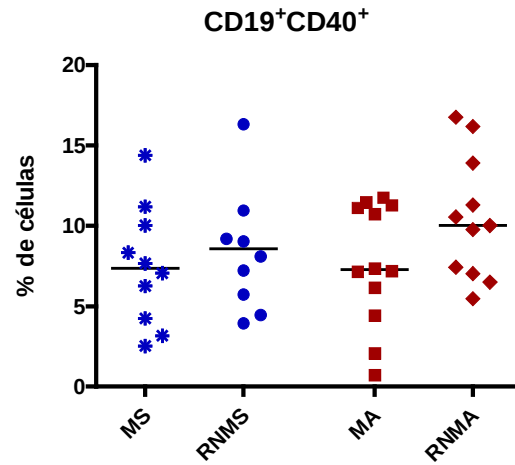


Figura 15: Análise fenotípica de células $CD19^+CD40^+$ e $CD19^+CD40^+$ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 10; n população asmática = 11).

O mesmo podemos observar em relação à MFI de CD40 em células B CD19⁺ (**Figura 16**).

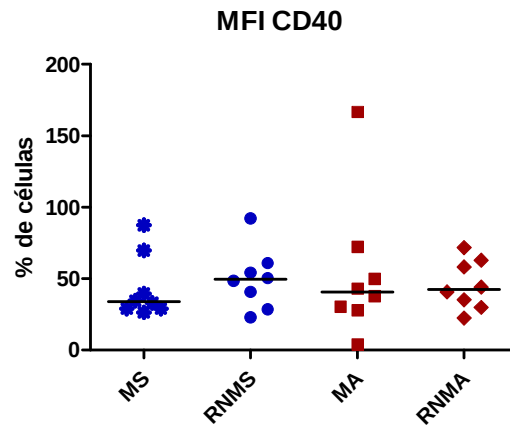


Figura 16: Mediana de intensidade de fluorescência de CD40 em células CD19⁺ de leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (mesmo n do experimento anterior).

O receptor de baixa afinidade da IgE, o CD23, é uma molécula expressa em células B e está envolvida na regulação negativa desta imunoglobulina (Lewis, 2004). Na análise de células expressando CD19CD23 não foram observadas diferenças significativas entre o grupo de mães saudáveis e mães asmáticas. Quando analisamos células positivas para CD19CD23CD40, também não observamos diferenças significativas entre os grupos (**Figura 17**).

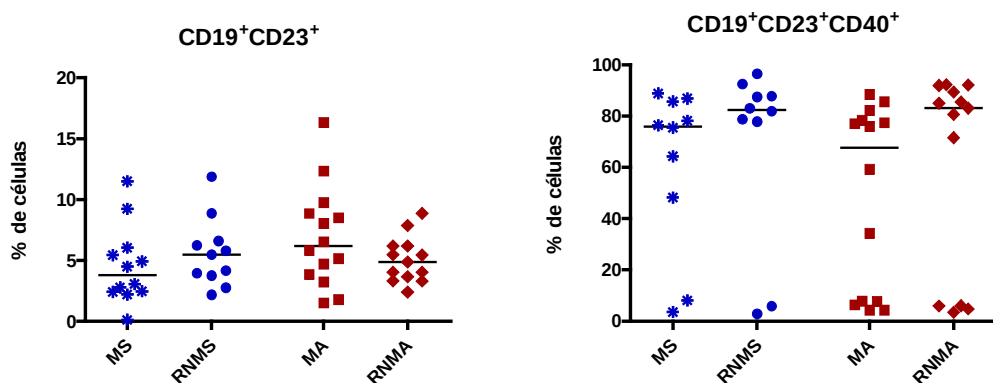


Figura 17: Análise fenotípica de células CD19⁺CD23⁺ e CD19⁺CD23⁺CD40⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 10; n população asmática = 14).

Ao analisarmos a MFI de CD23 na população de células B CD19⁺, observamos que não há diferenças significativas entre os grupos estudados (**Figura 18**).

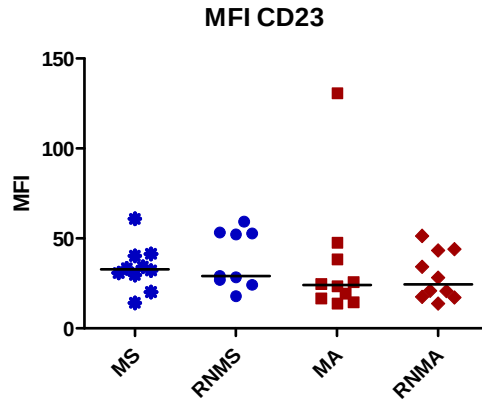


Figura 18: Mediana de intensidade de fluorescência de CD23 em células CD19⁺ no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 10; n população asmática = 10).

O papel das células dendríticas (DCs) na alergia e na asma vem sendo intensamente estudado, porém nunca antes na interface materno-fetal. Dois subtipos de DCs foram identificados: mielóides e linfóides. O subtipo mielóide expressa o marcador CD11c e o subtipo linfóide expressa o marcador CD123. Além disso, células dendríticas expressam marcadores como CD80 e CD86 que estão envolvidos na ativação de células T (Hagendorens, 2003; Masten, 2006 e Van Rij, 2004).

A Análise fenotípica de células CD123⁺CD80⁺ mostra que não houve diferenças no percentual destas células entre os grupos estudados. No entanto, em relação às células CD123⁺CD86⁺ observou-se que mães asmáticas possuem maior percentual destas células no sangue periférico ($P=0,0400$) (**Figura 19**).

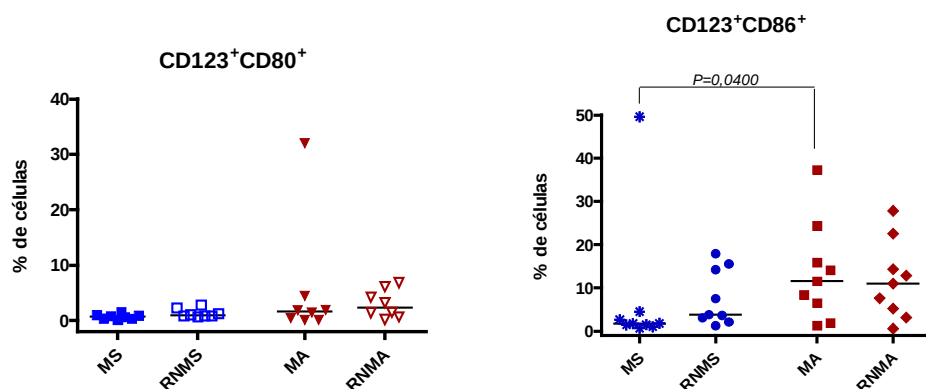


Figura 19: Análise fenotípica de CD123⁺CD80⁺ e CD123⁺CD86⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 8; n população asmática = 9).

Quando analisamos a MFI de CD80 nas células CD123⁺, observamos que mães asmáticas apresentam valores superiores aos apresentados pelas mães saudáveis ($P = 0,0411$). O mesmo é visto na comparação da MFI de CD86 ($P = 0,0262$). RNs de mães asmáticas também apresentam valores superiores desta fluorescência em relação aos RN de mães saudáveis ($P = 0,0252$) (**Figura 20**).

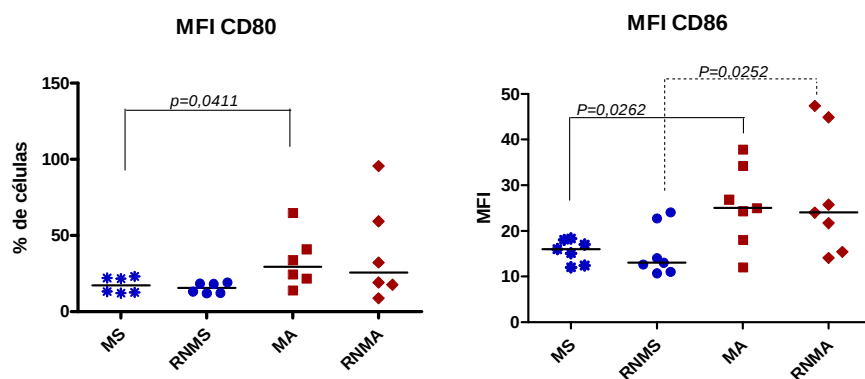


Figura 20: Mediana de intensidade de fluorescência de CD80 e CD86 em células CD123⁺ no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 6; n população asmática = 6).

Observamos, na análise fenotípica de CD11cCD80, que não houve diferença entre o grupo asmático e o grupo saudável. No entanto constatamos que mães asmáticas apresentam valores percentuais maiores de células CD11c⁺CD86⁺ em relação a mães saudáveis ($P = 0,0185$). Mães saudáveis apresentaram também valores menores em relação ao seu RN ($P = 0,0052$). Os valores podem ser vistos na **figura 21**.

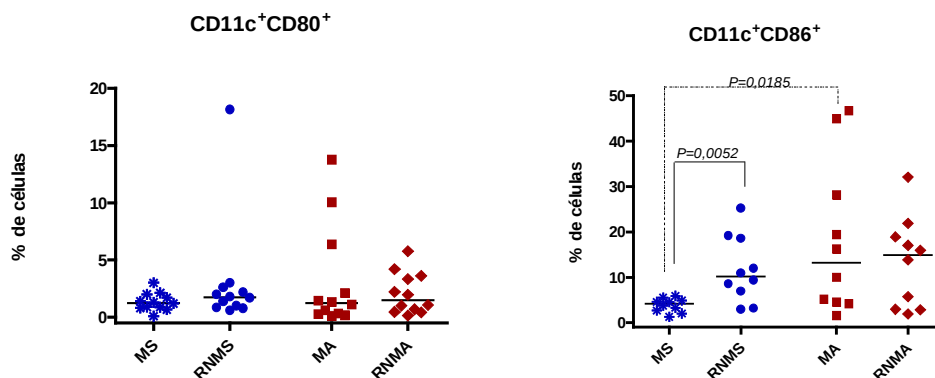


Figura 21: Análise fenotípica de CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 10; n população asmática = 10).

Ao analisarmos a MFI de CD80 em células CD11c⁺, observamos que mães saudáveis apresentaram MFI maior em relação ao seu RN ($P = 0,0411$), que por sua vez apresentou valores menores que os RNs de mães asmáticas ($P = 0,022$). Em relação à MFI de CD86 em células CD11c⁺ constatamos que mães saudáveis obtiveram valores superiores a mães asmáticas ($P = 0,0087$) (**Figura 22**).

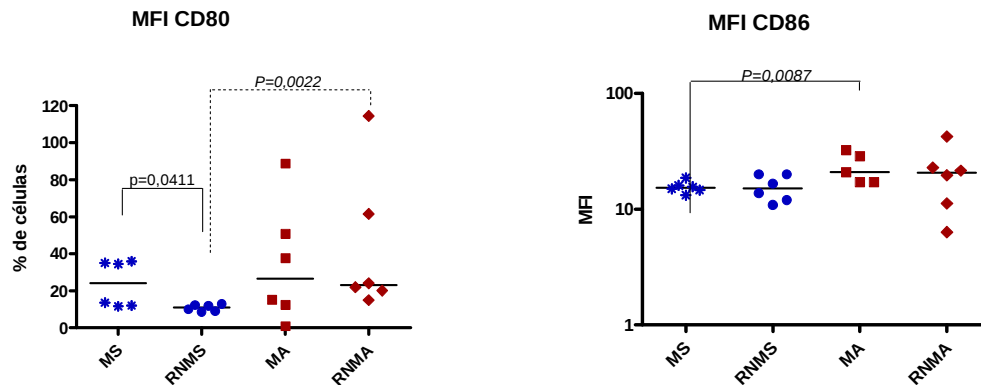


Figura 22: Mediana de intensidade de fluorescência de CD80 e CD86 em células CD11c⁺ no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 6; n população asmática = 6).

No entanto, ao logo do trabalho, percebemos que a análise fenotípica de células dendríticas não era a ideal. Atualmente a marcação correta de DCs deve obrigatoriamente ter a o uso do *cocktail Lineage 1*. Este coquetel possui os anticorpos CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56 todos marcados com FitC. Excluindo linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos, garantindo desta forma que a marcação é efetiva apenas para DCs. O teste foi realizado como manda o fabricante, nós selecionamos as células Lin1 negativas e positivas para HLA-DR. Dentro deste *gate*, realizada a análise de células CD123⁺CD80⁺ e células CD123⁺CD86⁺. Utilizando essa marcação, nós podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significante em relação a Lin1⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD80⁺. No entanto em relação a Lin1⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD86⁺, os resultados foram exatamente como na marcação sem o Lin1, e observou-se que mães asmáticas possuem maior percentual destas células no sangue periférico ($P=0,0379$), assim como mães saudáveis apresentaram valores percentuais menores destas células em relação ao seu RN ($P = 0,0175$). (**Figura 23**).

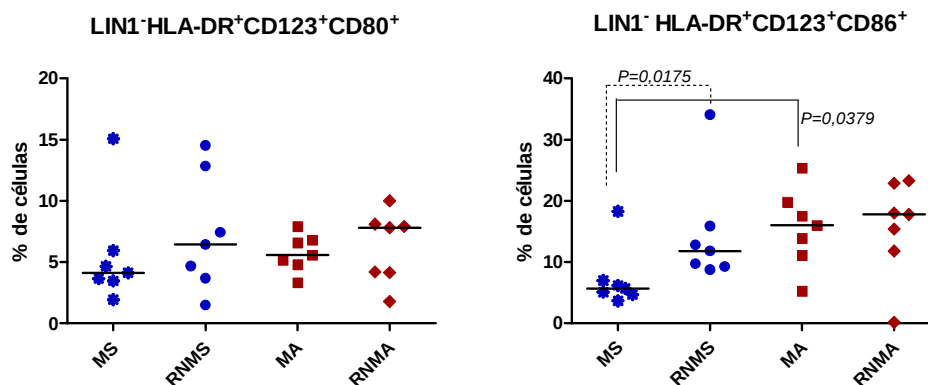


Figura 23: Análise fenotípica de LIN⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD80⁺e LIN⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD86⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n da população saudável = 7; n da população asmática = 7)

Ao analisarmos a MFI de CD80 em células LIN⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD80⁺, observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos do estudo, o mesmo resultado ocorreu na análise da MFI de células LIN⁻HLA-DR⁺CD123⁺CD86⁺. O resultado pode ser observado na **figura 24**.

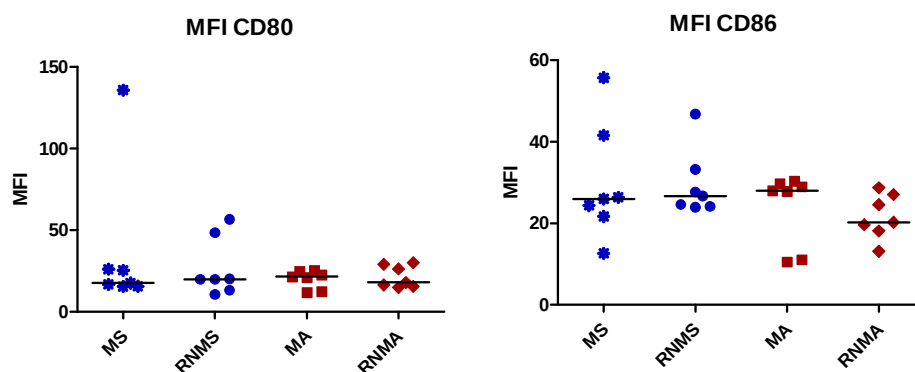


Figura 24: Mediana de intensidade de fluorescência de CD80 e CD86 em células LIN-HLA-DR⁺CD123⁺ no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 7; n população asmática = 7).

