

**Jefferson Russo Victor**

**MECANISMOS REGULATÓRIOS MEDIADOS PELOS  
ANTICORPOS MATERNOS NA MODULAÇÃO DA  
RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I AO  
ALÉRGENO OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS  
NEONATOS**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências (Imunologia).**

**São Paulo  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**JEFFERSON RUSSO VICTOR**

**MECANISMOS REGULATÓRIOS MEDIADOS PELOS  
ANTICORPOS MATERNOS NA MODULAÇÃO DA  
RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO I AO  
ALÉRGENO OVALBUMINA EM CAMUNDONGOS  
NEONATOS**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas  
da Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Imunologia  
Orientador: Profa. Dra. Maria Notomi Sato**

**São Paulo  
2008**

Dedico este trabalho a aqueles que me acompanharam de forma superior em todos os momentos da vida, aqueles que sempre estiveram comigo e indiscutivelmente acreditaram em mim, aqueles que me deram força e premiaram com orgulho toda as minhas conquistas, aqueles que se preocuparam constantemente com meu bem estar, aqueles que me provaram os valores do respeito e do amor, aqueles que estavam ao meu lado no mínimo sinal de tristeza, aqueles que me deram o prazer da companhia em todos os momentos de felicidade, aqueles que me deram responsabilidade, aqueles que me conduziram pelo caminho da educação, aqueles que me trouxeram a vida! AOS MEUS PAIS Amaury Victor e Ezilda Ap. Russo Victor.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pelo apoio e oportunidade concedidos, para que fosse possível a realização deste projeto.

Ao Profa. Dra. Maria Notomi Sato por ter acreditado naquele rapaz que aos 17 anos bateu a sua porta com o sonho de ser imunologista e hoje, sob sua orientação, torna-se doutor em imunologia.

Aos amigos Michelangelo Juvenale e Milton Maciel Júnior por terem me apoiado e incentivado durante os primeiros passos na carreira.

Ao excelentíssimo Professor Wilson de Almeida Siqueira por ter acreditado em mim quando estava no auge da desilusão com a carreira acadêmica e me atribuído responsabilidades que certamente poucos atribuiriam naquele momento. Obrigado professor por ter realizado meu maior sonho!

Ao amigo Bruno Pacola Muniz pelo valiosíssimo apoio na realização do projeto e pelo excelente companheirismo em todos os momentos.

A grande amiga e colaboradora Noêmia Mie Orii pelo apoio em todos os sentidos.

Aos amigos Ana Elisa Fusaro, Cyro Alves de Brito, Célia Regina de Oliveira e Eliana Akemi Futata por todo apoio e alegria nestes anos de convivência no laboratório.

Aos amigos alunos ou ex-alunos: Juliana Cristina, Rômulo Esteves, Natalli Zaneti, Isabela Fernandes, Paulo César, Lilian de Farias, Orlando Guerra, Grazielle de Freitas e outros que de alguma forma me deram o prazer de colaborar com sua introdução ao meio científico.

A Rachel Guedes, Francinelson Duarte, Adriana Goldoni, Paula Rigato, Camila Cácere, Soraya Ogusuku, Mayce Azor e todos os colegas do LIM-56.

A FAPESP, pelo auxílio na realização do trabalho.

“A natureza nos ensina a fazer filhos mas não a educá-los, educar é uma virtude, educação é a solução.”

JEFFERSON RUSSO VICTOR

## RESUMO

VICTOR, J.R. **Mecanismos regulatórios mediados pelos anticorpos maternos na modulação da resposta de hipersensibilidade do tipo I ao alérgeno ovalbumina em camundongos neonatos.** Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A exposição precoce a aero-alérgenos ou alérgenos alimentares associada à predisposição dos neonatos a desenvolverem respostas do tipo Th2 são fatores que podem contribuir ao desenvolvimento de alergia durante a infância. Previamente foi observado que a imunização materna com o ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* foi capaz de inibir a resposta de hipersensibilidade do tipo I da prole de camundongos. Com o objetivo de avaliar os mecanismos regulatórios desencadeados pela imunização materna na resposta imunológica da prole, o efeito da imunização pré-concepcional com Ovalbumina (OVA) foi analisado nas proles de camundongos BALB/c. A imunização materna com OVA promoveu alterações precoces como o aumento da expressão dos receptores para IgG FcγRIIb nos linfócitos B esplênicos dos neonatos aos 3 dias de idade (d.i.), o que se manteve até os 20 d.i. Nestas proles houve uma significativa redução da expressão de do receptor de baixa afinidade para IgE (FcεRII) CD23, em linfócitos B. Em paralelo, nas proles de mães imunes detectou-se a diminuição do número percentual de linfócitos B secretores de IL-4 e IL-12, bem como de linfócitos T CD4 produtores de IL-4 e IFN-γ. A imunização pré-concepcional com OVA não induziu a produção de anticorpos IgM anti-OVA ou resposta proliferativa antígeno específica nas proles não imunizadas. Já com a imunização das proles no período neonatal pode-se evidenciar que a imunização materna inibe a produção de anticorpos IgE anti-OVA. Além disso, foi observado na população de linfócitos B da prole o aumento da expressão dos receptores FcγRIIb e CD44 associado à diminuição percentual de células B secretoras de IL-12. A avaliação da população de células TCD4 revelou uma diminuição das células produtoras de IL-4 e da expressão do CD28 em paralelo à inibição da resposta proliferativa a OVA. O efeito modulatório da imunização materna também foi observado pela inibição da resposta proliferativa dos linfócitos B induzida por oligodeoxinucleotídeos CpG do tipo B. A transferência passiva de IgG de mães imunes no período neonatal mostrou inibição da produção de anticorpos IgE, sem alteração nos outros parâmetros avaliados, sugerindo que no período pós-natal, os anticorpos contribuem, parcialmente, na regulação da resposta imunológica da prole. Posteriormente, foi avaliado o efeito da transferência passiva de IgG de mães imunes durante gestação, o que mostrou ser capaz de reduzir a expressão das moléculas CD40 e CD23 nos linfócitos B da prole no período neonatal. A imunização destas proles manteve a redução da expressão do CD40 em linfócitos B e aumentou a produção de IL-10 em linfócitos TCD4. As evidências mostram que a imunização pré-concepcional com OVA induz mecanismos que regulam negativamente a resposta IgE da prole imunizada no período neonatal, incluindo alterações fenotípicas e funcionais em linfócitos B e TCD4. Alterações que foram parcialmente observadas em decorrência da transferência passiva de anticorpos IgG durante a gestação ou após o nascimento, sugerindo o envolvimento de outros fatores na regulação da resposta alérgica mediada pela modulação do sistema imune materno.

Palavras-chave: Alergia; IgE; Imunomodulação; Interação materno-fetal; Imunologia.

## ABSTRACT

VICTOR, J.R. **Regulatory mechanisms involved on the offspring type I hypersensitivity response inhibition mediated by maternal immunization with OVA.** PhD Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The early exposure to air allergen or food allergen associated to predisposition of newborns in developing Th2 responses are features that might contribute to the development of allergy during infancy. Previously, it has been demonstrated that maternal immunization with *Dermatophagoides pteronyssinus* mite was capable of inhibiting the type I hypersensitivity response in mice offspring. In order to evaluate the regulatory mechanisms triggered by maternal immunization in the immune response of the offspring, the effect of preconceptional immunization with Ovalbumin (OVA) was evaluated in the offspring of BALB/c mice. The maternal immunization with OVA led to early alteration such as the increase expression of IgG receptor, FcγRIIb, in splenic B lymphocytes from 3 days old (d.o.) newborns, which continued until they were 20 d.o. In these offspring there was also significant reduction on the expression of the IgE low affinity receptor (FcεRII), CD23, in B lymphocytes. In parallel, offspring from immune mother showed diminished percentage of B lymphocytes that secretes IL-4 and IL-12, as well as CD4 T lymphocytes secretors of IL-4 and IFN-γ. Preconceptional immunization with OVA did not induce the production of anti-OVA IgM or antigen specific proliferative response in non-immunized offspring. However, the immunization of offspring during neonatal period showed that maternal immunization inhibits the production of anti-OVA IgE antibodies. Besides, it was observed that the B lymphocytes from the offspring had their expression of FcγRIIb and CD44 receptors increased associated to the diminished percentage of IL-12 secretor B cells. The evaluation of CD4 T cell population revealed diminished IL-4 producing cells and CD28 expression, in parallel to the inhibition of OVA proliferative response. The modulatory effect of maternal immunization was also observed by the inhibition of B lymphocytes proliferative response induced by B type CpG oligodeoxynucleotides. The passive IgG transfer from immune mother during neonatal period showed inhibition in the IgE synthesis without changes in other evaluated parameters, suggesting that in postnatal period antibodies partially contribute in the regulation of the offspring immune response. Subsequent, it was evaluated the effect of IgG passive transfer from immune mother during pregnancy, which showed capacity to reduce the expression of CD40 and CD23 molecules in B lymphocytes from offspring during neonatal period. The immunization of such offspring maintained the reduced expression of CD40 in B lymphocytes and increased the production IL-10 in CD4 T lymphocytes. The evidences show that OVA preconceptional immunization induces mechanisms that downregulates the IgE response of offspring immunized during neonatal period, including phenotypic and functional alteration in B and CD4 T cells. These alterations were partially observed as a result of the passive transfer of IgG antibodies during pregnancy or after birth, suggesting enrollment of other factors in the allergic immune response mediated by the modulation of the maternal immune system.

Key words: Allergy; IgE; Immune modulation; Maternal-fetal interaction; Immunology.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Animais.....	19
3.2 Antígeno.....	19
3.3 Protocolo de imunização materna com OVA.....	19
3.4 Protocolo de imunização neonatal com OVA.....	19
3.5 Purificação de anticorpos IgG.....	20
3.6 Protocolo de transferência PÓS-NATAL de anticorpos IgG.....	20
3.7 Protocolo de transferência PRÉ-NATAL de anticorpos IgG.....	21
3.8 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP).....	22
3.9 ELISA para detecção de anticorpos anti-OVA.....	22
3.10 Obtenção de células esplênicas.....	23
3.11 Citometria para avaliação de moléculas extracelulares.....	23
3.12 Citometria para avaliação intracelular de citocinas.....	24
3.13 Citometria para avaliação de citocinas no sobrenadante.....	24
3.14 Cultura para avaliação da proliferação celular.....	25
3.15 Cultura de células esplênicas para obtenção de sobrenadante.....	25
3.16 Purificação de linfócitos B.....	25
3.17 Cultura de linfócitos B purificados.....	26
3.18 Análise estatística.....	26
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Efeito da imunização materna com OVA na expressão de moléculas em linfócitos da prole no período neonatal.....	27
4.2 Efeito da imunização materna com OVA na expressão de moléculas e produção de citocinas em linfócitos B e TCD4+ da prole em período pré-desmame.....	32
4.3 Efeito da imunização materna com OVA na resposta humoral e celular da prole não imunizada.....	37
4.4 Efeito da imunização materna com OVA na resposta humoral e celular da	

prole imunizada no período neonatal.....	39
<b>4.5</b> Efeito da imunização materna com OVA na expressão de moléculas e produção de citocinas em linfócitos B e TCD4+ da prole imunizada no período neonatal.....	43
<b>4.6</b> Efeito da transferência pós-natal de IgG na resposta imune da prole imunizada no período neonatal.....	49
<b>4.7</b> Efeito da transferência de IgG durante a gestação na expressão de marcadores em linfócitos B da prole no período neonatal.....	54
<b>4.8</b> Efeito da transferência de IgG durante a gestação na resposta imune da prole imunizada no período neonatal.....	57
<b>5</b> DISCUSSÃO.....	62
<b>6</b> CONCLUSÃO.....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Os períodos gestacional e principalmente pós-natal são fases que podem influenciar no desenvolvimento da resposta alérgica das crianças (PEDEN, 2000; VON MUTIUS, 2002). O grau e a intensidade da exposição aos alérgenos nestes períodos além da susceptibilidade genética para alergia são importantes fatores que influenciam no desencadeamento da alergia na infância.