Na análise da expressão de CD80 em células Lin1-HLA-DR⁺CD11c⁺, podemos observar que mães asmáticas apresentaram valores percentuais destas células maiores que mães saudáveis ($P = 0,0023$) e RNs de mães saudáveis também apresentaram valores percentuais menores em relação aos RNs de mães asmáticas ($P = 0,0012$) (**Figura 25**).

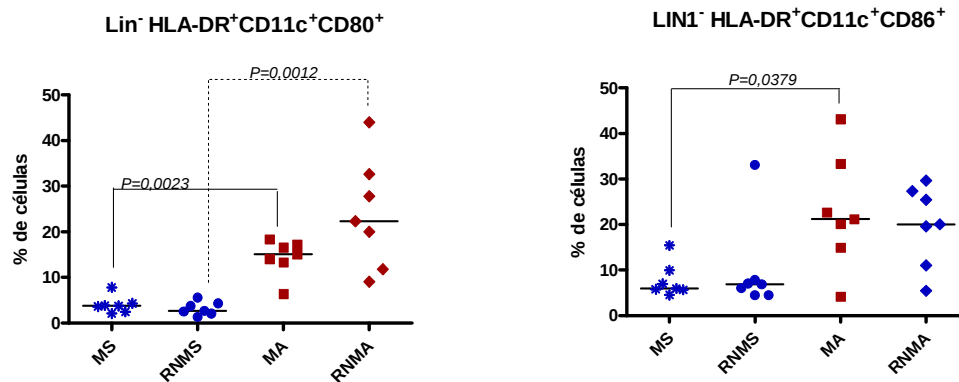


Figura 25: Análise fenotípica de LIN-HLA-DR⁺CD11c⁺CD80⁺ e LIN-HLA-DR⁺CD11c⁺CD86⁺ em leucócitos do sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos RNs. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** Mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 7; n população asmática = 7)

Na análise da MFI de CD80 em células Lin-HLA-DR⁺CD11c⁺ observamos que mães saudáveis apresentaram valores de fluorescência superior a mães asmáticas ($P = 0,0023$) e que mães asmáticas apresentaram valores superiores em relação ao seu RN ($P = 0,0012$) (**Figura 26**).

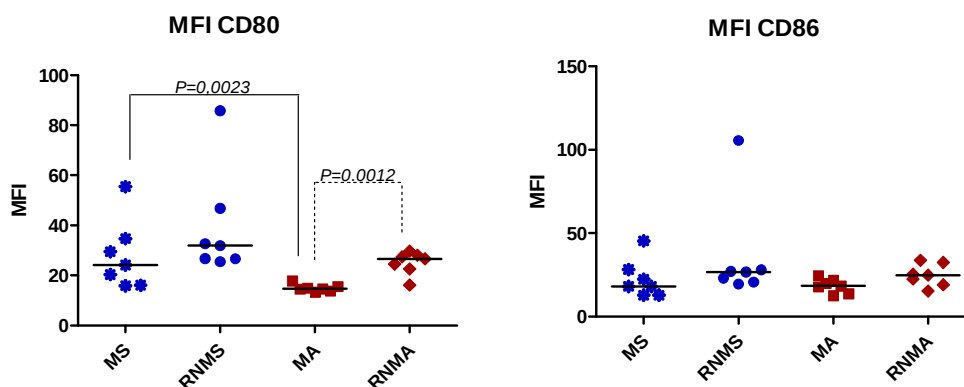


Figura 26: Mediana de intensidade de fluorescência de CD80 e CD86 em células LIN-HLA-DR⁺CD11c⁺ no sangue total de mães saudáveis e asmáticas e dos seus respectivos recém-nascidos. **MS:** Mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 7; n população asmática = 7).

4.3 PADRÃO DE CITOCINAS INTRACELULAR E NO SOBRENADANTE

4.3.1 Análise de citocinas intracelulares em células mononucleares do sangue periférico da mãe e do cordão após estimulação *in vitro*

A asma atópica é caracterizada pelo aumento dos níveis de IgE. Muitos estudos vêm mostrando que indivíduos asmáticos apresentam níveis de IFN- γ diminuídos, assim como níveis aumentados de IL-4. O aumento na razão IL-4/ IFN- γ pode levar a produção aumentada de IgE na resposta a aeroalérgenos (Magnan, 2000). Decidimos, então, analisar a produção intracelular de IFN- γ , IL-4 e IL-13 para avaliar a produção específica das células T CD4⁺, células que a muito vêm sendo documentadas por sua intensa participação na patogênese da asma.

Este ensaio foi o que representou maior dificuldade em sua padronização. Testamos diversos protocolos e diferentes antígenos. Adotamos aquele que apresentou melhores resultados. As análises da produção de IFN- γ por células CD3⁺ e CD4⁺ mostram que, após a estimulação com SEB (antígeno policlonal – enterotoxina B do

Staphylococcus aureus), mães saudáveis apresentaram maior percentual de células produtoras de IFN- γ quando comparado com mães asmáticas ($P = 0,0038$), mães saudáveis apresentaram valores percentuais mais elevados do que o seu RN ($P=0,0387$) e RNs de mães saudáveis apresentaram valores percentuais maiores de células produtoras de IFN- γ quando comparado com RNs de mães asmáticas ($P=0,0009$). Na marcação de células CD8 $^{+}$ produtoras de IFN- γ , podemos observar que mães saudáveis apresentaram valores percentuais menores do que o seu RN e menor do que mães asmáticas. Assim como RN de mães asmáticas apresentaram valores maiores em relação ao RN de mães saudáveis ($P=0,0251$) (**Figura 27**).

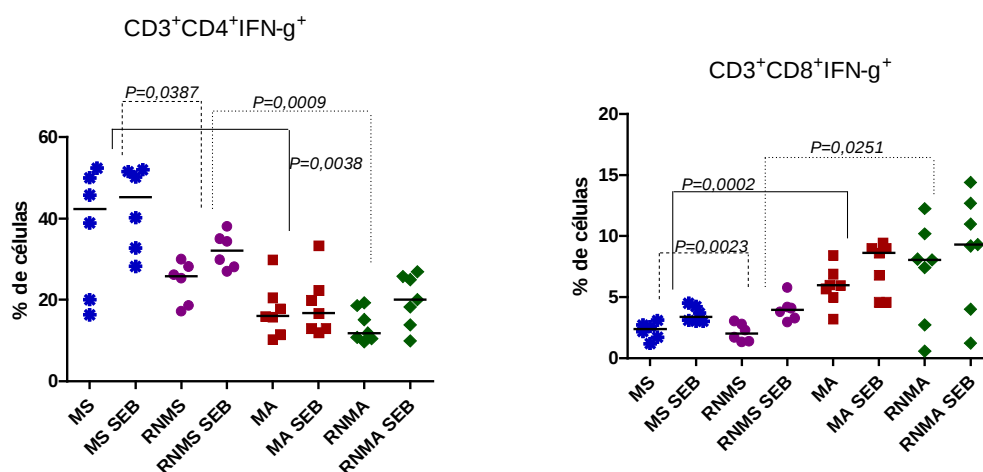


Figura 27: Produção de IFN- γ por células CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ e CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ de mães asmáticas e saudáveis e seus respectivos RNs, estimuladas e não estimuladas com SEB. 1×10^6 células/ ml foram estimuladas com 2 μ g de SEB por 12 horas. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-IFN- γ . **MS:** Células de mães saudáveis; **MS SEB:** Células de mães saudáveis estimuladas com SEB, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS SEB:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com SEB, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA SEB:** Células de mães asmáticas estimuladas com SEB, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA SEB:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com SEB (n da população saudável = 6; n da população asmática = 7)

Na análise das MFI de IFN- γ em células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ observamos que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados (**Figura 28**).

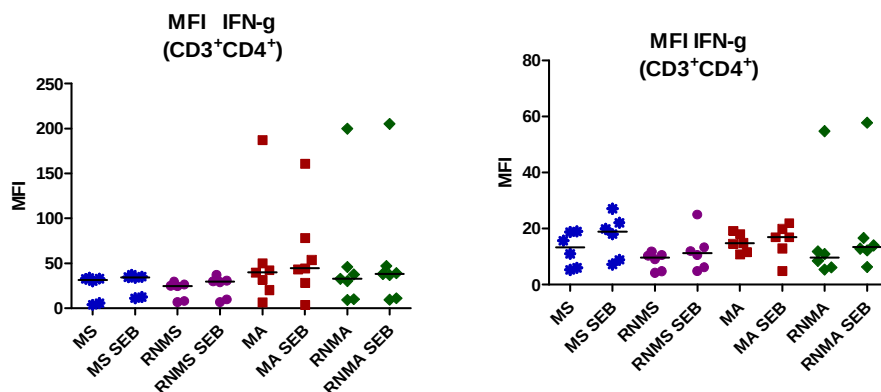


Figura 28: Mediana de intensidade de fluorescência de IFN- γ por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de mães asmáticas e saudáveis e seus respectivos RNs, estimuladas e não estimuladas com SEB. 1×10^6 células/ ml foram estimuladas com 2 μ g de SEB por 12 horas. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-IFN- γ . **MS:** Células de mães saudáveis; **MS SEB:** Células de mães saudáveis estimuladas com SEB, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS SEB:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com SEB, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA SEB:** Células de mãe asmáticas estimuladas com SEB, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA SEB:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com SEB (n da população saudável = 6; n da população asmática = 7)

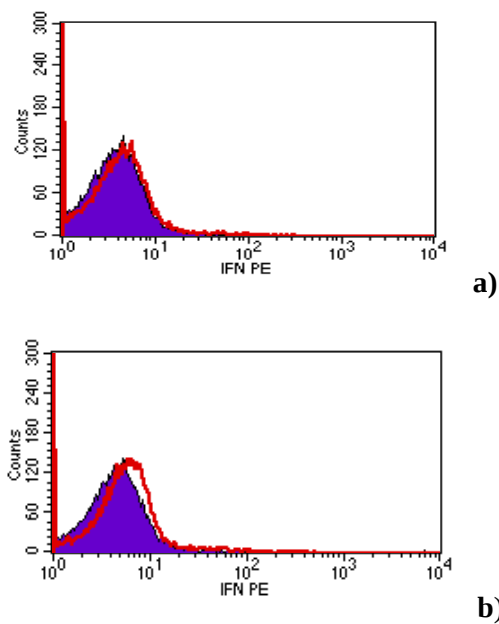


Figura 29: Histograma da representação de linfócitos CD3⁺ produtores de IFN- γ sem estímulo (azul) e estimuladas com SEB (vermelho) no sangue do cordão de RNs de mães saudáveis **(a)** e no sangue do cordão de RNs de mães asmáticas **(b)**.

A análise da produção de IL-4 por células CD3⁺CD4⁺ mostrou que não houve diferença entre mães saudáveis e mães asmáticas. Porém ambos os RNs apresentaram produção mais elevada de IL-4 em relação a sua mães. É importante ressaltar que todas as pacientes analisadas, assim como as células de seus respectivos RN, apresentaram uma produção espontânea desta citocina (**Figura 30**).

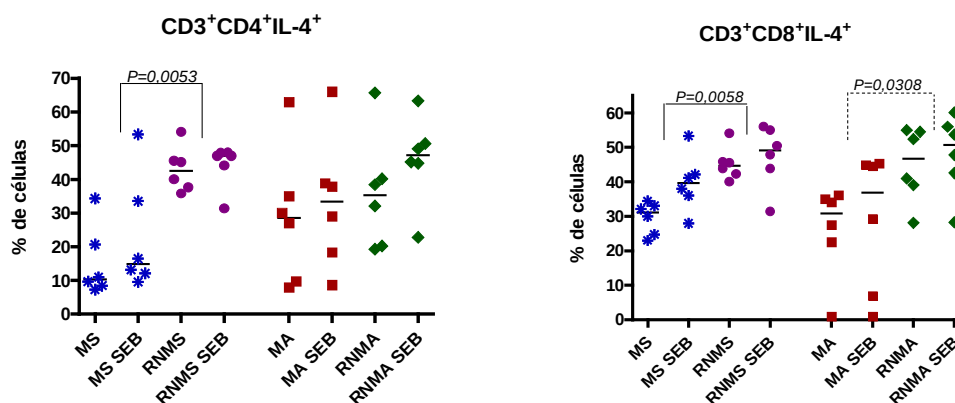


Figura 30: Produção de IL-4 por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de mães asmáticas e saudáveis e seus respectivos RN, estimuladas e não estimuladas com SEB. 1×10^6 células/ ml foram estimuladas com 2 μ g de SEB por 72 horas. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-IL-4. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS SEB:** Células de mães saudáveis estimuladas com SEB, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS SEB:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com SEB, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA SEB:** Células de mãe asmáticas estimuladas com SEB, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA SEB:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com SEB. (n população saudável = 6; n da população asmática = 7)

Quando analisamos a MFI de IL-4 em células T CD4⁺ observamos que mães saudáveis possuem menor valor em relação á mães asmáticas ($P = 0,0023$) e em relação ao seu RN ($P = 0,0009$). Constatamos também que RN de mães saudáveis possuem MFI menor do que os RNs de mães asmáticas ($P = 0,0370$) (**Figura 31**).

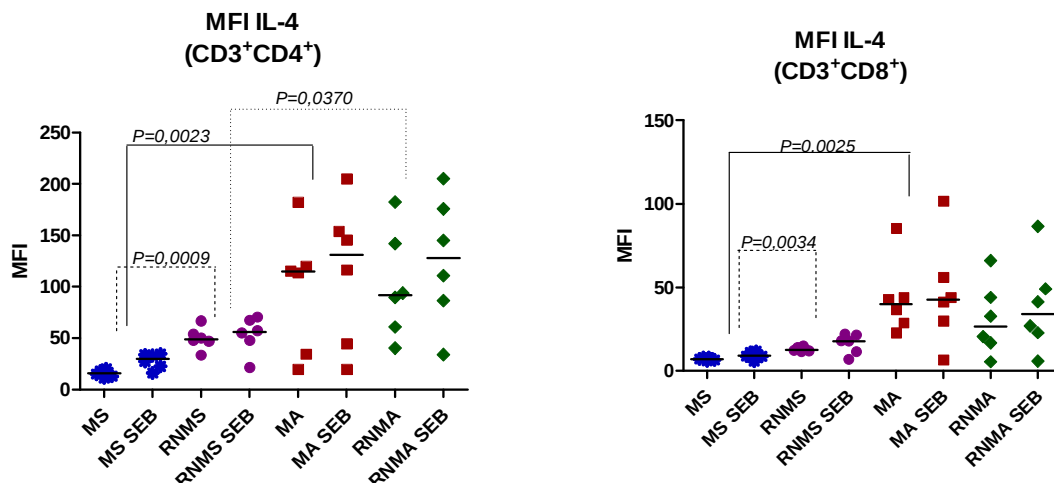


Figura 31: Mediana de intensidade de fluorescência de IL-4 por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de mães asmáticas e saudáveis e seus respectivos RNs, estimuladas e não estimuladas com SEB. 1x10⁶ células/ ml foram estimuladas com 2 µg de SEB por 12 horas. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-IFN-γ. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS SEB:** Células de mães saudáveis estimuladas com SEB, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS SEB:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com SEB, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA SEB:** Células de mães asmáticas estimuladas com SEB, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA SEB:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com SEB (n da população saudável = 6; n da população asmática = 7)

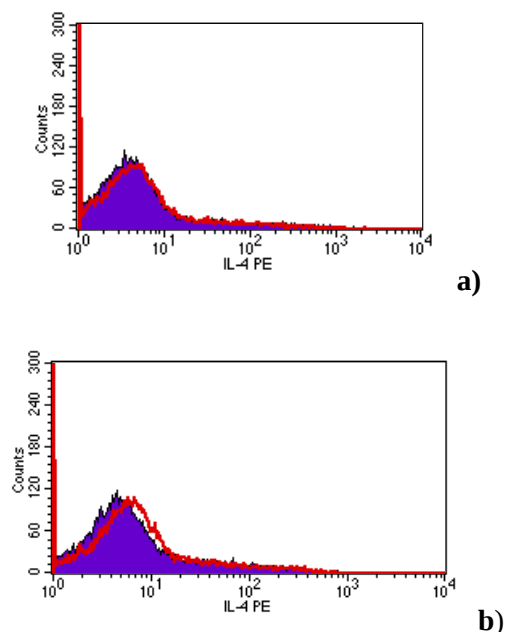


Figura 32: Histograma da representação de linfócitos CD3⁺ produtores de IL-4 sem estímulo (azul) e estimuladas com SEB (vermelho) no sangue do cordão de mães saudáveis **(a)** e no sangue do cordão de RNs de mães asmáticas **(b)**.