A alergia é classificada como uma reação de hipersensibilidade imediata do tipo I, mediada por anticorpos da classe IgE, caracterizada como um desequilíbrio da resposta imune humoral capaz de promover danos ao organismo e (COOMBS e GELL, 1975). As reações alérgicas anafiláticas em indivíduos geneticamente predispostos, ou atópicos, podem resultar em diferentes quadros clínicos de acordo com o local do contato com o imunógeno indutor da alergia, ou alérgeno. Nas vias respiratórias clinicamente manifesta-se como a asma brônquica e rinite alérgica, e na pele como a dermatite atópica.

Os alérgenos são muito diversificados e podem ser ácaros, fungos, polens e outras proteínas encontradas na dieta. O processo alérgico inicia-se com a apresentação do antígeno por células especializadas (APCs) que podem influenciar na formação ou no direcionamento da resposta imune. Após a apresentação do antígeno para os linfócitos T específicos ocorre a proliferação e diferenciação, bem como, a cooperação com linfócitos B secretores de anticorpos (plasmócitos) IgE específicos. Estes anticorpos fixam-se na membrana de células como os mastócitos, basófilos e eosinófilos através dos receptores de alta afinidade para a porção Fc da IgE (FcεRI). Em um contato subsequente com o alérgeno, ao menos duas moléculas de anticorpos específicos que ocupam estes receptores em uma mesma célula ligam-se ao alérgeno, iniciando a desgranulação celular. Os grânulos citoplasmáticos liberados possuem grande quantidade de fatores mediadores dos sintomas alérgicos, como a histamina, prostaglandinas, leucotrienos e outros.

A síntese de anticorpos IgE é dependente da ação de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> (Th), e especialmente de seus produtos secretados, as citocinas. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados têm função de produzir citocinas que são classificadas em padrões Th1 e Th2 (MOSSMAN e COFFMAN, 1989). Esta diferenciação depende da influência de citocinas presentes no microambiente da resposta inflamatória inicial, cuja produção é induzida pelo tipo de antígeno e pelas populações de células ativadas. Entre as citocinas

envolvidas neste processo, a IL-12 secretada por macrófagos e linfócitos B pode favorecer o padrão Th1 (COFFMAN et al., 1991). O padrão Th1 é caracterizado pela produção, principalmente, das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , e favorece a imunidade mediada por células como macrófagos e linfócitos T CD8+, além de favorecer a troca de isótipos de anticorpos para a subclasse IgG1 em humanos e IgG2a em camundongos.

A citocina IL-4, secretada principalmente por linfócitos T CD4+ NK1.1+ e mastócitos contribuem para a formação do padrão Th2 (COFFMAN et al., 1991). O padrão Th2 é caracterizado pela secreção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e está relacionado a altas e persistentes respostas humorais favorecendo a produção de anticorpos IgE em humanos e de anticorpos IgE e IgG1 em camundongos. As citocinas Th2 são responsáveis também pela diferenciação e ativação de células como eosinófilos, mastócitos e basófilos, que participam do desencadeamento e amplificação da inflamação alérgica (ROMAGNANI, 2002; DEL PRETE, 1992).

As citocinas secretadas pelos linfócitos Th, são potencialmente regulatórias entre si, por exemplo o IFN- $\gamma$ , é capaz de inibir a secreção de citocinas Th2, e por sua vez, a IL-10 é capaz de inibir a produção de IFN- $\gamma$ , levando a inibição do padrão Th1 (COFFMAN e MOSSMAN, 1991). Em algumas condições, a IL-10 e o TGF- $\beta$  demonstram a capacidade de inibir a produção de citocinas de ambos os padrões. Algumas populações especializadas de linfócitos T reguladores podem influir no balanço da produção de citocinas, entre elas os linfócitos Th3, presentes nas mucosas gastrointestinais e que tem como característica a alta produção de TGF- $\beta$  (WEINER, 2001), os linfócitos Tr1, caracterizados pela alta produção de IL-10 (WU et al., 2007) e ainda os linfócitos TCD4+CD25+Foxp3+ naturais ou induzidas pelo antígeno (WILCZYNSKI et al., 2008).

Em geral, a produção de citocinas pelas células Th não se encontra polarizada em Th1 ou Th2, contudo em algumas patologias ou fases da mesma pode ocorrer predomínio de um determinado padrão. Como exemplo, nas doenças alérgicas, ocorre uma preponderância do padrão Th2, em decorrência da elevada produção de citocinas IL-4 e IL-13 indutoras da produção de anticorpos IgE.

Uma condição onde há predomínio de citocinas do padrão Th2 é na gestação (WEGMANN, 1993), período no qual ocorrem efetivas interações entre os sistemas imune, reprodutivo e hormonal materno. A secreção de interleucinas como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 é responsável pela maturação do feto no útero, em contraste, a secreção de

altos níveis de citocinas Th1 como a IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  está relacionadas à ativação de células NK, que são prejudiciais ao tecido placentário e promotoras da reabsorção fetal. Aparentemente, para o sucesso da gestação é necessário um equilíbrio entre os padrões Th1 e Th2 (DEALTRY, 2000).

No período neonatal, além da relativa imaturidade do sistema imune há uma predisposição da resposta para o padrão Th2. A imaturidade é conseqüente da deficiente secreção de IL-12, IL-2 e IFN- $\gamma$  (VEKELMANS et al., 2001), da reduzida produção de anticorpos (HOLT e JONES, 2000), da baixa expressão de receptores e moléculas acessórias (BRUGNONI et al., 1994), da baixa intensidade de expressão de moléculas co-estimulatórias e de um lento desenvolvimento da zona marginal do baço (MARSHALL-CLARKE et al., 2000). Fatores estes que influenciam na interação entre as APC e células T naives.

Os camundongos neonatos são capazes de desenvolver respostas predominantemente Th2 nas imunizações com vírus vivos ou atenuados, em contraste aos adultos que desenvolvem respostas principalmente do padrão Th1 a este tipo de imunização (BOT et al., 1997; BOT e cols 1999). Adkins e colaboradores observaram que no baço de camundongos há um predomínio de resposta Th2 enquanto que nos gânglios observou-se um padrão misto (Th1/Th2) de secreção de citocinas (ADKINS et al., 2000).

O desvio da imunidade neonatal para o padrão Th2 pode ser devido a apoptose de linfócitos Th1. Li e colaboradores (2004) mostraram em um modelo murino de imunização neonatal com OVA, que a expressão de um receptor alternativo composto pela cadeia  $\alpha 1$  do receptor de IL-13 (IL-13R $\alpha 1$ ) e a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) em linfócitos Th1 é responsável pela indução de apoptose destes clones após sua ligação com a IL-4, desviando a imunidade do neonato para o padrão Th2 (LI et al., 2004).

A imunidade passiva da mãe para o filho, seja pela via placentária ou pela amamentação prolongada, tem função protetora nas infecções respiratórias e gastrointestinais, podendo diminuir a ocorrência de doenças autoimunes e alérgicas em famílias geneticamente predispostas (BEER e BILLINGHAM, 1975; BUSINCO et al., 1983; HOWIE et al., 1990)

A transferência de anticorpos maternos para a prole é mediada predominantemente pelo receptor FcRn (SIMISTER e REES, 1985). Em roedores este

mecanismo tem especial importância durante a amamentação e ocorre pela expressão dos receptores FcRn nas células epiteliais do intestino dos neonatos (JONE e WALDMANN, 1972) diferente do observado em humanos onde estes receptores participam do transporte placentário da IgG materna (LEACHE et al., 1996).

Na alergia, anticorpos IgG maternos contra epitélios de gato e pólen (JENMALM e BJORKSTEN, 2000) ou a antígenos alimentares como a OVA (VANCE et al., 2004), estão relacionados a menor predisposição ao desenvolvimento da alergia em crianças durante os primeiros anos de vida. Em modelos experimentais, a IgG materna em resposta a imunização com um alérgeno alimentar como a OVA, foi capaz de suprimir a resposta IgE dos filhotes (JARRET e HALL, 1983). Além disso, a exposição pré-concepcional e gestacional a antígenos não alergênicos como o lipopolissacarídeo (LPS) também pode controlar a inflamação alérgica pulmonar da prole (BLUMER et al., 2005).

Os anticorpos maternos podem neutralizar os antígenos ofertados à prole diminuindo o seu processamento, apresentação e conseqüentemente a resposta imune neonatal (SIEGRIST, 2001). Neste caso os anticorpos IgG maternos circulantes na prole formam imunocomplexos com os alérgenos inalados ou ingeridos os quais são eliminados da circulação antes de seu reconhecimento pelas células do sistema imune da prole. Conseqüentemente, há redução da sensibilização da prole bem como a produção de anticorpos, especialmente da classe IgE.

Entretanto, a neutralização de antígenos pela presença de anticorpos maternos não é capaz de impedir a sensibilização da prole na imunização de camundongos neonatos contra o sarampo e o toxóide tetânico (SIEGRIST et al., 1998). Neste modelo, a presença de altos níveis de anticorpos maternos interfere na resposta humoral mas não impede a indução de imunidade mediada por linfócitos T na prole, os quais foram capazes de produzir citocinas como o IFN- $\gamma$  e a IL-5 e atividade citotóxica em níveis normais

Os anticorpos maternos podem interagir diretamente com o sistema imune da prole mesmo na ausência do antígeno. Neste sentido, foi demonstrada a inibição da produção de anticorpos IgE anti-fosfolipase A2 (veneno de abelha) na prole de camundongos após transferência de anticorpo IgG anti-fosfolipase A2, mostrando a influência dos anticorpos maternos mesmo na ausência do Ag (SEEGER et al., 1998). Este fenômeno promovido pelos anticorpos maternos pode ser mediado por interações

entre os idiótipos dos anticorpos o que podem exercer função estimulatória e/ou regulatória na proliferação dos linfócitos B e T (JERNE, 1984).

A rede idiotípica foi evidenciada em coelhos nos quais os anticorpos maternos influenciam a formação do repertório celular da prole através de interações anti-idiotípicas com os receptores de linfócitos B (HIERNAUX, 1981; BORGHESI, 1996).

Interações idiotípicas entre os anticorpos maternos e os receptores BCR de linfócitos B ou T imaturos no período fetal (VAKIL et al., 1986; BOGEN e cols 1993) ou com linfócitos B e T maduros da prole foram serem capazes de selecionar o repertório de linfócitos B e T (HIERNAUX et al., 1981; GHOSH e CHAKRABARTI, 1993).

Outro mecanismo de interação dos anticorpos maternos pode ser mediado por imunocomplexos que interagem diretamente com os receptores inibitórios expressos nos linfócitos B (Fc $\gamma$ RIIb – CD32b).

Os receptores Fc $\gamma$ RIIb possuem duas isoformas funcionalmente idênticas, o Fc $\gamma$ RIIb1 e o Fc $\gamma$ RIIb2, sendo a primeira diferenciada por um exon adicional na região intracelular, o que não permite sua internalização durante a ligação cruzada em linfócitos B. A Fc $\gamma$ RIIb2 pode ser internalizada e é expressa em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Estes receptores são compostos por uma cadeia única do tipo  $\alpha$  cujo domínio citoplasmático está ligado a *motivos citoplasmáticos inibitórios* (ITIM) que quando ativados por fosforilação são capazes de se ligar à fosfatase inibidora SHIP, que através de seu domínio SH2 regula a sinalização intracelular por mecanismos ainda não esclarecido. Aparentemente há a inibição da molécula de sinalização PLC- $\gamma$  pela inibição do recrutamento da quinase Btk na ativação dos linfócitos B (JANEWAY et al., 2007).