A marcação intracelular de IL-13 mostra que a porcentagem das células CD3⁺CD4⁺ de mães saudáveis, após estimulação com SEB, foi significativamente menor que a porcentagem de células CD3⁺ CD4⁺ produtoras de IL-13 das células de seus respectivos RNs, estimuladas com o mesmo antígeno ($P = 0,0008$) e foi menor também em relação as mães asmáticas ($P = 0,0288$). Podemos observar também maior porcentagem destas células produtoras de IL-13 no cordão RN de mães asmáticas, após estimulação com SEB, quando comparadas com células do cordão do RN de mães saudáveis após estimulação ($P = 0,0073$) (**Figura 33**).

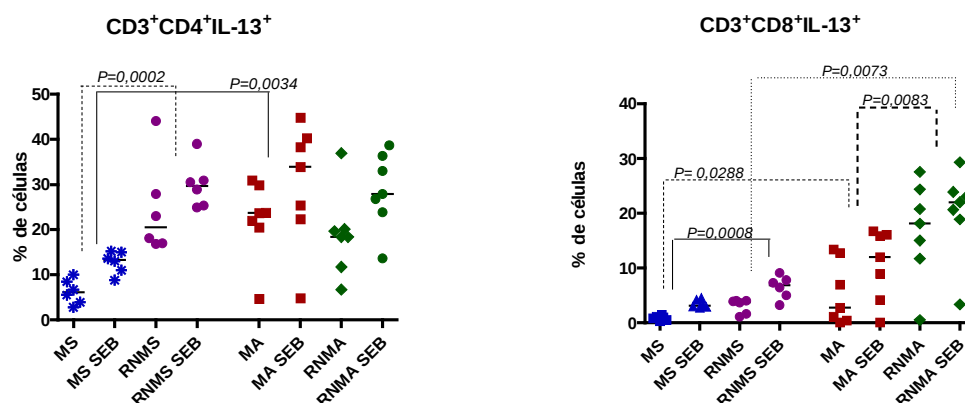


Figura 33: Produção de IL-13 por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de mães asmáticas e saudáveis e seus respectivos RN, estimuladas e não estimuladas com SEB. 1x10⁶ células/ ml foram estimuladas com 2 µg de SEB por 72 horas. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas para IL-13. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS SEB:** Células de mães saudáveis estimuladas com SEB, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS SEB:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com SEB, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA SEB:** Células de mães asmáticas estimuladas com SEB, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA SEB:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com SEB. (n população saudável = 6; n população asmática = 7)

Ao analisarmos a MFI de IL-13 em células CD3⁺CD4⁺, observamos que os RNs de mães saudáveis apresentaram valores mais baixos quando comparado com RNs de mães asmáticas ($P = 0,0485$). Não houve diferenças estatisticamente significantes em relação a MFI de células CD3⁺CD8⁺ (**Figura 34**).

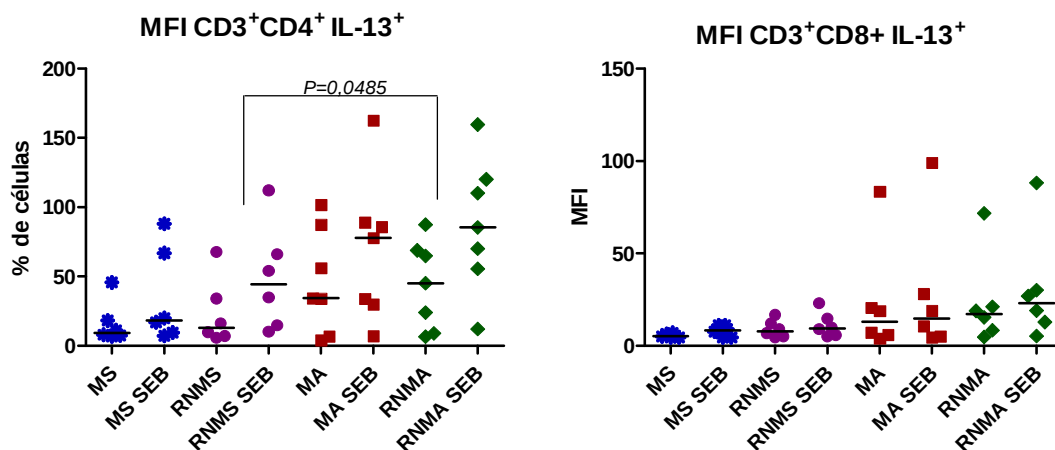


Figura 34: Mediana de intensidade de fluorescência de IL-13 por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ de mães asmáticas e saudáveis e seus respectivos RNs, estimuladas e não estimuladas com SEB. 1x10⁶ células/ ml foram estimuladas com 2 µg de SEB por 12 horas. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-IFN-γ. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS SEB:** Células de mães saudáveis estimuladas com SEB, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS SEB:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com SEB, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA SEB:** Células de mãe asmáticas estimuladas com SEB, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA SEB:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com SEB (n da população saudável = 6; n da população asmática = 6)

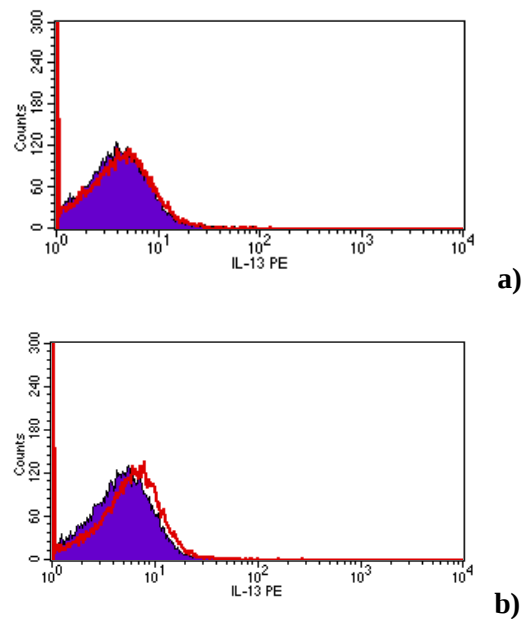


Figura 35: Histograma da representação de linfócitos CD3⁺ produtores de IL-13 sem estímulo (azul) e estimuladas com SEB (vermelho) no sangue do cordão de RNs de mães saudáveis **(a)** e no sangue do cordão de RNs de mães asmáticas **(b)**.

4.3.2 MEDIDAS DE CITOCINAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA CELULAR

Como já citamos, não só as interações celulares estão envolvidas no desencadear do processo asmático, mas também os produtos dessas interações, ou seja, as citocinas. As citocinas predominantes no padrão Th1 são principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-12. As citocinas predominantes do padrão Th2 são principalmente IL-4, IL-5, e IL-13. Não podemos deixar também de citar as citocinas predominantes do padrão regulador, ou seja, IL-10 e TGF- β . Atualmente alguns estudos vêm constatando que o principal papel da IL-2 é o de estimular a proliferação de linfócitos (Kopp, 2001).

As medidas de IL-2 realizadas no sobrenadante de células mononucleares do sangue da mãe e seu RN mostram que mães saudáveis produziram maior quantidade desta citocina quando

comparadas com o seu RN ($P = 0,0124$). O mesmo não aconteceu na comparação de mães asmáticas com o seu RN (**Figura 36**).

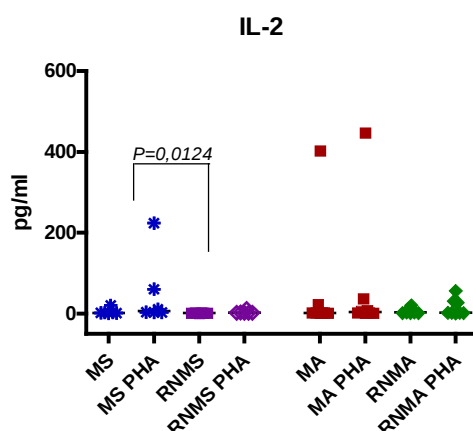


Figura 36: Produção de IL-2 por células mononucleares de mãe e cordão umbilical de pacientes saudáveis e asmáticas. 1×10^6 células foram estimuladas com PHA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) por 48 horas. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS PHA:** Células de mães saudáveis estimuladas com PHA, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS PHA:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com PHA, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA PHA:** Células de mãe asmáticas estimuladas com PHA, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA PHA:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com PHA (n população saudável = 6; n população asmática = 8).

A análise de IL-12p70 no sobrenadante celular mostra que todas as células que foram estimuladas (com PHA) produziram maiores quantidades desta citocina quando comparada com as células não estimuladas. As células de mães saudáveis após estimulação com PHA, produziram maiores quantidades de IL-12p70 em relação às células de mães asmáticas após estimulação ($P=0,0006$). As células das mães, asmáticas e saudáveis, produziram maiores quantidades das citocinas após estimulação em comparação com seus RNs ($P=0,0003$ e $P=0,0019$ respectivamente).

Em relação às dosagens de TNF- α , observou-se que não houve diferença na secreção desta citocina entre os grupos estudados. (**Figura 37**).

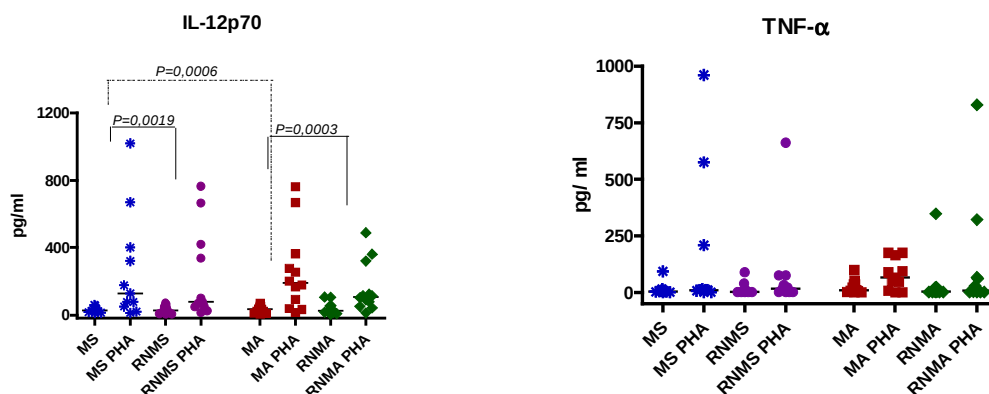


Figura 37: Produção de IL-12p70 e de TNF- α por células mononucleares de mãe e cordão umbilical de pacientes saudáveis e asmáticas. 1×10^6 células foram estimuladas com PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 48 horas. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS PHA:** Células de mães saudáveis estimuladas com PHA, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS PHA:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com PHA, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA PHA:** Células de mãe asmáticas estimuladas com PHA, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA PHA:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com PHA (n população saudável = 10; n população asmática = 12).

Nas medidas de IL-10 no sobrenadante das células mononucleares, observou-se que mães saudáveis produziram e secretaram níveis maiores desta citocina quando comparado com mães asmáticas ($P=0,0063$). Em relação à secreção de IFN- γ , podemos constatar que mães saudáveis produziram níveis maiores desta citocina em relação às mães saudáveis. Constatamos também que mães asmáticas produziram maior quantidade desta citocina quando comparado com seu RN ($P = 0,0368$) (**Figura 38**).

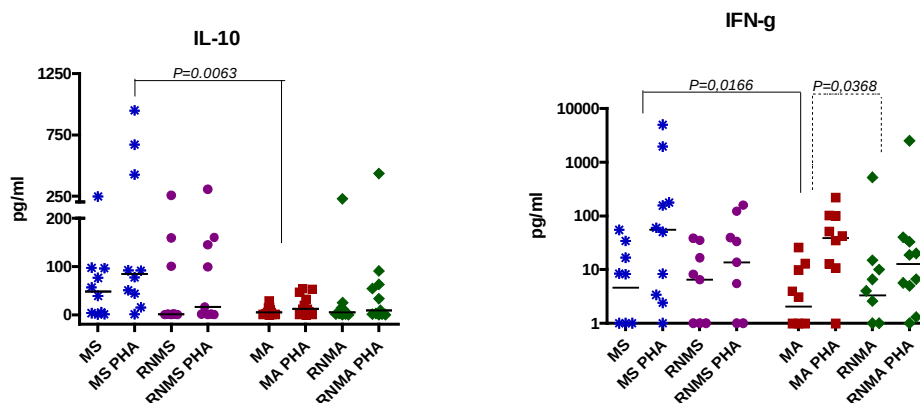


Figura 38: Produção de IFN- γ e de IL-10 por células mononucleares de mãe e cordão umbilical de pacientes saudáveis e asmáticas. 1×10^6 células foram estimuladas com PHA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 48 horas. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS PHA:** Células de mães saudáveis estimuladas com PHA, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS PHA:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com PHA, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA PHA:** Células de mãe asmáticas estimuladas com PHA, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA PHA:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com PHA (n população saudável = 10; n população asmática = 10).

Em relação a IL-4, mães saudáveis apresentaram níveis maiores quando comparadas com seu RN ($P = 0,0370$). Em relação a IL-5, não houve diferenças, estatisticamente significantes, entre células com ou sem estímulo, tanto no grupo saudável quanto no grupo asmático (**Figura 39**).

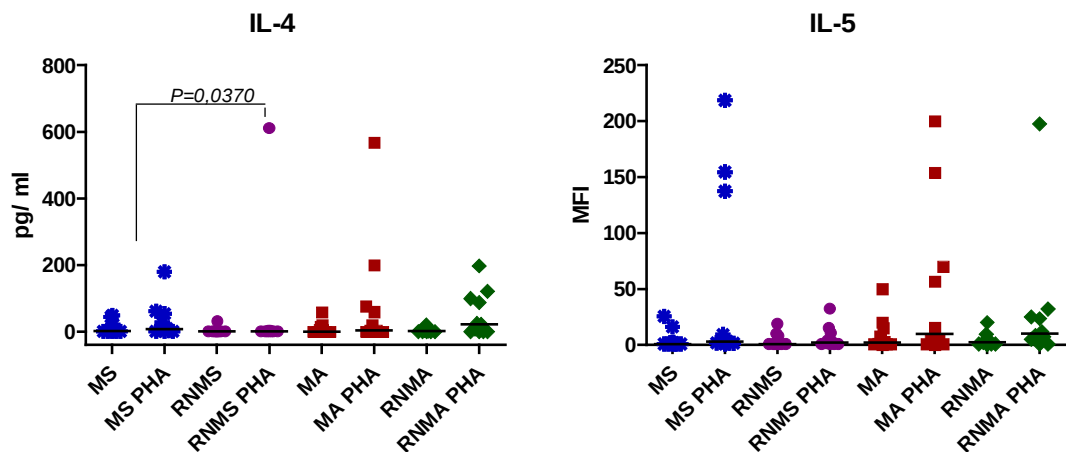


Figura 39: Produção de IL-4 e de IL-5 por células mononucleares de mãe e cordão umbilical de pacientes saudáveis e asmáticas. 1×10^6 células foram estimuladas com PHA ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) por 48 horas. **MS:** Células de mães saudáveis; **MS PHA:** Células de mães saudáveis estimuladas com PHA, **RNMS:** Células de cordão de RN de mães saudáveis; **RNMS PHA:** Células de cordão de RN de mães saudáveis estimuladas com PHA, **MA:** Células de mães asmáticas; **MA PHA:** Células de mãe asmáticas estimuladas com PHA, **RNMA:** Células de Cordão de RN de mães asmáticas. **RNMA PHA:** Células de cordão de RN de mães asmáticas estimuladas com PHA (n população saudável = 10; n população asmática = 10).

4.3.3 MEDIDA DE CITOCINAS NO SORO

Apesar da importância de entender o que acontece localmente quando uma célula libera citocinas capazes de ativar ou regular outra célula ou ela mesma, optamos pela medida de citocinas também no soro como uma forma de entender melhor os efeitos sistêmicos destas citocinas, que estão em contato direto com todas as células.

A **figura 40** mostra as medidas de IL-2 no soro de mães asmáticas e saudáveis e de seus RNs. Os resultados mostram que RNs de mães saudáveis apresentaram níveis mais elevados desta citocina no soro ($P=0,0372$).

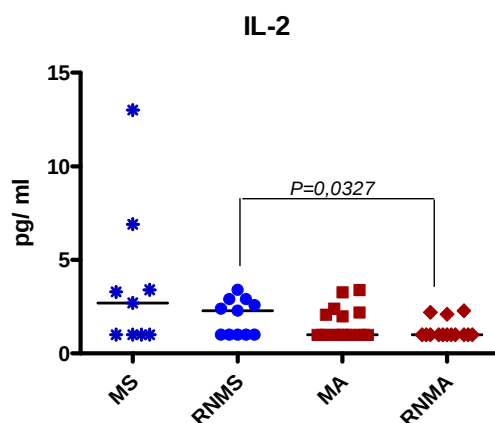


Figura 40: Valores de IL-2 dosados no soro de mães e de seus RNs. **MS:** mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 11; n população asmática = 17).

Ao medirmos a citocina IL12p70, observamos que não houve diferenças entre os grupos do estudo. Porém as medidas de TNF- α , nos mostram que mães asmáticas e seus RNs secretam quantidades menores desta citocina em comparação as mães saudáveis e seus RNs ($P = 0,0454$ e $P = 0,0126$ respectivamente) (**Figura 41**).

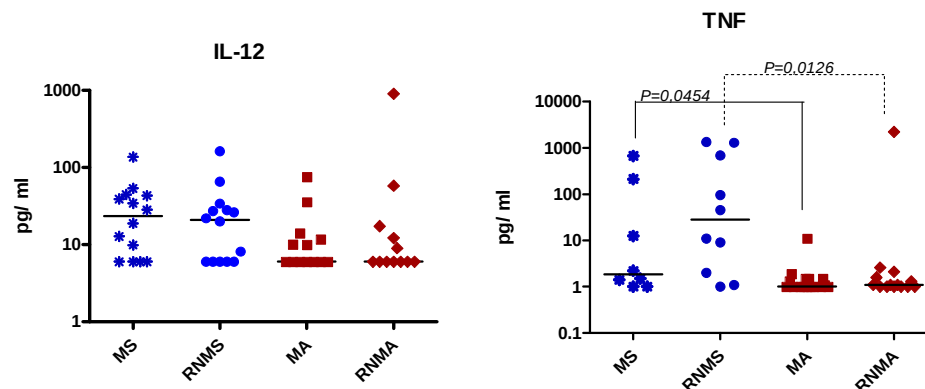


Figura 41: Valores de IL-12p70 e TNF- α dosados no soro de mães e de seus RNs. **MS:** mães saudáveis; **RNMS:** RN de mães saudáveis; **MA:** mães asmáticas; **RNMA:** RN de mães asmáticas (n população saudável = 11; n população asmática = 17).

As análises de IL-10 mostram que não há diferenças na concentração desta citocina no grupo estudado. Em relação ao IFN- γ , podemos observar que RNs de mães saudáveis possuem maiores concentrações destas citocinas no soro quando comparados com RNs de mães asmáticas ($P = 0,0117$) (**Figura 42**).

5. ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DO COLOSTRO

Alguns pesquisadores mostram que as células do colostro são ativadas, maiores e os monócitos apresentam inclusões lipídicas. A **Figura 44** mostra a morfologia de células do colostro.

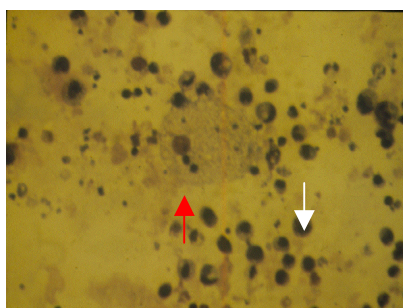


Figura 44: Fotografia de células do colostro feitas a partir de lâmina realizada com a técnica de Citospin. Podemos observar células menores que são linfócitos (seta branca). No meio da figura podemos observar a presença de um macrófago (seta vermelha) com inclusões lipídicas.

No entanto, infelizmente, há poucos estudos fenotípicos em células do colostro. O perfil destas células quando são analisadas no citômetro de fluxo é completamente diferente das células sanguíneas (**Figura 45**). Desta forma, torna-se necessário estudar com mais cuidado o modo da experimentação e compensação do citômetro. O *gate* de aquisição foi feito de acordo com Järvinen, 2002.

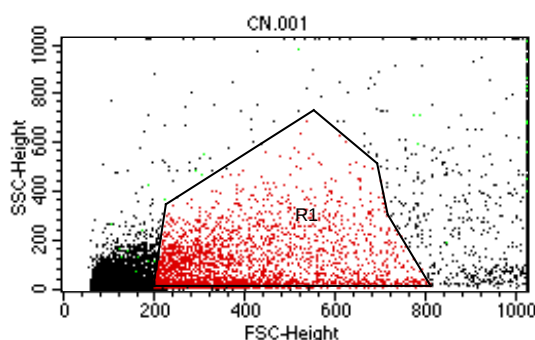


Figura 45: *Dot plot* de colostro de mãe saudável. Controle negativo – células sem marcação. Gráfico de tamanho e granulosidade.

Como o número de células presente no colostro varia intensamente entre as puérperas, não foi possível realizar com essas células as mesmas marcações feitas com as células do sangue das mães e seus respectivos RNs. Tivemos então que optar pelos marcadores de maior importância no foco do trabalho.

Na análise da expressão de CD3CD4 e CD3CD8 não foram observados valores percentuais dessas subpopulações celulares diferentes, quando comparamos o colostro de mães saudáveis com o colostro de mães asmáticas (**Figura 46**).

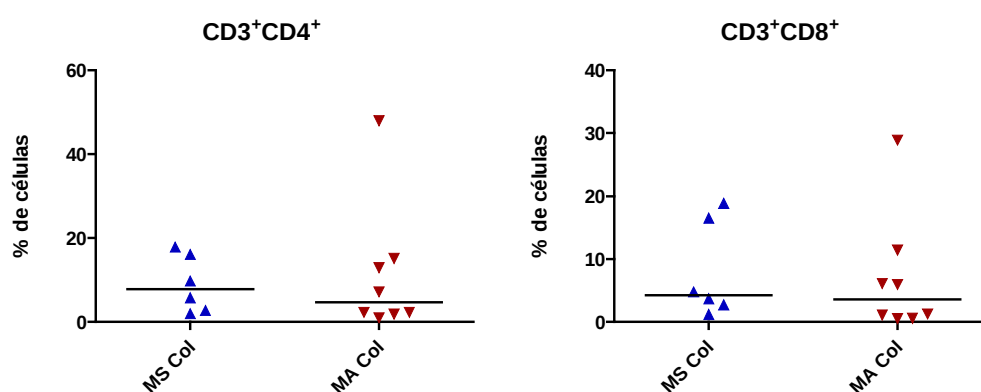


Figura 46: Análise fenotípica de CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em leucócitos do colostro de mães saudáveis e asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas. Experimento realizado com 6 amostras de colostro de mães saudáveis e 8 amostras de colostro de mães asmáticas.

Grande parte das células do colostro consiste em monócitos e células dendríticas. Observou-se que os valores percentuais de HLA-DR⁺CD123⁺ não são estatisticamente diferentes nas mães asmáticas em relação às mães saudáveis. O mesmo foi observado em relação a HLA-DR⁺CD11c⁺, onde observamos níveis semelhantes entre os dois grupos. Nessa análise, também utilizamos o coquetel ou mistura de anticorpos

Lin1 (BD, Biosciences, USA), como foi feito na marcação de DCs no sangue periférico (**Figura 47**).

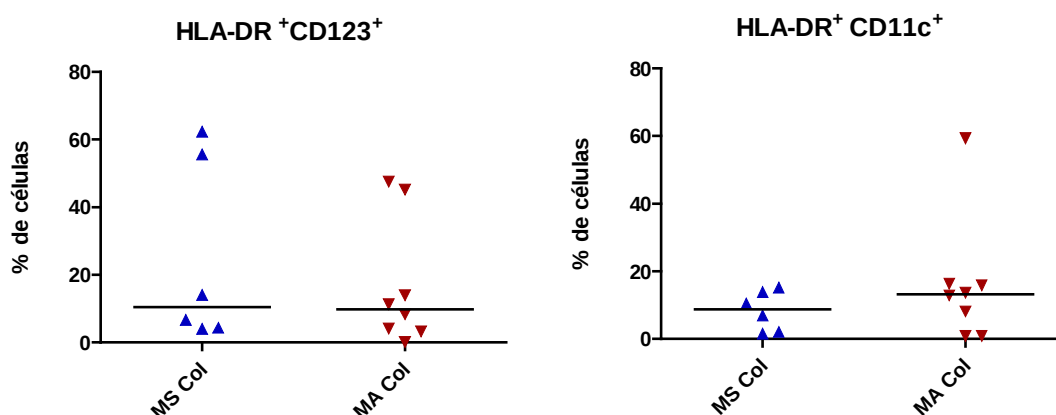


Figura 47: Análise fenotípica de HLA-DR⁺CD123⁺ e HLA-DR⁺CD11c⁺ em leucócitos do colostro de mães saudáveis e asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas. Experimento realizado com 6 amostras de colostro de mães saudáveis e 8 amostras de colostro de mães asmáticas.

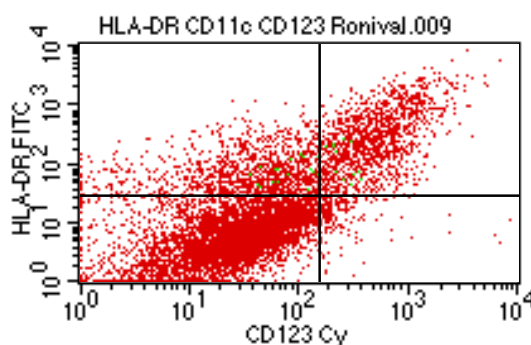


Figura 48: Dot plot de células HLA-DR⁺CD123⁺ do colostro de mães saudáveis.

A análise fenotípica de células CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺ e células CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻ nos mostra que células de mães asmáticas possuem a mesma expressão destes marcadores quando comparadas com as de mães saudáveis (**Figura 49**).

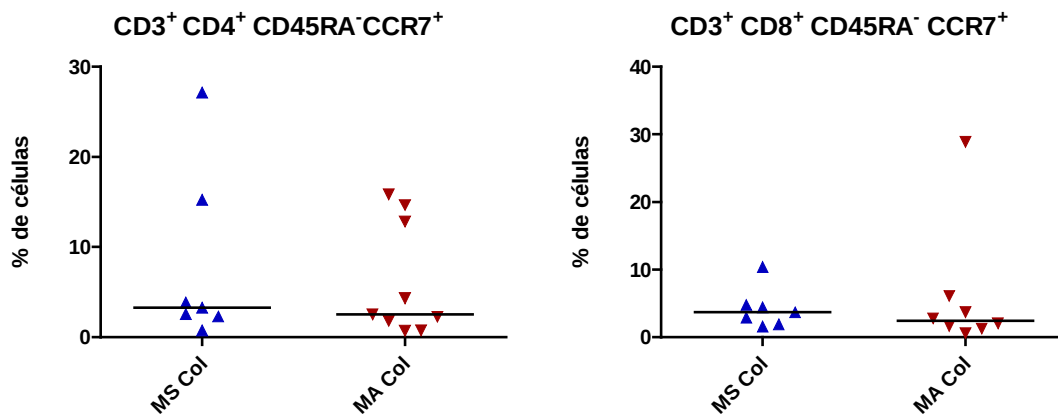


Figura 49: Análise fenotípica de CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ e CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺ em leucócitos do colostro de mães saudáveis e asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas. Experimento realizado com 6 amostras de colostro de mães saudáveis e 8 amostras de colostro de mães asmáticas.

5.1 MEDIDAS DE CITOCINAS NO COLOSTRO

No início do trabalho, tínhamos como objetivo medir as citocinas presentes no sobrenadante de cultura de células do colostro, porém devido à grande variabilidade do número de células no colostro de cada mãe, e a necessidade de um número elevado de células para a realização dos dois testes, optamos por utilizar as células disponíveis para a análise fenotípica e realizar a medida de citocinas apenas com o sobrenadante do colostro (O sobrenadante do colostro é a parte fluida restante após a retirada de gordura e das células).

As medidas de IL-2 nos mostram que não há diferenças estatísticas desta citocina entre os colostros de mães saudáveis e de mães asmáticas (**Figura 50**).

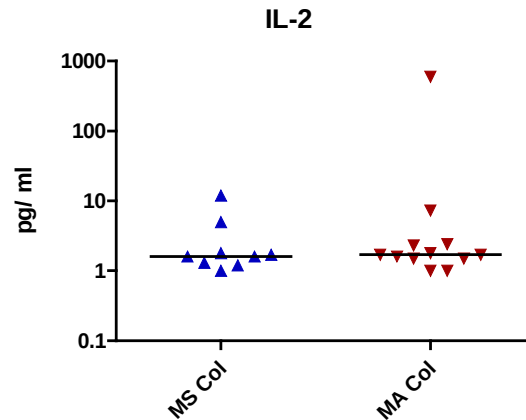


Figura 50: Medidas de IL-2 no sobrenadante de colostro de mães saudáveis e mães asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas (n população saudável = 9; n população asmática = 12).