A fosforilação do ITIM dos receptores Fc $\gamma$ RIIb quando próximos a motivos citoplasmáticos ativadores (ITAM) dos receptores de linfócitos B (BCR) é capaz de inibir a ativação *in vitro* dos linfócitos B (AMIGORENA et al., 1992; MUTA et al., 1994).

É pouco provável que este mecanismo ocorra *in vivo* na inibição de respostas a vacinas considerando que a ligação Fc $\gamma$ RIIb/FcIgG é independente da especificidade do anticorpo e o aumento da dose de vacina induziu resposta imune no neonato (HEYMAN et al., 2001). Camundongos KO de Fc $\gamma$ RIIb também sofrem inibição da resposta imune a vacinas na presença de anticorpos maternos (KARLSSON et al.,

1999). Esta ligação deve ser considerada no controle da alergia já que recentemente foi demonstrado que a inibição via Fc $\gamma$ RIIb influencia na formação de sinapse imunológica do linfócito B, o que pode alterar a troca de isótipo e conseqüentemente pode influir na produção de IgE (SOHN et al., 2008).

Além disso, a ausência do receptor Fc $\gamma$ RIIb em camundongos KO está relacionada a uma exacerbação da produção de anticorpos IgG (WERNERSSON et al., 1999), sugerindo que o Fc $\gamma$ RIIb não está associado com a prevenção da sensibilização e sim ao controle da exacerbação de respostas humorais, característica de reações de hipersensibilidade imediata.

Outros receptores expressos em linfócitos B podem estar envolvidos na regulação da resposta imune da prole como o CD22 e o CD72, cujos ligantes são o 2,6Sia e o CD100 respectivamente (POWELL, 1995; KELM, 1994). Estes receptores inibem a sinalização via BCR e regulam funções do linfócito B, como a troca de isótipo (NITSCHKE e TSUBATA, 2004) promovendo a inibição da ativação celular por um mecanismo similar ao Fc $\gamma$ RIIb (KATZ, 2002). Até o momento, não há relatos na literatura que elucidem a participação do Fc $\gamma$ RIIb, CD22 e CD72 em modelos de regulação da alergia mediada pela imunização materna.

Outro fator crucial na regulação da resposta alérgica da prole são as citocinas produzidas em decorrência da ativação de linfócitos TCD4 maternos em resposta à imunização. Em um modelo murino de imunização materna com o alérgeno OVA, foi demonstrado que o desvio da resposta imune materna para o padrão Th1 é capaz de diminuir a produção de anticorpos IgE e a resposta inflamatória pulmonar da prole de camundongos (MATSON et al., 2007).

A transferência de IFN- $\gamma$ , uma citocina Th1, durante a gestação foi capaz de controlar a hiperreatividade pulmonar da prole independente da amamentação (LIMA C et al., 2005). A modulação do sistema imune de camundongos fêmeas com antígeno indutor de respostas Th1, o LPS, foi capaz de inibir a produção de citocinas Th2 na prole (BLUMER, 2005).

Em modelos de imunização materna pré-concepcional com alérgenos já foi demonstrado que a regulação da resposta imune da prole resulta no controle da exacerbação da produção de citocinas do padrão Th2 como a IL-4 (VICTOR et al., 2003), como também pode induzir células com potencial regulatório (VERHASSELT et

al., 2008). Estas evidências sugerem que os mecanismos de controle da resposta imune da prole envolvem outros mecanismos além da neutralização de alérgenos.

A maturação/expansão de sub-populações de linfócitos regulatórios, como as células TCD4+CD25+ pode participar deste mecanismo, como sugerido previamente no modelo de imunização materna com Der p (VICTOR et al., 2003). Estas células estão envolvidas na indução de tolerância oral da prole de camundongos pela transferência de antígenos na amamentação (VERHASSELT et al., 2008) e no controle da asma na prole de mães sensibilizadas a OVA (HUBEAU, 2007).

Bernesen e colaboradores (2006) propuseram que a ativação de linfócitos Treg presentes na placenta, reativos contra antígenos fetais de herança paterna, pode resultar na produção de IL-10, o que poderia contribuir com o menor desenvolvimento de doenças alérgicas. A maior ativação dos Treg devido ao maior número de gestações poderia explicar, parcialmente, a menor ocorrência de alergias a partir do primeiro filho em mulheres múltíparas (BERNESEN et al., 2006).

Resultados prévios do nosso grupo demonstraram que a imunização pré-concepcional com extrato de Der p em camundongos A/Sn inibe a resposta IgE de forma específica e controla a exacerbação da produção de citocinas Th2 na prole imunizada (VICTOR et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que a transmissão de anticorpos a prole é um elemento que deve estar envolvido na regulação da resposta alérgica ao Der p da prole (FUSARO et al., 2002). Altos níveis de TGF- $\beta$  estão presentes no leite de fêmeas imunizadas OVA, citocina de alto potencial regulador sobre linfócitos T (FUSARO et al., 2007).

Neste estudo foi selecionado o alérgeno alimentar ovalbumina (OVA) pois estima-se que pode sensibilizar até 50% dos portadores de dermatite atópica (MARTINEZ et al., 2001). Além disso, a OVA é utilizada em modelos murinos de investigação dos mecanismos envolvidos nas reações alérgicas por diversos pesquisadores (JARRET e HALL, 1983; RUSSO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005; FUSARO et al., 2007; MATSON et al., 2007; VERHASSELT et al., 2008).

Há escassas evidências na literatura sobre a ação de anticorpos/citocinas maternas e sua influência na expressão de moléculas de ativação e de receptores inibidores, como o Fc $\gamma$ RIIb, nos linfócitos B da prole. Desta forma, é proposta estudar os mecanismos regulatórios mediados pela imunização pré-concepcional com OVA na inibição da resposta alérgica da prole imunizada em período neonatal.

## **2 OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da imunização materna pré-concepcional com a ovalbumina (OVA) na resposta de hipersensibilidade do tipo I da prole de camundongos e avaliar os mecanismos envolvidos na regulação da resposta IgE.

### **Objetivos específicos:**

1- Avaliar o efeito da imunização materna com OVA na resposta alérgica da prole quanto a produção de IgE, a expressão de marcadores de ativação/inibição em linfócitos B e TCD4+, a resposta proliferativa e a produção de citocinas;

2- Avaliar o efeito da transferência de IgG durante a amamentação na resposta humoral e expressão de marcadores de ativação/inibição em linfócitos B e TCD4+ da prole imunizada no período neonatal;

3- Avaliar o efeito da transferência de IgG durante a gestação na resposta humoral e expressão de marcadores de ativação/inibição em linfócitos B e TCD4+ da prole imunizada ou não no período neonatal.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os procedimentos adotados para a realização deste trabalho estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

#### **3.1 Animais**

Camundongos isogênicos BALB/c fêmeas e machos foram utilizados com 8-10 semanas de idade cedidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. A prole (F1) de ambos os sexos foi utilizada em diferentes períodos.

#### **3.2 Antígeno**

Foi utilizada a ovalbumina (OVA Grau V – Sigma, St Louis, MO, EUA).

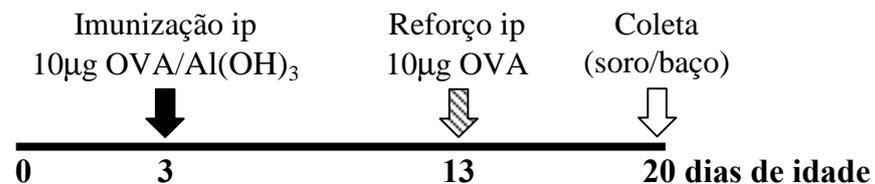
#### **3.3 Protocolo de imunização materna com OVA**

Camundongos BALB/c fêmeas com 8 a 10 semanas de idade foram imunizadas pela via subcutânea (sc) com 150 µg OVA em 6 mg de Al(OH)<sub>3</sub> (Hidróxido de alumínio – FURP, São Paulo), reforçadas com 100 µg de OVA em salina pela via intraperitoneal (ip) após 10 e 20 dias e acasaladas no 21º dia pós imunização (dpi) com machos BALB/c não imunizados.

#### **3.4 Protocolo de imunização neonatal com OVA**

Para avaliarmos o efeito da imunização materna com OVA na resposta imunológica da prole, os filhotes de ambos os sexos derivados de mães imunizadas com OVA ou não imunizadas foram imunizados aos 3 dias de idade (d.i.) com 10 µg de

OVA/ 0,625 mg de Al(OH)<sub>3</sub> em 20 µl de salina pela via ip e reforçados no 10º dpi pela via ip com 10 µg de OVA em 0,2 ml de salina. As proles foram sangradas aos 20 d.i. e os soros estocados a -20 °C, neste período o baço foi coletado para avaliação da expressão de moléculas de superfície em linfócitos B e T e produção intracelular de citocinas. Esquema do protocolo:



### 3.5 Purificação de anticorpos IgG

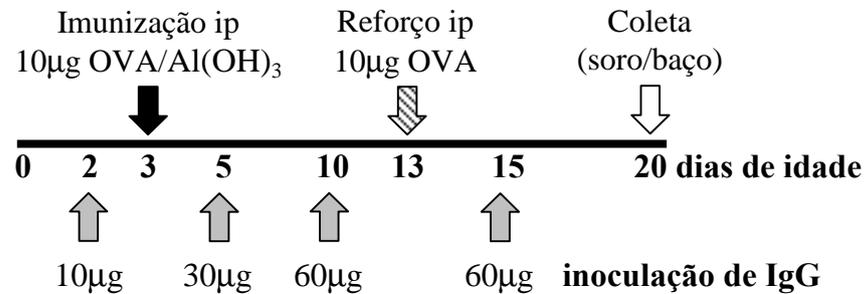
Soros de fêmeas BALB/c controle (não imunizadas) ou submetidas ao protocolo de imunização com OVA (Item 3.3) foram armazenados em pool a -20 °C e utilizados para experimentos de transferência passiva à prole ou para purificação de IgG.

Anticorpos IgG de pool de soros imune ou controle foram purificados segundo as especificações do Kit Melon Gel IgG Spin Purification (Pierce, IL, EUA). Resumidamente, 500 µl de gel de purificação foram colocados em uma mini coluna acoplada a um micro-tubo e centrifugado por 1 minuto a 2000 g. O sobrenadante foi desprezado e a centrifugação repetida com a adição de 300 µl do tampão de lavagem do kit. A amostra do soro foi adicionada ao gel, homogeneizada por 5 minutos e após centrifugação, o sobrenadante (IgG purificada) foi coletado e armazenado a -20 °C para posterior inoculação nos grupos experimentais. A concentração de IgG foi estimada por ensaio imunoenzimático (ELISA)

### 3.6 Protocolo de transferência PÓS-NATAL de anticorpos IgG

Para avaliarmos o efeito da transferência de anticorpos IgG em proles imunizadas com OVA, filhotes de mães controles receberam pela via ip 10, 30, 60 e 60µg de anticorpos IgG de soro imune ou controle aos 2, 5, 10 e 15 d.i., respectivamente.

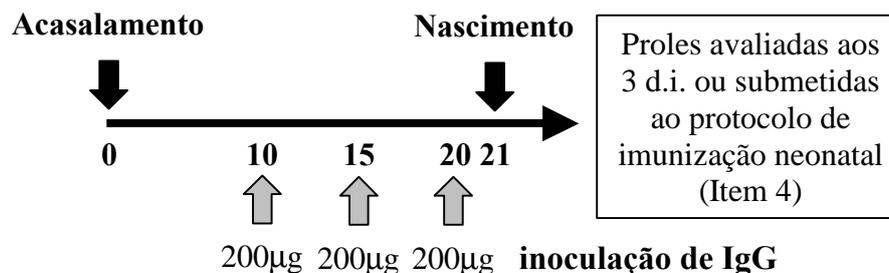
As proles foram submetidas ao protocolo de imunização neonatal com OVA (Item 3.4), sangradas aos 20 d.i. e os soros estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Neste período o baço dos animais foi coletado para avaliação da expressão de moléculas de superfície em linfócitos B e T e produção intracelular de citocinas. Esquema do protocolo:



### 3.7 Protocolo de transferência PRÉ-NATAL de anticorpos IgG

Para avaliarmos o efeito da transferência pré-natal de anticorpos IgG, fêmeas Balb/c controles foram acasaladas e receberam pela via intravenosa  $200\ \mu\text{g}$  de IgG de soro imune ou controle aos 10, 15 e 20 dias de gestação (d.g.) totalizando a transferência de  $600\ \mu\text{g}$  de IgG.