Nas medidas de IL-12p70, observamos que o colostro das mães saudáveis e das mães asmáticas possui níveis equivalentes desta citocina, o mesmo acontece em relação às concentrações de TNF no colostro (**Figura 51**).

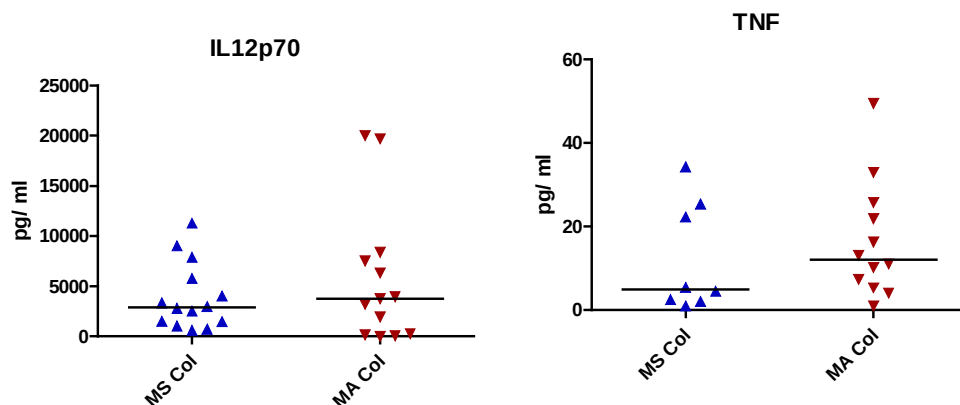


Figura 51: Medidas de IL-12p70 e TNF- α no sobrenadante de colostro de mães saudáveis e mães asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas (n população saudável = 14; n população asmática = 13).

Quando medimos IL-10, observamos que o colostro de mães asmáticas apresentou níveis equivalentes desta citocina em relação ao colostro de mães saudáveis. O mesmo resultado foi observado em relação ao IFN- γ . Os resultados podem ser observados na **figura 52**.

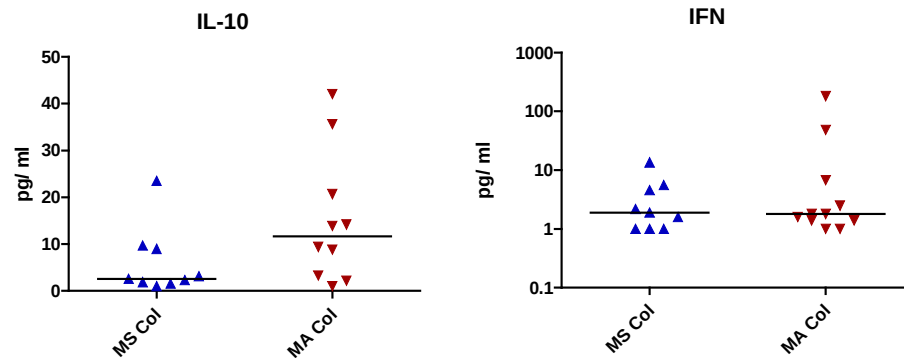


Figura 52: Medidas de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante de colostro de mães saudáveis e mães asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas (n da população saudável = 9; n população asmática = 10).

Assim como observamos com as outras citocinas, em relação a IL-4 e IL-5 também não observamos diferenças na concentração destas citocinas quando comparamos o colostro de mães saudáveis e no colostro de mães asmáticas (**Figura 53**).

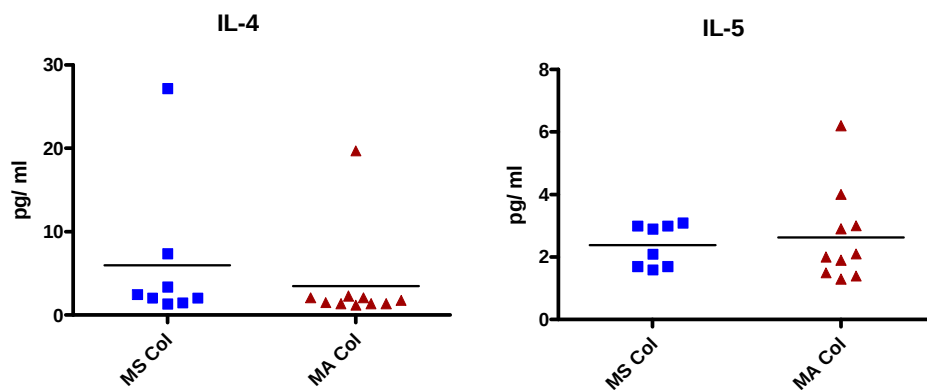


Figura 53: Medidas de IL-4 e IL-5 no sobrenadante de colostro de mães saudáveis e mães asmáticas. **MS Col:** Colostro de mães saudáveis, **MA Col:** Colostro de mães asmáticas (n da população saudável = 8; n população asmática = 8).

5 DISCUSSÃO

Doenças alérgicas, incluindo a asma atópica são multifatoriais, envolvendo interações complexas entre genes e o meio ambiente. Recentes estudos vêm levantando a hipótese da possível influência do ambiente intra-útero e das interações materno-fetais no desenvolvimento da asma (Lima et al, 2005).

O presente trabalho faz uma comparação do padrão imunológico de mães asmáticas com o de mães saudáveis e seus respectivos recém-nascidos.

Como um segundo delineamento do estudo, foram feitas as dosagens de IgE total e específica para o *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp-1). O Derp-1 é o alérgeno mais difundido na população brasileira através da poeira doméstica, sendo responsável por 84% das sensibilizações em crianças asmáticas no Brasil (LYNCH et al, 1997; TROMBONE et al, 2002). Realizamos também a medida de anticorpos IgE específicos para alérgenos presentes na poeira doméstica (HX2 – uma mistura de alérgenos do *D. pteronissinus*, *D. farinae*, pó doméstico e barata). A detecção de anticorpos IgE totais, assim como as identificações específicas de sensibilização, são essenciais para a confirmação do diagnóstico de alergia (TROMBONE et al, 2002).

Em nossos resultados, 76% das mães asmáticas apresentaram resultados de IgE anti-Derp-1 acima de 0,35 KU/ml, ou seja, são consideradas sensibilizadas a este alérgeno. O mesmo resultado foi observado em relação ao HX2. As outras cinco mães (24%), possivelmente foram sensibilizadas a outros alérgenos comuns em nosso meio, como antígenos alimentares, outros tipos de *Dermatophagoides* ou até mesmo a antígenos de animais, como de cão e gato.

Na avaliação dos níveis de anticorpos podemos observar que mães saudáveis apresentaram níveis mais elevados de IgM quando

comparado com as mães asmáticas. O mesmo resultado podemos observar em relação aos níveis de IgG total. Sabendo que a IgM, no momento da formação de anticorpos, é o primeiro a ser formado, podemos levantar a discussão de que indivíduos atópicos possuem níveis menores de IgM e IgG, porque no momento da formação dos anticorpos (Switch de isotipos) produzem níveis maiores de IgE.

O papel da IgG e suas subclasses ainda são controversos na literatura. Infere-se que a passagem transplacentária de IgG não só estimularia a maturação do sistema imune do neonato, como também a produção de IgG, diminuindo então a produção de IgE (PRESCOTT et al, 2000). Lange, em 2002, mostra que a transferência de IgG monoclonal de diferentes subclasses suprime a resposta de IgE em camundongos. Ao que parece, a ligação da IgG específica para o antígeno impediria a ligação da IgE a este mesmo antígeno, não ocorrendo então, a reação de hipersensibilidade imediata imunológica característica das atopias.

È importante também levantar a questão de que anticorpos IgG, transferidos da mãe para o feto, estimulariam a maturação de células B, e, conseqüentemente a secreção de anticorpos através da modulação isotípica conectada com respostas anti-idiotípicas. Ao que parece, idiotipos e anti-idiotipos maternos tem grandes propriedades imunorregulatórias e grande influência no desenvolvimento do repertório idiotípico do feto. De acordo com este conceito, podemos concluir que o início da ontogenia é decisivo para o desenvolvimento de doenças alérgicas humanas durante a vida adulta (LANGE et al, 2002; LENKE et al, 2004). No entanto, outros pesquisadores encontraram resultados diferentes em suas pesquisas. Prescott (2000), determinou os níveis de IgG e subclasses de IgG específicos para extrato de poeira doméstica em amostras de soro maternas e correlacionou com a resposta linfoproliferativa e produção de citocinas contra o mesmo alérgeno de seus filhos aos 2 anos de idade. O autor não observou correlação entre os níveis de IgG alérgeno-específica da mãe e a presença de sensibilização em seus filhos. Não observou, também, a

proliferação das células das crianças frente a este antígeno. Sugerindo então, que a influência materno-fetal possa ser transitória.

Além das dosagens de imunoglobulinas, realizamos também a imunofenotipagem de diversos marcadores, na tentativa de observar o padrão celular na interface materno-fetal, comparando o grupo de mães asmáticas com o grupo de mães saudáveis.

Estudos vêm mostrando a importância do CD23 na regulação dos níveis de IgE. Grande parte desses trabalhos foi realizada em camundongos, sugerindo que o CD23 seja um regulador negativo da produção de IgE (RIFFO-VASQUEZ, 2000). A análise dos nossos resultados não demonstrou diferenças entre os grupos avaliados em relação às células CD19⁺CD23⁺ ou CD19⁺CD23⁺CD40⁺. No entanto, Lewis (2004) constatou que camundongos NZB, que não possuem o gene que codifica o CD23, rapidamente desenvolvem uma condição de hiper IgE.

O papel das moléculas co-estimulatórias já foi bem elucidado nas diferentes condições patológicas e também na asma. Porém, muitos marcadores ainda não foram estudados na interface materno-fetal. O CD28 é responsável pelo segundo sinal na ativação de células T, quando se liga ao CD80 ou CD86. O papel do CD28 na asma vem sendo estudado e ao que tudo indica, a ativação desta molécula está envolvida na diferenciação de linfócitos para Th2 (NEUBER et al, 2006). Rulifsson (1997) realizou estimulação antigênica de células T de camundongos transgênicos com TCR específico para ovoalbumina. O autor observou aumento da ligação de CD28, e aumento da secreção de IL-4 e IL-5, constatando a importância deste receptor no desvio para padrão Th2 (RULIFFSON et al, 1997).

No presente trabalho, a molécula CD28 está sendo estudada pela primeira vez na interface materno-fetal. Os resultados mostram que na fenotipagem de células CD4⁺CD28⁺ RNs de mães asmáticas apresentaram percentual maior destas células. Podemos levantar a hipótese de que este marcador esteja envolvido na maior predisposição

de filhos de mães asmáticas desenvolverem esta doença ao longo da vida. Constatamos também que mães asmáticas possuem percentual mais elevado de células CD8⁺CD28⁺ em relação ao seu RN. Estudos mostram que do nascimento até os 18 meses quase todas as células CD4⁺ expressam CD28, enquanto que o nível de expressão desta molécula é mais baixo em células CD8⁺. No entanto a partir dos 18 meses de idade a expressão de CD28 aumenta em células T CD8⁺, levantando-se a hipótese, então de que o aumento de CD28 em linfócitos T CD8⁺ reflita a maturação destas células frente a estimulação antigênica (ZDOLZEK & JENMALM, 2003).

Zdolsek (2003) não observou diferenças na expressão de CD28 em células CD4⁺, entre crianças atópicas e não atópicas. No entanto, Wong (2005), mostrou elevada expressão de CD28 em células CD8⁺ em pacientes adultos asmáticos. Um interessante estudo mostra que pacientes adultos com dermatite atópica apresentam auto-anticorpos anti-CD28 que estimulam esta molécula na superfície celular levando ao desvio da célula para Th2 (NEUBER et al, 2006). Outro dado importante nesse estudo foi a significativa correlação positiva entre o *score* de severidade do GINA (The Global Initiative on Asthma) e a expressão na superfície celular de CD28 em PBMC (Células mononucleares do sangue periférico), indicando que há relação entre a progressão da doença e a expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície celular. Os nossos resultados sugerem que estudos mais minuciosos desta molécula se faz necessário, de forma que possamos entender melhor a sua real participação na patogênese da asma.

Outra importante interação entre moléculas co-estimulatórias na asma é a ligação entre CD40 e CD154 (CD40L). Esta ligação é essencial para que ocorra o diálogo entre células T, DCs (células dendríticas) e células B (KROCZEK & HAMELMANN, 2005). Em nosso trabalho, observamos que não houve diferença entre os grupos asmático e saudável na marcação de células CD19⁺CD40⁺. Também não observamos diferenças entre os grupos na marcação de células

CD3⁺CD8⁺CD154⁺. Porém, na marcação de células CD3⁺CD4⁺CD154⁺, observamos que mães asmáticas apresentaram valores superiores destas células quando comparadas com mães saudáveis. Estudos vêm mostrando que a ligação de CD40 com CD154 faz com que haja uma diminuição na resposta Th2, através do aumento da liberação de IL-12 (GATELY et al, 1998). De acordo com estes dados, Tang (2001), observou correlação entre a expressão de CD40, em macrófagos presentes nas vias aéreas, e sua produção de IL-12, e reportou um defeito na sinalização de CD40 por estes macrófagos em pacientes com asma atópica.

Hellings (2006) observou em camundongos que a estimulação de CD40, realizada simultaneamente com a sensibilização, atenuou a inflamação alérgica das vias aéreas, reduziu a presença de eosinófilos nos brônquios e reduziu a produção de citocinas Th2. Porém, o papel principal de CD40 em atopias ainda é controverso. Através de estudo de imunohistoquímica, Cagnoni (2004) demonstrou que o CD40 é expresso nas células epiteliais normais do trato respiratório, e que estas células induzem a inflamação do tecido. Estes dados nos mostram então, que não só células do sangue possuem a capacidade de se ativar através da interação CD40-CD154, mas também células do tecido respiratório.

Mehlhop (2000), desafiando camundongos CD40^{-/-} e camundongos CD40L^{-/-} com *Aspergillus fumigatus*, observou que a interação de CD40/CD154 é requerida para resposta de IgE, mas não é necessária para o influxo de eosinófilos e inflamação. Porém, o autor constatou que CD154, mas não CD40, parece ser necessário para que ocorra a hiperreatividade brônquica. Uma possível explicação para o requerimento de CD154 na indução da hiperreatividade brônquica, seria que a molécula CD154 por si só modularia a função das células T independente da ligação com CD40. Neste estudo não observamos diferenças na expressão de CD40 na população asmática, este dado nos faz pensar no real papel desta molécula juntamente com CD154 na patogênese da asma. .

Células T têm um papel central na inflamação das vias aéreas e, conseqüentemente na asma. Assim, não só o estudo das moléculas de co-estimulação é importante, como também o estudo das características dos linfócitos T pode ser de extrema relevância.

Em nosso estudo, observamos que o grupo asmático possui os mesmos percentuais de células CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺, quando comparado ao grupo de mães saudáveis, ou seja, com fenótipo naíve. Quando marcamos CD3⁺CD4⁺CD45RO (fenótipo de memória), observamos que mães asmáticas possuem percentuais maiores de células CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ em relação aos seus RNs. Em relação às células CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺, observamos que mães asmáticas e mães saudáveis possuem percentuais maiores em relação aos seus RNs.

Poucos estudos foram realizados com células de memória na asma, e nenhum foi feito em relação às células de memória na interface materno-fetal. LARA-MARQUES (2001) realizou um estudo para observar a presença de células T CD4⁺CD45RO⁺ em adultos asmáticos. O autor mostra que indivíduos asmáticos possuem valores mais elevados de células com fenótipo de memória em relação aos adultos saudáveis.

Na tentativa de observar os diferentes tipos de subpopulações de linfócitos T de memória, realizamos a imunofenotipagem e células T de memória central (T_{cm}) e de memória efetora (T_{em}). Tais células ainda são pouco estudadas na interface materno-fetal e na asma atópica. Observamos que mães asmáticas possuem percentual de células de memória central (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺) mais alta quando comparado com mães saudáveis. Células de memória central são caracterizadas por sua habilidade de proliferar e secretar altos níveis de IL-2, uma citocina conhecida pela sua ação na proliferação de linfócitos. Estas células após a estimulação antigênica podem se diferenciar em células Th1 ou Th2, que são produtoras de IL-4 e IL-5, citocinas sabidamente envolvida na patogênese da asma (HALWANI et al, 2006). Kinyanjui, 2007 mostra que células T que expressam grandes

quantidades de CD4 em sua superfície apresentam grande potencial de desencadear processos inflamatórios, aqui no caso, alérgicos. Podemos sugerir então que este maior percentual de células T CD4⁺ de memória central pode contribuir para o desenvolvimento da patogênese da asma. Pois estas células podem ser específicas para antígenos que provoquem uma ativação do tipo Th2 com conseqüente liberação de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, gerando então a resposta alérgica, com predomínio de anticorpos IgE e conseqüentemente o desencadeamento de crises asmáticas. Para comprovar esta hipótese seria importante realizar estudos funcionais destas células.

Outro tipo celular de extrema importância na patogênese da asma é a célula dendrítica (DC). São raros os estudos sobre o papel das DCs na interface materno-fetal e quase não encontramos estudos dessas células em relação às mães asmáticas e seus RNs. Aldebert (2007) mostra que a caracterização de diferentes subpopulações de DCs é importante para o entendimento da relação imunológica entre mãe e feto, e para o melhor entendimento dos mecanismos que facilitam a tolerância ao feto pelo sistema imune materno. Este autor demonstra que a proporção de DCs na população de leucócitos foi diminuída no sangue periférico de mulheres grávidas, quando comparadas àquelas não grávidas. Porém, o trabalho mostra que os subtipos de DCs foram ativados (aumento da expressão de HLA-DR).

Em nosso estudo, observamos que mães asmáticas possuem percentual maior de células CD123⁺ quando comparadas com mães saudáveis. DCs linfóides são conhecidas pelo seu envolvimento na formação de resposta do tipo Th2. Estudos mostram que é grande a presença de DCs linfóides na mucosa nasal de adultos com rinite alérgica quando estes são desafiados com alérgenos repetidamente (Jahnsen et al, 2000). Quando realizamos a marcação com o *cocktail* Lin1 que é constituído por marcadores que não estão geralmente presentes em DC (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56, confirmamos o mesmo resultado citado acima. Quando observamos a

MFI de CD86 nestas células observamos que as células CD123⁺ de mães asmáticas e de seus RNs possuem maior número de CD86 em sua superfície. Estudos mostram, em modelo murino, que o bloqueio de CD86, mas não o bloqueio de CD80 diminui a eosinofilia e a hiperresponsividade das vias aéreas (Haczku, 1999 do Upham). No entanto este assunto ainda é controverso, pois outros estudos mostram que ambas as moléculas, CD80 e CD86 são importantes para o desvio para Th2 (Harris, 1997). Concordando com esta hipótese mães asmáticas possuem MFI de CD80 mais elevada em relação a mães saudáveis.

A molécula CD86 também está mais expressa em células dendríticas CD11c⁺ em mães asmáticas, que apresentam valores percentuais maiores dessas células quando comparado com mães saudáveis. RN de mães asmáticas apresentam MFI de CD80 maior em relação ao RN de mães saudáveis. Chen (2006) mostra que a expressão de CD86, mas não de CD80, em DCs maduras de pacientes asmáticos é aumentada em relação a doadores saudáveis. O envolvimento destas duas moléculas, CD80 e CD86, na patogênese da asma e de doenças atópicas é um fato. A presença de valores percentuais de células CD11c⁺CD80⁺, quando utilizamos o *cocktail* Lin1, maiores no sangue do cordão do RN de mães asmáticas pode indicar que células dendríticas mielóides destes RNs são mais ativadas. Se levarmos em consideração os estudos que mostram que a ativação por CD80 e CD86 desvia a resposta para Th2 podemos levantar a hipótese de que RNs de mães asmáticas possuem maior potencial de resposta TH2 em relação ao RN de mães saudáveis.

Após o estudo dos anticorpos e da fenotipagem das células na interface materno-fetal na asma, investigamos as citocinas envolvidas no processo da gestação e na patogênese da asma. No presente trabalho, tivemos a oportunidade de determinar os níveis de citocinas no sobrenadante celular e observamos a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-13 por células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺.

Já é bem estabelecido que indivíduos com doenças atópicas, como a asma, apresentam maior produção de IL-4, IL-5 e IL-13. No início do trabalho, pretendíamos analisar a resposta proliferativa dos linfócitos frente à estimulação com PHA através da incorporação de timidina. No entanto, ao constatar que não haveria células suficientes para realizar estes ensaios (marcar a produção intracelular de citocinas e determinar os níveis de várias citocinas no sobrenadante), optamos por determinar os níveis de IL-2 no sobrenadante celular. A IL-2 é conhecidamente uma citocina importante para a proliferação celular e a elevação de seus níveis nos indica que houve proliferação das células (HASHIMOTO, 2006).

Nossos resultados demonstram que houve um significativo aumento nos níveis de IL-2 no sobrenadante de células estimuladas com PHA de mães saudáveis, quando comparamos com a secreção desta citocina no sobrenadante celular seus respectivos RNs. A IL-2 é uma citocina importante para proliferação de linfócitos. A cadeia alfa do receptor desta citocina é a molécula CD25. Alguns estudos mostram que a presença de IL-2 é essencial para formação e manutenção de células T regulatórias. Alguns pesquisadores sugerem que uma menor secreção de IL-2, poderia levar a um número menor de células regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Setogushi, 2005). O estudo deste eixo IL-2/Treg CD4⁺CD25⁺ é tão importante que temos como objetivos futuros estudar a presença destas células, assim como a presença de FOXP3 e CTLA-4 juntamente com a dosagens de TGF- β e relacionar estes dados com os resultados de IL-2 deste trabalho.

Na marcação intracelular de IL-4 não observamos diferenças na produção intracelular desta citocina entre mães asmáticas e mães saudáveis. Também não observamos diferenças entre células do cordão de recém-nascidos de mães asmáticas, quando comparados com células do cordão de recém-nascidos de mães saudáveis. Porém mães asmáticas apresentaram MFI maior quando comparado com mães saudáveis. RNs de mães asmáticas apresentaram MFI maior em relação

a RNs de mães saudáveis, este por sua vez, apresentou MFI maior em relação a sua mãe. Sabendo-se que o ambiente intra-uterino é um ambiente predominantemente Th2, entendemos o porquê as citocinas deste padrão estão mais altas nos RNs. O curioso deste teste foi que, observamos produção espontânea desta citocina em todos os grupos estudados.

Nas dosagens de IL-4 no sobrenadante de cultura celular, não estimulada e estimulada com PHA, observamos que não houve diferenças significantes entre os grupos, assim como também não houve diferenças entre os grupos nas dosagens de IL-4 no soro. Contrastando com nosso estudo, Prokesová (2006) avaliou os níveis de IL-4 no soro de mães alérgicas, no soro do cordão de seus respectivos RNs e nestes infantes 12 meses após o nascimento. Este autor demonstrou que mães alérgicas e seus respectivos filhos possuíam altos níveis de IL-4 no soro, quando comparados com o soro de mães saudáveis e seus filhos. Interessantemente, não houve diferença nos níveis de IL-4, quando o autor comparou os níveis encontrados no soro de cordão com aqueles detectados no soro dessas crianças 12 meses após o nascimento. Os níveis de IL-4 no cordão são relativamente altos, informação que é confirmada pela detecção de produção espontânea nos ensaios de marcação intracelular de citocinas. Porém, este autor não encontrou essa diferença quando avaliou os níveis de IL-13.

Diversos estudos mostram a participação da IL-13 no processo alérgico. No presente estudo, podemos observar valores percentuais de células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ produtoras de IL-13 maiores em mães asmáticas em relação às mães saudáveis. Concordando com estudos que mostram que o RN possui um perfil preferencial Th2 ao nascer, RNs de mães saudáveis apresentaram valores percentuais de células CD3⁺CD4⁺ e CD4⁺CD8⁺ produtoras de IL-13 maiores em relação a sua mãe. Assim como RNs de mães asmáticas apresentaram valores maiores de células CD3⁺CD8⁺ em comparação com RNs de mães saudáveis.

Há poucos estudos sobre a marcação intracelular desta citocina. SPINOZZI (2001) marcou células CD4⁺CD13⁺ em cordão de RNs de mães atópicas e constatou que estas células produzem níveis mais elevados de IL-13, quando comparadas com células do cordão de RNs de mães saudáveis. No entanto, estudos sobre a dosagem de IL-13 no sobrenadante de células mostram que indivíduos atópicos apresentam níveis mais elevados desta citocinas após estimulação antigênica (PROKESOVA, 2006). KOPP em 2001 observou que PBMC de mães sensibilizadas com β -lactoglobulina produziram níveis mais baixos de IFN- γ após estimulação das células com este antígeno e que este dado teve correlação com os níveis mais altos de IL-13 em seus RNs. Este é um importante estudo que indica a influência materna no perfil imunológico de filhos de mães atópicas.

A IL-5 é uma citocina que apresenta papel importante no processo alérgico. Assim, determinamos os níveis dessa citocina no sobrenadante celular das mães e do cordão em ambos os grupos, asmático e saudável. Observamos que não houve diferenças na secreção desta citocina entre os grupos do estudo. Assim como também não houve diferenças na secreção desta citocina no soro de mães e RNs envolvidos neste estudo. Resultados semelhantes foram observados por PROKESOVÁ (2006) em sua população de estudo. Porém é importante mais uma vez ressaltar que ocorrem mudanças no perfil de citocinas no decorrer da idade. NEVILLE et al. (2003) demonstraram que, após 1 ano de idade, há associações entre os níveis de IL-5, IL-13 e o desenvolvimento de atopias. Interessantemente, pesquisas vêm mostrando que a IL-13 e IL-4 apresentam sinergia com IL-5 e TNF- α .

O TNF- α é uma citocina proinflamatória que contribui para a perpetuação da resposta inflamatória na asma alérgica (WONG et al, 2001).). Na avaliação dos níveis de TNF- α no sobrenadante celular, observamos que a produção desta citocina pelas mães asmáticas não foi significativamente diferente daquela apresentada pelas mães saudáveis. Quando medimos as concentrações de TNF- α no soro, observamos que

mães saudáveis apresentaram valores maiores desta citocina em relação às mães asmáticas. RNs de mães saudáveis também apresentaram valores mais elevados de TNF- α quando comparado com os níveis apresentados por RNs de mães asmáticas. Estudos mostram que os mastócitos são os grandes responsáveis pela alta concentração de TNF- α no soro de indivíduos asmáticos (Nakae, 2007).

Uma citocina que não poderíamos deixar de avaliar, por ser predominante no padrão Th1, é o IFN- γ . Na marcação intracelular dessa citocina, constatamos que células CD3⁺CD4⁺ de mães asmáticas e seus RNs apresentaram níveis menores de IFN- γ quando comparados com mães saudáveis e seus RNs. E curiosamente, células CD3⁺CD8⁺ de mães asmáticas e seus RNs produziram mais IFN- γ quando comparados ao grupo controle. No entanto não houve diferenças nos níveis de MFI apresentados pelos grupos. Contrastando com nossos resultados, Tamási em 2005 observou que células CD3⁺ de mães asmáticas produziram maiores quantidades de IFN- γ em comparação com mães saudáveis e mulheres não grávidas.

LANGE, em 2003, não observou diferenças significativas dos níveis de IFN- γ quando estimulou células do cordão umbilical de crianças de famílias atópicas. No entanto, estudos vêm demonstrando que ainda é muito controverso os níveis de citocinas no sobrenadante de pacientes atópicos. PROKESOVÁ (2006) observou níveis mais elevados de IFN- γ no soro de crianças com 1 ano de idade de mães atópicas, quando comparados aos níveis dessa citocina no soro de crianças de mães saudáveis. Estes resultados contrastam com um grande número de trabalhos, que mostram que a produção de IFN- γ é menor no cordão de crianças que futuramente vão desenvolver atopia. Ao dosar IFN- γ no sobrenadante de células após a estimulação com PHA, nós observamos que mães saudáveis secretaram maiores quantidades desta citocinas em comparação as mães saudáveis. Em nosso trabalho nós mostramos que células CD3⁺CD4⁺ de mães asmáticas produziram e secretaram quantidades menores de IFN- γ . Em relação ao maior número de células

CD3⁺CD8⁺ produtoras de IFN- γ , MAGNAN em 2000, obteve o mesmo resultado quando comparou a produção desta citocina em linfócitos CD3⁺CD8⁺ em indivíduos com asma atópica com indivíduos atópicos não asmáticos. Este autor ressalta que a alta produção de IFN- γ por células CD3⁺CD8⁺ é uma característica de indivíduos asmáticos.

Outra importante citocina que participa do padrão Th1 é a IL-12. A IL-12 é principalmente produzida por APCs, como macrófagos e DCs, em resposta a produtos microbianos, citocinas de células T e após co-estimulação através do CD40. Neste trabalho, observamos que todas as células estimuladas com PHA produziram níveis maiores desta citocina em relação às células não estimuladas. Entretanto, células de mães asmáticas secretaram quantidades significativamente maiores, quando comparadas às do cordão de seus respectivos RNs. O mesmo aconteceu em relação à mãe saudável e seu RN. No entanto, mães asmáticas apresentaram níveis maiores de IL-12 em relação às mães saudáveis.

Em relação às dosagens de IL-12 no soro, não observamos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de estudo. Nilsson (2004) mostra números menores de células produtoras de IL-12 em cordão de crianças com atopia hereditária, quando comparados às células do cordão de crianças saudáveis. Em contraste com este estudo, Magnan (2000) mostra que sobrenadante de células de indivíduos com asma atópica possuíam níveis mais elevados de IL-12. O autor ressalta que a produção de IFN- γ é dependente da secreção de IL-12. Mostrando então a tentativa que o organismo realiza; aumentando a liberação de IFN- γ e IL-12 de forma a equilibrar o desvio da resposta, que no caso de asmáticos é predominantemente Th2.

Após determinarmos os níveis de citocinas no perfil Th1 e Th2, não poderíamos deixar de avaliar a concentração de IL-10, uma citocina com capacidade imunorregulatória e citada no perfil Th3 em nossa população de estudo. Nossos resultados mostram que células de mães saudáveis após estimulação com PHA secretaram quantidades significativamente maiores de IL-10, quando comparadas com mães

asmáticas. Estes dados contrastam com os achados de Wong (2001), que constatou níveis maiores desta citocina no plasma de pacientes adultos asmáticos. Outro estudo mostra que células de cordão de mães que foram sensibilizadas a poeira doméstica, após estimulação específica (poeira doméstica) secretaram quantidades equivalentes de IL-10 quando comparados com células do cordão de RNs saudáveis (Marks, 2002). Quando realizamos a dosagem de IL-10 no soro, observamos que não houve diferenças entre os grupos de estudo.