As proles derivadas de mães submetidas a transferência de IgG durante a gestação foram avaliadas aos 3 d.i. ou submetidas ao protocolo de imunização neonatal com OVA (Item 4) e avaliadas aos 20 d.i. Em ambas os períodos de avaliação os animais foram sangrados e os soros estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Foi coletado o baço dos animais para a avaliação da expressão de moléculas de superfície em linfócitos B e T, nos grupos de animais imunizados (20 d.i.) e também para análise de citocinas intracelulares. Esquema do protocolo:



### **3.8 Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva (ACP)**

A titulação de anticorpos IgE anti-OVA foi realizada através da reação de anafilaxia cutânea de acordo com a técnica descrita por Mota e Wong (1969). As diluições de cada amostra de soro dos camundongos foram inoculadas intradermicamente em volume de 50µl no dorso de ratos previamente tricotomizados. Após 18 horas, os ratos receberam pela via intravenosa 0,5 mg de OVA em 1 ml de solução de Azul de Evans a 0,5%. Uma hora depois, os ratos foram sacrificados e o título do soro foi considerado como a recíproca da maior diluição do soro que apresentou reação acima de 5 mm de diâmetro.

### **3.9 ELISA para determinação de anticorpos anti-OVA**

Anticorpos IgG1, IgG2a e IgM anti-OVA foram analisados por ELISA. Resumidamente, microplacas de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, UK) foram sensibilizadas com 5 µg/ml de OVA em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,1 M (pH 9,5) e incubadas por 1 hora a 37° C e por 18 horas a 4°C. Após lavagens com solução de PBS, as microplacas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de soroalbumina bovina (SAB fração V) por 1 hora a 37 °C. Em seguida, as microplacas foram lavadas e incubadas com diluições seriadas do soro por 2 horas a 37° C. Após esta etapa, foram lavadas novamente com PBS contendo 0,1% de Tween e incubadas com anticorpos biotinilados anti-γ1, anti-γ2a ou anti-μ (PharMingen, San Diego, CA, EUA) e incubados por 1 hora a 37 °C. Em seguida, após uma série de lavagens, foi adicionado às placas o conjugado avidina-peroxidase (Sigma) e incubado por 45 minutos a 37 °C. Após esta etapa, a atividade enzimática foi detectada pela adição de 50 µl de substrato TMB (Tetrametil-benzidina, Calbiochem, La Jolla, CA) por no máximo 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) e a leitura foi realizada a 450nm em leitor de microplaca de ELISA (Molecular Devices , CA, EUA). Os valores de densidade ótica (DO) obtidos foram expressos como títulos de anticorpos (log da maior diluição considerada positiva em referência a um pool de soro de camundongos adultos hiperimunes).

### **3.10 Obtenção de células esplênicas**

Os animais foram anestesiados e o baço removido de forma asséptica e depositado em placas de petri contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). Com o auxílio de peneiras para cultura celular (Cell Strainer – BD Biosciences, MA, EUA) a polpa do baço foi removida com êmbolo de seringa de 1mL e a suspensão celular foi tratada com solução de lise de eritrócitos (ACK Lysing Buffer- Biosource, Rockville, MD, EUA) por 2 minutos. A seguir, a suspensão celular foi lavada por centrifugação durante 10 minutos a 200g em meio de cultura RPMI (Cultilab, SP, Brasil) por 2 vezes. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB – HyClone III, Logan, EUA). As células foram quantificadas em contador automático (Cell Dyn 1400, Abbott) e a viabilidade observada com azul de tripan 0,5% em câmara de Neubauer.

### **3.11 Citometria de fluxo para avaliação de moléculas extracelulares**

Células esplênicas na concentração de  $0,5 \times 10^6$  foram transferidas para tubos de ensaio (5 mL), centrifugadas e lavadas em solução de PBS contendo 1% de SAB (PBS-SAB) a 4 °C por duas vezes. Após a última lavagem, foi adicionado sobre o botão de células 0,5 µg de anticorpo monoclonal anti-CD4, anti-B220, anti-CD22 (CD22.2), anti-CD23, anti-CD25, anti-CD28, anti-CD40, anti-CD44, anti-CD69, anti-CD72, anti-CD80, anti-CD86, anti-GITR e anti-CD16/32 (FcγRIII/II), marcados com Cy-Chrome (PharMingen), ficoeritrina (PE - PharMingen), ou fluoresceína (FITC - PharMingen), ou com seus respectivos anticorpos isotípicos e incubados durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, cada suspensão celular foi lavada duas vezes com PBS-SAB a 4 °C. A aquisição de 30.000 eventos foi realizada por amostra no quadrante de linfócitos (determinado pela relação tamanho/granulosidade). Neste quadrante foi determinado um segundo quadrante para células que expressam as moléculas B220 (Linfócitos B) ou CD4 (Linfócitos TCD4) dentro dos quais foi avaliada a expressão das moléculas de membrana. A análise foi realizada utilizando o software SYSTEM II (Coulter) em citômetro de fluxo (Coulter - Epics-XL – FL, EUA).