Na tentativa de entender melhor a influência de mães asmáticas em seus RNs, não podemos deixar de estudar o colostro. A importância do colostro como primeiro alimento na vida de um indivíduo está bem estabelecida cientificamente e em relação ao forte vínculo que se forma entre mãe e filho no ato da amamentação. Ao nascimento o neonato apresenta criptas e vilosidades intestinais pouco desenvolvidas. Durante a maturação intestinal sabe-se que ocorrem fissuras que levam a duplicação dos vilos intestinais, com posterior hiperplasia das criptas. Estudos mostram que o leite humano tem a capacidade de estabilizar o crescimento dos vilos, pois contém fatores de crescimento de células epiteliais, enquanto que crianças alimentadas com fórmulas apresentaram um maior espaçamento entre as células epiteliais, favorecendo a translocação bacteriana, e consequentemente aumentando a susceptibilidade a doenças infecciosas (Duffy, 2000. ; Cummins, 2002).

Devido a maior permeabilidade intestinal apresentada pelo neonato, células e citocinas presentes no colostro e leite maduro exercem grande influência sobre a maturação intestinal, desenvolvimento do sistema imune associado às mucosas e maturação do sistema imunológico sistêmico. Pesquisadores mostram que crianças amamentadas até 10 meses possuem o timo maior em relação a crianças amamentadas com fórmulas. O colostro humano é um “preparado” imunológico já pronto e adequado ao desenvolvimento imunológico do neonato, pois observamos a presença de fatores de

crescimento, de imunoglobulinas, citocinas e células já ativadas (Kankoudi-Tsakalidou, 2004).

Como já foi citado, diversos estudos vem questionando a amamentação por parte de mães asmáticas. Pesquisadores levantam a questão de que células e citocinas poderiam influenciar a resposta imunológica futura da criança contribuindo para o desenvolvimento de um adulto atópico (Friedman, 2005; Bergmann, 2002; Sears, 2002).

Quando analisamos células $CD3^+CD4^+$ e células $CD3^+CD8^+$, observamos que o percentual de células do colostro de mães asmáticas e saudáveis não foi significativamente diferente. O mesmo resultado foi observado em relação à fenotipagem de células T de memória central ($CD3^+CD4^+CD45RA^-CCR7^+$)

Diferentemente do que foi observado no sangue total, a imunofenotipagem de células dendríticas $CD11c^+HLA-DR^+$ e $CD123^+HLA-DR^+$ não apresentou diferenças significativas entre os grupos do estudo. São muito poucos os estudos realizados com células do colostro humano. Jarvinen (2002) mostra (através de técnica de citospin) que o leite de mães atópicas apresentou maior percentual de eosinófilos em comparação com o leite de mães saudáveis. O autor conclui que o aleitamento materno pode predispor o neonato a futuras doenças atópicas devido a este diferente conteúdo celular.

Partimos para analisar então as citocinas estudadas ao longo do trabalho de forma a poder comparar a presença destas substâncias no colostro de mães asmáticas com o colostro de mães atópicas. Quando comparamos os valores encontrados de IL-2 no colostro, observamos que não há diferenças estatisticamente significativas entre o colostro de mães saudáveis e o colostro de mães asmáticas. Como já foi citada, a IL-2 é uma citocina que leva a proliferação celular e induz a formação de células regulatórias. O estudo destas células no colostro humano é uma das perspectivas futuras deste trabalho. Diferentemente dos resultados observado no sobrenadante de células estimuladas, também não observamos diferenças nas dosagens de IL-12p70 entre o colostro

de mães saudáveis e o colostro de mães asmáticas. O mesmo resultado pode ser observado em relação ao TNF- α . Hawkes (2002), ao comparar a produção de TNF- α no sobrenadante de PBMC com o de células do colostro de mães saudáveis após estimulação, observou que as células do colostro são capazes de produzir as mesmas quantidades desta citocina após estimulação.

Contrariando outros estudos, mães asmáticas não apresentaram concentrações mais elevadas de IL-4 e IL-5 quando comparado com o colostro de mães saudáveis. Bottcher (2000) encontrou altas concentrações de IL-4 no colostro de mães alérgicas em comparação ao colostro de mães não alérgicas, com achados similares para IL-5 e IL-13. Em relação ao IFN- γ também não observamos diferenças entre o colostro das mães envolvidas no estudo.

Nas dosagens de IL-10 também não observamos diferenças estatisticamente significativas entre o colostro das mães envolvidas no estudo. A IL-10, como já foi dito, apresenta grande papel na imunorregulação do sistema imune e induz a produção de IgA pelos plasmócitos presentes na glândula mamária (Field, 2005). Nosso grupo de mães asmáticas, diferentemente de outros estudos, apresentou níveis equivalentes de IgA no sangue e no colostro quando comparado as mães saudáveis. Estes resultados são compatíveis com os níveis iguais de IL-10 no soro e no colostro das mães asmáticas em comparação com as mães saudáveis.

Pesquisas mostram que ocorre a passagem de antígenos que as mães entraram em contato, principalmente antígenos alimentares e de enterobactérias. Estudos ressaltam que essa passagem de antígenos pode sensibilizar a criança, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças atópicas (Savilahti et al., 2005). No entanto, um estudo foi realizado em modelo murino e observou-se que antígenos das vias aéreas (de camundongos fêmeas sensibilizados com OVA) foram transferidos de mães para filhos durante o aleitamento. A passagem destes anígenos via oral levou a tolerização da cria frente à OVA. O

autor ressalta que a prática do aleitamento materno é um excelente modelo natural de tolerância oral antígeno-específico e sugere que um dos responsáveis pelo desenvolvimento de tolerância é a grande quantidade presente de TGF- β presente no leite materno.

Um importante trabalho, realizado em modelo murino mostra que o colostro contém fatores que são suficientes, mas não necessários para aumentar a susceptibilidade do neonato ao desenvolvimento de doença alérgica das vias aéreas. Este autor, não encontrou diferenças nas dosagens de IFN- α , IL-2, IL-4, IL-5, TNF- γ e IL-13 entre o modelo murino asmático utilizados no trabalho e o grupo controle. No entanto, o autor sugere que outros fatores que não o aleitamento aumenta a susceptibilidade de filhos de mães asmáticas desenvolverem asma. Tais fatores seriam a genética, o meio ambiente e a evidência de que leucócitos maternos são capazes de passar pela barreira placentária tendo acesso ao organismo fetal (Leme, 2006; Papadogiannakis, 1997 29 do Leme).

Podemos concluir em nosso trabalho que Mães asmáticas possuem menores níveis de IgG e IgM em seu soro, o que parece contribuir para um aumento dos níveis de IgE no soro. Mas esta diferença não interfere nas concentrações destas imunoglobulinas de seus RNs.

Mães asmáticas possuem elevados valores percentuais de células CD3+CD4+CD45RA-CCR7, características de células de memória central, assim como possuem níveis maiores da molécula co-estimulatória CD154+. Estes linfócitos CD3+CD4+ produzem maiores quantidades de citocinas como IL-13 e IFN- γ .

Células dendríticas mielóides (CD11c+) e linfóides (CD123+) de mães asmáticas possuem maior expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, Assim como células mielóides de seus RNs possuem maior expressão de CD80. Células de mães asmáticas produzem níveis menores de IL-10 após estimulação inespecífica.

O colostro de mães atópicas não possui diferenças entre os parâmetros aqui estudados, podendo então o aleitamento materno ser altamente indicado para mães asmáticas e seus filhos.

O presente trabalho é um estudo extremamente relevante e pode trazer muitas contribuições para o entendimento da influência materna sobre o desenvolvimento do sistema imunológico do recém-nascido. O aleitamento materno, prática tão importante no bom desenvolvimento e crescimento da criança, deve ser estimulado, pois não observamos contra indicações baseados nos resultados deste estudo. No entanto, temos consciência de que a interação mãe-filho é só o início da formação do padrão imunológico que a criança vai apresentar. Fatores como hereditariedade, estilo de vida, meio ambiente e talvez, até estímulos frente a outros patógenos, provavelmente vão influenciar na geração de uma criança, e conseqüentemente, de um adulto asmático. Talvez, devido a estes fatos, sejam encontrados tantos trabalhos com diferentes resultados no estudo das atopias.

6 CONCLUSÕES

1. Mães asmáticas possuem menores níveis de IgG e IgM séricas, o que parece contribuir para um aumento dos níveis de IgE no soro. Mas esta diferença não interfere nas concentrações destas imunoglobulinas de seus RNs.

2. Mães asmáticas possuem elevados valores percentuais de células CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺, características de células de memória central, assim como possuem níveis maiores da molécula co-estimulatória CD154⁺. Linfócitos CD3⁺CD4⁺ produzem maiores quantidades de citocinas como IL-13 e IFN- γ .

3. Células dendríticas mielóides (CD11c⁺) e linfóides (CD123⁺) de mães asmáticas possuem maior expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, Assim como células mielóides de seus RNs possuem maior expressão de CD80. Células mononucleares do sangue periférico de mães asmáticas produzem níveis menores de IL-10 após estimulação inespecífica.

4. O colostro de mães atópicas não possui diferenças parâmetros aqui estudados, podendo então o aleitamento materno ser altamente indicado para mães asmáticas e seus filhos.

7 PERSPECTIVAS

1 Para melhor investigar a presença de célula T reguladoras., será realizada a marcação intracelular de FOXP3, juntamente com a marcação de superfície de CD4, CD25, CTLA-4 e LAP (Latency-associated peptide) de células mononucleares de mães asmáticas, seus RNs e seu colostro, assim como do grupo controle (as células estão congeladas prontas para a realização do teste)

2 Dosaremos a citocina TGF- β no soro, no colostro e no sobrenadante de PBMC de mães asmáticas e seus RNs assim como no grupo controle.

3 Os filhos das mães asmáticas envolvidas neste estudo serão acompanhados pela Dra. Márcia Mallozi da Faculdade de Medicina da Universidade de Federal de São Paulo .

REFERÊNCIAS

- ADKINS, B. T cell function in newborn mice and humans. **Immunol Today. 20:** 330-5, 1999.
- AKBARI, O.; STOCK, P.; DEKRUYFF, R.H.; et al. Mucosal tolerance and immunity regulating the development of allergic disease and asthma. **Int Arch Allergy Immunol. 130:** 108-18, 2003.
- AKBARI, O. ; DEKRUYFF, R.H. ; UMETSU, D. ; et al. Pulmonary dendritic cells secreting IL-10 mediate T cell tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Nat Immunol. 2:** 725-31, 2001.
- ALDEBERT, D.; DIALLO, M.; NIANG, M.; et al. Differences in circulating dendritic cells subtypes in peripheral, placental and cord blood in African pregnant women. **J Reprod Immunol. 73:**11-9, 2007.
- ALUVIHARE, V.R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nat Immunol. 5:** 266-71, 2004.
- BARGER, P.; WESTERGAARD, T.; ROSTGAARD, K.; et al. Age at childhood infections and risk of atopy. **Thorax. 57:** 379-82, 2002.
- BONNEY EA. Maternal tolerance is not critically dependent on IL-4. **Immunol. 103:** 382-89, 2001.
- BURKE, W.; FESINMEYER, M.; REED, K.; et al. Family history as a predictor of asthma risk. **Am J Prev Med, 24:** 160-69, 2003.
- CAGNONI, F. ; ODDERA, S. ; GIRON-MICHEL, J. ; et al. CD40 on adult human airway epithelial cells: expression and proinflammatory effects. **J Immunol 172:3** 205-14, 2004.
- CAMELO-NUNES, I.C.; WANDALSEN, G.F.; SOLÉ, D. Asthma in Brazilian school-age children: a public health matter? **J Pediatr. 79:5** 472-3, 2003.
- CAMPBELL, D.A.; LORBER, M.I.; SWEETON, J.C.; et al. Breast feeding and maternal donor renal allografts. Possibly the original donor-specific transfusion. **Transplantation. 37:** 340, 1984.
- CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nature Rev Immunol. 7:** 305-10, 2007.
- CHEN, X.; YANG, J.; HU, S. et al. Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic

cells from allergic asthmatics and their effects on Th1 and Th2 cytokine balance. **Respiration. 73:** 34-40, 2006.

CLARK, D.A.; ARCK, P.C.; CHAOUAT, G. Why did your mother reject you? Immunogenetics determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. **Am J Reprod Immunol. 41:** 5-22, 1999.

CORRÊA, S.; PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.; et al. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to colonization factors I and II of enterotoxigenic Escherichia coli. **FEMS Immunol Med Microbiol. 47:**199-206, 2006.

CUMMINS; A.G.; THOMPSON, F.M. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. **Gut. 51:** 748-54, 2002.

CUMMINS, A.G.; THOMPSON, F.M. Postnatal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning. **Immunol Cell Biol. 75:** 419-29, 1997.

DAHLGREN, U.I.; HANSON, L.A.; TELEMO, E. Maturation of immunocompetence in breast-fed vs. formula-fed infants. **Adv Nutr Res. 10:** 311-25, 2001.

ELSNER, J.; FORSSMANN, U. Another renaissance of eosinophils in allergic diseases. **ACI Inter. 14:** 151-55, 2002.

ERLEBACHER A. Why isn't the fetus rejected? **Curr Opin Immunol. 13:** 590-93, 2001.

FARIA, A.M.C.; WEINER, H.L. Oral tolerance: Mechanism and therapeutic applications. **Adv Immunol. 73:** 2378-81, 1999.

FISCHER, G.B.; CAMARGOS, P.A.M. Paediatric asthma management in developing countries. **Paediatr Res Rev. 3:** 285-91, 2002.

FORSTHUBER, T.; YIP, H.C.; LEHMANN, P.V. Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. **Science. 271:** 1728-30, 1996.

GATELY, M.K.L.; RENZETTI, L.M.; MAGRAM, J.; et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses **Annu Rev Immunol. 16:** 495-521, 1998.

GDALEVICH, M.; MIMOUNI, D.; MIMOUNI, M. Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: A systematic review with meta-analysis of prospective studies. **J Pediatr. 139:** 261-6, 2001.

GEWIRT, A.T.; MADARA, J.L. Periscope, up! Monitoring microbes in the intestine. **Nat Immunol. 3:**288-90, 2001.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; et al. A CD4⁺ T cell subset inhibits antigen-specific T cell responses and prevents colitis. **Nature** **389**: 737-740, 1997.

HAGENDORENS, M.M.; EBO, D.G.; SCHUERWEGH, A.J.; et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children. **Clin Exp Allergy**. **33**: 633-9, 2003.

HALKEN, S.; HOST, A. Prevention. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**. **1**: 229-36, 2001.

HALWANI, R. ; DOROUDCHI, M. ; YASSINE-DIAB, B. ; et al. Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. **Springer Sem Immunol**. 2006.

HEIKKINEN, J.; MOTTONEN, M.; KOMI, J.; et al. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clin Exp Immunol**. **131**: 498-505, 2003.

HELLINGS, P.W.; KASRAN, A.; BULLENS, D.; et al. IL-10 and IL-12-independent down-regulation of allergic sensitization by stimulation of CD40 signaling. **J Immunol**. **177**: 5138-144, 2006.

HOLT, P.G.; MACAUBAS, C. Development of long term tolerance versus sensitization to environmental allergens during the perinatal period. **Curr Opin Immunol**. **9**: 782-87, 1997.

ICHIKAWA, M.; SUGITA, M.; TAKAHASHI, M.; et al. Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. **Immunol**. **108**: 189-95, 2003.

JÄRVINEN, K.M.; SUOMALAIEN, H. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergy infants. **Pediatr Allergy Immunol**. **13**: 243-54, 2002.

JENMALM, M.C.; BJORKSTÉN, B. Development of immunoglobulin G subclass antibodies to ovalbumin, birch and cat during the first eight years of life in atopic and non-atopic children. **Pediatr Allergy Immunol**. **10**: 112-121, 1999.

KOIS, W.E., CAMPBELL, D.A.JR ; LORBER, M.I.; et al. Influence of breast feeding on subsequent reactivity to a related renal allograft. **J Surg Res**. **37**: 89, 1984.

KOPP, M.V. ; ZEHLE, C. ; PICHLER, J. ; et al. Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production. **Clin Exp Allergy**. **31**: 1536-43, 2001.

KROCZEK, R.; HAMELMANN, E. T-cell costimulatory molecules: Optimal targets for the treatment of allergic airway disease with monoclonal antibodies. **J Allergy Clin Immunol.** **116**: 906-9, 2005.

KUCHROO, V.K.; DAS, M.P.; BROWN, J.A.; et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. **Cell.** **80**: 707-18, 1995.

LAIHO, K.; LAMPI, A.M.; HAMALAINEN, M.; et al. Breast milk fatty acids, eicosanoids, and cytokines in mothers with and without allergy disease. **Pediatr Res.** **53**: 642-47, 2003.

LAFAILLE, M.A.; MURIGLAN, S. ; SUNSHINE, M.J. ; et al. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. **J Exp Med.** **194**: 1349-59, 2001.

LAFAILLE, M.A. ; LAFAILLE, J.J. CD4+ Regulatory T cells in autoimmunity and allergy. **Curr Opin Immunol.** **14**: 771-8, 2002.

LAFAILLE, M.A. ; LAFAILLE, J.J. The role of regulatory T cells in allergy. **Springer Semin Immunol.** **25**: 295-310, 2004.

LANGE, J.; KIESH, B.; LINDEN, I.; et al. Reversal of the adult IgE high responder phenotype in mice by maternally transferred allergen-specific monoclonal IgG antibodies during a sensitive period in early ontogeny. **Eur J Immunol.** **32**: 3133-41, 2002.

LANGE, J.; NGOUMOU, G. ; BERKENHEIDE, S. ; et al. High interleukin-13 production by phytohaemagglutinin-and Derp-1-stimulated development of atopic dermatitis at the age of 3 years. **Clin Exp Allergy.** **33**: 1537-43, 2003.

LARA-MARQUEZ, M.L.; MOAN, M.J.; CARTWRIGHT, S. ; et al. Atopic asthma: differential activation phenotypes among memory T helper cells. **Clin Exp Allergy.** **31**: 1232-41, 2001.

LENKE, H.; COUTINHO, A.; LANGE H. Lamarkian inheritance by somatically acquires maternal IgG phenotypes. **Trends Immunol.** **5**:180-86, 2004.

LENSCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/ B7 system of T cell costimulation. **Annu Rev Immunol.** **14**: 233-58, 1996.

LEWIS, G. ; RAPSOMANIKI, E. ; BOURIEZ, T. ; et al. Hyper IgE in New Zealand black mice due to a dominant-negative CD23 mutation. **Immunogenetics.** **56**: 564-71, 2004.

LIMA, C.; SOUZA, V.M.O.; FAQUIN-MAURO, E.; et al. Modulation of the induction of lung and airway allergy in the offspring of IFN- γ treated mother mice. **J Immunol.** **175**: 3554-59, 2005.

LORENTE, F.; LAFFOND, E.; MORENO, E.; et al. Infección vírica y Asma: mecanismos inmunológicos. **Aller Immunophatol. 29:** 126-51, 2001.

LYNCH, N.R.; THOMAS, W.R.; GARCIA, N.M.; et al. Biological activity of recombinant Derp2, Derp-5 and Derp-7 allergens of the house-dust mite *Dermatophagoides pteronissinus*. **Int Arch Allergy Immunol. 114:** 59-67, 1997.

MAGNAN, A.O.; MÉLY, L.G.; CAMILLA, C.A.; et al. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. **Am J Respir Crit Care Med. 161:** 1790-96, 2000.

MALLOL, J.; SOLÉ, D.; ASHER, I. Prevalence of asthma symptoms in Latin America: The International Study of asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Pediatr Pulmonol. 30:** 439-44, 2000.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry. 2:** 235-54, 1965.

MARTINEZ, F.D. The coming-of-age of the hygiene hypothesis. **Respir Res. 2:** 129-32, 2001

MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S. ; et al. The global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report. **Aller. 59:** 469-78, 2004.

MATRICARDI; ROSMINI, F.; RIONDINO, S.; et al. Exposure to food borne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma. **BMJ. 320:** 412-17, 2000.

McARTHUR, J.G.; RAULET, D.H. CD28-mediated costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. **J Exp Med. 164:** 5-13, 1993.

MEHLHOP, P.D.; RIJN, M.V.; BREWER, J.P.; et al. CD40L, but not CD40, is required for allergen-induced bronchial hyperresponsiveness in mice. **Am J Resp Cell Mol Biol. 23:** 646-651, 2000.

MIESCHER, S.M.; VOGEL, M. Molecular aspects of allergy. **Mol Aspect Med. 23:** 413-62, 2002.

MOORE, K.W.; ROGERS, J.; HUNKAPILLER, T.; et al. Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. **PNAS USA. 78:** 1800-4, 1981.

MOREAU, P.; PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; et al. Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. **Am J Reprod Immunol. 40:** 136-44, 1998.

MORI, J.C.; GALVÃO, C.E.S.; MELLO, J.F.; et al. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**. **56**: 180-84, 2001.

MUNN, D.H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J.T.; et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**. **281**: 1191-93, 1998.

MURRAY, J. How the MHC selects Th1/Th2 immunity. **Immunol Today**. **19**: 157-63, 1998.

NAKAMURA, K.; KITANI, A. ; FUSS, I. ; et al. TGF- β plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **J Immunol**. **172**: 834-42, 2004.

NEUBER, K. ; MAHNSS, B. ; HUBNER, C. ; et al. Autoantibodies against CD28 are associated with atopic diseases. **Clin Exp Immunol**. **146**: 162-69, 2006.

NEUTRA, M.R.; PRINGAULT, E.; KRAEHENBUHL, J.P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. **Annu Rev Immunol**. **14**: 275-300, 1996.

NEUTRA, M.R. Current concepts in mucosal immunity v. role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. **Am J Physiol**. **274**: G785-91, 1998.

NILSSON, C.; LARSSON, A.K.; HOGLIND, A. ; et al. Low numbers of interleukin-12-producing cord blood mononuclear cells and immunoglobulin E sensitization in early childhood. **Clin Exp Allergy**. **34**: 373-80, 2004.

O'DOHERTY, U.; PENG, M.; GEZELTER, S.; et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. **Immunol**. **82**: 487-93, 1994.

OIDA, T.; ZHANG, X.; GOTO, M.; et al. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RB^{high} induced colitis by a TGF- β -dependent mechanism. **J Immunol**. **170**: 2516-22, 2003.

OLIVEIRA, S.H.; LUKACS, N.W. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. **Braz J Med Biol Res**. **36**: 1455-63, 2003.

PITT, J. The milk mononuclear phagocyte. **Pediatr**. **64**: 745-49, 1979.

PRESCOTT, S.L.; SLY, P.D.; HOLT, P.G. Raised serum IgE associated with reduced responsiveness to DPT vaccination during infancy. **Lancet**. **351**: 1 489, 1998.

PRESCOTT, S.L.; HOLT, P.G.; JENMALM, M.; et al. Effects of maternal allergen-specific IgG in cord blood on early postnatal development of allergen-specific T-cell immunity. **Allergy**. **55**: 470-75, 2000.

PROKESOVÁ, L.; LODINOVÁ-ZADNIKOVÁ, R.; ZIZKA, J.; et al. Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. **Pediatr Aller Immunol**. **17**: 175-83, 2006.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunol Today**. **18**: 478-82, 1997.

RANDOLF, G.J.; INABA, K.; ROBBIANI, D.F.; et al. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity**. **11**: 753-61, 1999.

RAUTAWA, S.; KALLIOMÄKI, M.; ISOLAURI, E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. **J Allergy Clin Immunol**. **109**: 119-21, 2002.

RIBEIRO, J.D. Níveis séricos das subclasses de IgG em crianças asmáticas graves com e sem pneumonias de repetição, **Tese de doutorado. São Paulo**: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, 1994.

RIDGE, J.P.; FUCHS, E.J.; MATZINGER, P. Neonatal tolerance revisited: turning of newborn T cells with dendritic cells. **Science**. **271**: 1723-6, 1996.

ROBINSON, S.P.; PATTERSON, S.; ENGLISH, N.; et al. Human Peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. **Eur J Immunol**. **29**: 2769-78, 1999.

RULIFSON, I.C.; SPERLING, A.I.; FIELDS, P.E.; et al. CD28 co stimulation promotes the production of Th2 cytokines. **J Immunol**. **158**: 658-65, 1997.

SANDERSON, I.R.; WALKER, A. Uptake and transport of macromolecules by intestine: possible role in clinical disorders. **Gastroenterol**. **104**: 622-39, 1993.

SAITO, S.; SASAKI, Y.; SAKAI, M. CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in human pregnancy. **J Reprod Immunol**. **65**: 111-20, 2005.

SAKAGUCHI, S.; ASANO, M.; ITOH, M.; et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chain (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol**. **155**: 1151-64, 1995.

SASAKI, Y.; MIYAZAKI, S.; SAKAI, M.; et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are increased in the human early pregnancy decidua and have immunosuppressive activity. **Am J Reprod Immunol.** **49**: 356, 2003.

SAYEGH, M.H.; AKALIN, E.; HANCOCK, W.W. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. **J Exp Med.** **181**: 1869-74, 1995.

SHAUB, B.; LAUENER, R.; VON MUTIUS, E. The many faces of the hygiene hypothesis. **J Allergy Clin Immunol.** **117**: 969-77, 2006.

SHEVACH, E.M. Regulatory T cells in autoimmunity. **Ann Rev Immunol.** **18**: 423-49, 2000.

SHI, H. ; LI, S. ; XIE, Z. ; et al. Regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. **Clin Immunol.** **113**: 172-8, 2004.

SHIRAKAWA, T.; ENOMOTO, T.; SHIMAZU, S.; et al. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorders. **Science.** **275**: 77-9, 1997.

SHORTMAN, K.; HEATH, W.R. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. **Nat Immunol.** **2**: 988-9, 2001.

SHREEDHAR, V.K.; KELSALL, B.L.; NEUTRA, M.R. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T and B cell areas of Peyer's Patches. **Infect Immun.** **71**: 504-09, 2003.

SOLE, D.; MELO, K.C.; CAMELO-NUNES, I.C.; et al. Changes in the prevalence of Asthma and allergic diseases among Brazilian schoolchildren (13-14 years old): Comparison between ISAAC phases one and three. **J Trop Pediatr.** **53**: 13-21, 2006.

STEINMAN, R.M.; NUSSENZWEIG, M.C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc Natl Acad Sci USA.** **8**: 351-8, 2002.

TAKAHASHI, T.; KUNIYASU, Y.; TODA, M., et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. **Int. Immunol.** **10**: 1969-74, 1998.

TANG, C.; WARD, C.; REID, D.; et al. Normally suppressing CD40 coregulatory signals delivered by airway macrophages to TH2 lymphocytes are defective in patients with atopic asthma. **J Allergy Clin Immunol.** **107**: 863-70, 2001.

THELLIN, O.; HEINEN, E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. **Toxicol.** **185**: 179-84, 2003.

THELLIN, O.; COUMANS, B.; ZORZI, W.; et al. Tolerance to the feto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. **Curr Opin Immunol.** **12:** 731-37, 2000.

TIEMESSEN, M.M.; VAN HOFFEN, E.; KNULST, A.C.; et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are not functionally impaired in adult patients with IgE-mediated cow's milk allergy. **J Aller Cilm Immunol.** **110:** 934-39, 2002.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci.** **76:** 4350-4, 1979.

TROMBONE, A.P.F.; TOBIAS, K.R.C.; FERRIANI, V.P.L.; et al. Use of chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Derp-1 and Derp-2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. **Clin Exp Allergy.** **32:** 1323-28, 2002.

TSAKALIDOU-KANAKOUDI, F.; AGAKIDOU-DROSSOU, V.; NOUTSIA, C.; et al. Intracellular and plasma cytokine profile in neonates born to non-atopic parents: the impact of breast feeding. **Eur J Pediatr.** **163:** 395-401, 2004.

UMETSU, D.T.; McINTIRE, J.J.; AKBARI, O.; MACAUBAS, C.; DeKRUIFF, R.H. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nat Immunol.** **3:** 715-20, 2002.

UPHAN, J.W.; STUMBLES, P.A. Why are dendritic cells important in allergic diseases of the respiratory tract? **Pharmacol Therapeu.** **100:** 75-87, 2003.

VAN RIJLT, L.S.; VOS, N.; WILLART, M.; et al. Essential role of dendritic cell CD80/ CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. **J Allergy Clin Immunol.** **114:** 166-73, 2004.

VAZ, N.M.; MAIA, L.C.; HANSON, D.G.; et al. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. **J Allergy Clin Immunol.** **60:** 110-5, 1977.

VERCELLI, D. Genetic polymorphism in allergy and asthma. **Curr Opin Immunol.** **15:** 609-13, 2003.

VON EHRNSTEIN; VON MUTIUS, E. ; ILLI, S., et al. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. **Clin Exp Allergy.** **30:** 187-93, 2000.

ZDOLSEK, H.A.; JENMALM, M.C. Expression of the T-cell markers CD2 and CD28 in healthy and atopic children during the first 18 months of life. **Pediatr Allergy Immunol.** **14:** 169-77, 2003.

ZHANG, X.; REDDY, J.; OCHIM H.; et al. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF- β dependent and associated with increases in CD4⁺LAP⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells. **Int Immunol.** **18**: 495-503, 2006.

WATTS, T.H.; DEBENEDETTE, M.A. T cell costimulatory molecules other than CD28. **Curr Opin Immunol.** **11**: 286-93, 1999.

WEI, H. ; ZHANG, J. ; XIAO, W. ; et al. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. **J Allergy Clin Immunol.** **115**: 841-7, 2005.

WEINER, H.L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β secreting Th3 regulatory cells. **Immunol Rev.** **182**: 207-14, 2001.

WITTIG, B.M.; ZEITZ, M. The gut as an organ of immunology. **Int J Colorrectal Dis.** **18**: 181-87, 2003.

WONG, C.K.; HO, C.Y.; KO, F.W.S.; et al. Proinflammatory cytokines (IL-17,IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clin Exp Immunol.** **125**: 177-83, 2001.

YANG, Y.; CHEN, M.; TSAI, Y.; et al. Costimulatory molecules expression and cytokine profiles of cord blood mononuclear cells in newborns with low and high risk of developing atopic diseases. **J Microbiol Immunol Infect.** **33**: 159-64, 2000.

YAZDANBAKHSI, M.; KREMSNER, P.G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and hygiene hypothesis. **Science.** **296**: 490-94, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)