### 3.12 Citometria de fluxo para avaliação intracelular de citocinas

Para a determinação intracelular de citocinas as células esplênicas foram cultivadas em placas de 24 orifícios (Costar, Cambridge, MA, UK) na presença de Brefeldina A (10 µg/mL - Sigma) em meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB e incubadas por 24h. Posteriormente, as células foram lavadas com solução PBS-SAB e marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 ou anti-B220 como descrito no item 10. Em seguida, as células foram lavadas com PBS-SAB e fixadas com PBS contendo 4% de formaldeído (Merck). Após mais uma lavagem, as células foram permeabilizadas com PBS-SAB contendo 0,5% de saponina (Sigma) e anticorpos monoclonais anti-IL4, anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-12, IL-10 ou anticorpos isotípicos marcados com PE (PharMingen) e incubadas por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS-SAB. A aquisição de 30.000 eventos por amostra no quadrante de linfócitos (determinado pela relação tamanho/granulosidade) foi realizada em citômetro de fluxo (Coulter - Epics-XL).

### 3.13 Citometria de fluxo para avaliação de citocinas no sobrenadante

Para a dosagem de citocinas em sobrenadantes foi utilizado o Kit *CBA mouse Th1/Th2* (Cytometryc Bead Assay – BD) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, micro esferas de diferentes intensidades do fluorógeno PE sensibilizadas com anticorpos anti-IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram incubadas com amostras de sobrenadante ou curva padrão na presença de anticorpos de captura, para as mesmas citocinas, conjugados ao PE por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens com tampão fornecido pelo fabricante as micro esferas foram analisadas em citômetro de fluxo (BD – FacsCalibur) e as dosagens determinadas no programa *CBA Analysis Software*. A sensibilidade do ensaio foi de 5pg/ml para as citocinas IL-2, IL-4 e IL-5, 2,5 pg/ml para IFN- $\gamma$  e 6,3 pg/ml para TNF- $\alpha$ .

### **3.14 Cultura para avaliação da proliferação celular**

Células esplênicas foram cultivadas em micro placas de 96 orifícios (Costar, Cambridge, MA, UK) na concentração de  $0,5 \times 10^5$  céls/orifício em 200µl de meio de cultura RPMI com 10% de SFB na presença ou ausência de 200 µg/ml de OVA. Após 72 horas as células foram pulsadas com timidina triciada (GE Healthcare, UK) e após 24 horas as células foram aspiradas com coletor de células automático (*Cell-Harvester*) em membranas de fibra de vidro. As membranas secas foram envolvidas em envelopes plásticos na presença do líquido de cintilação. A seguir as membranas foram colocadas no contador de cintilação beta (BETAPLATE, Wallac, Finland). O número de contagens por minuto (cpm) de cada triplicata foi calculado pelo índice de estimulação (IE) obtido pela divisão da média das cpm das triplicatas das culturas estimuladas pela média das triplicatas das culturas não estimuladas.

### **3.15 Cultura de células esplênicas para obtenção de sobrenadante**

Células esplênicas foram cultivadas em micro placas de 48 orifícios (Costar, Cambridge, MA, UK) na concentração de  $1 \times 10^6$  céls/orifício em um volume total de 500µl de meio de cultura RPMI com 10% de SFB na presença ou ausência de 200µg/ml de OVA. Após 72 horas o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C até a dosagem de citocinas.

### **3.16 Purificação de linfócitos B**

Os linfócitos B esplênicos foram purificados por seleção negativa com esferas magnéticas do kit *B-cell isolation (MACS - Miltenyi Biotec – CA - EUA)* de acordo com as orientações do fabricante. Resumidamente, as células foram incubadas por 10 minutos com anticorpos anti-CD43, CD4 e Ter-119 biotinilados, em seguida incubadas 15 minutos com micro esferas magnéticas sensibilizadas com anticorpos anti-biotina. Após lavagem as células foram submetidas a uma coluna magnética capaz de reter as micro-esferas selecionando negativamente os linfócitos B. A pureza da suspensão de

células foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando-se os marcadores B220 e CD19 e a pureza foi superior a 95%.

### **3.17 Cultura de linfócitos B purificados**

As suspensões de linfócitos B purificados foram cultivadas em placas de 96 orifícios na concentração de  $0,5 \times 10^5$  céls/orifício em 200 $\mu$ l de meio de cultura RPMI com 10% de SFB na presença de 5 $\mu$ g/ml de ODN-CpG do tipo B (1826 – 5' TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT 3'), 10 $\mu$ g/ml de Fab' anti-IgM (Southern) com ou sem 12,5U/ml de IL-4 recombinante (Pharmingen). A incorporação de timidina triciada foi determinada como descrito no item 12.

### **3.18 Análise estatística**

Para avaliação estatística foi utilizado o método não paramétrico *Mann-Whitney*, a significância entre os grupos foi considerada quando  $P \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito da imunização materna com OVA na expressão de moléculas em linfócitos da prole no período neonatal

Previamente, observamos que a imunização materna com o alérgeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) inibia o desenvolvimento da resposta alérgica da prole, devido a descontinuidade do fornecimento do extrato de Der p, prosseguimos a avaliação dos mecanismos envolvidos neste processo com outro alérgeno, a Ovalbumina (OVA).

Para avaliarmos a influência da imunização materna com OVA na resposta imune da prole, inicialmente observamos a expressão de moléculas de ativação e inibição em linfócitos B e de ativação em linfócitos T CD4<sup>+</sup> das proles aos 3 d.i. Grupos de fêmeas BALB/c foram imunizadas ou não com OVA, reforçadas no 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dpi e acasaladas com machos no 21<sup>o</sup> dpi. Aos 3 d.i. foi realizada a análise da expressão das moléculas CD80, CD86, CD69, CD40, CD44, CD23, FcγRIIb, CD22 e CD72 em linfócitos B (B220<sup>+</sup>) e CD25, CD28, CD44 e GITR (*glucocorticoid-induced TNF-related receptor*) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> esplênicos por citometria de fluxo.

O anticorpo monoclonal anti-CD16/32 utilizado na avaliação do receptor inibidor de linfócitos B FcγRIIb também reconhece as isoformas FcγRIII e FcγRIIa, desta forma, para avaliarmos a expressão desta molécula inibidora foram analisados os linfócitos B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> que expressam predominantemente a isoforma FcγRIIb (SANDOR et al., 1996).

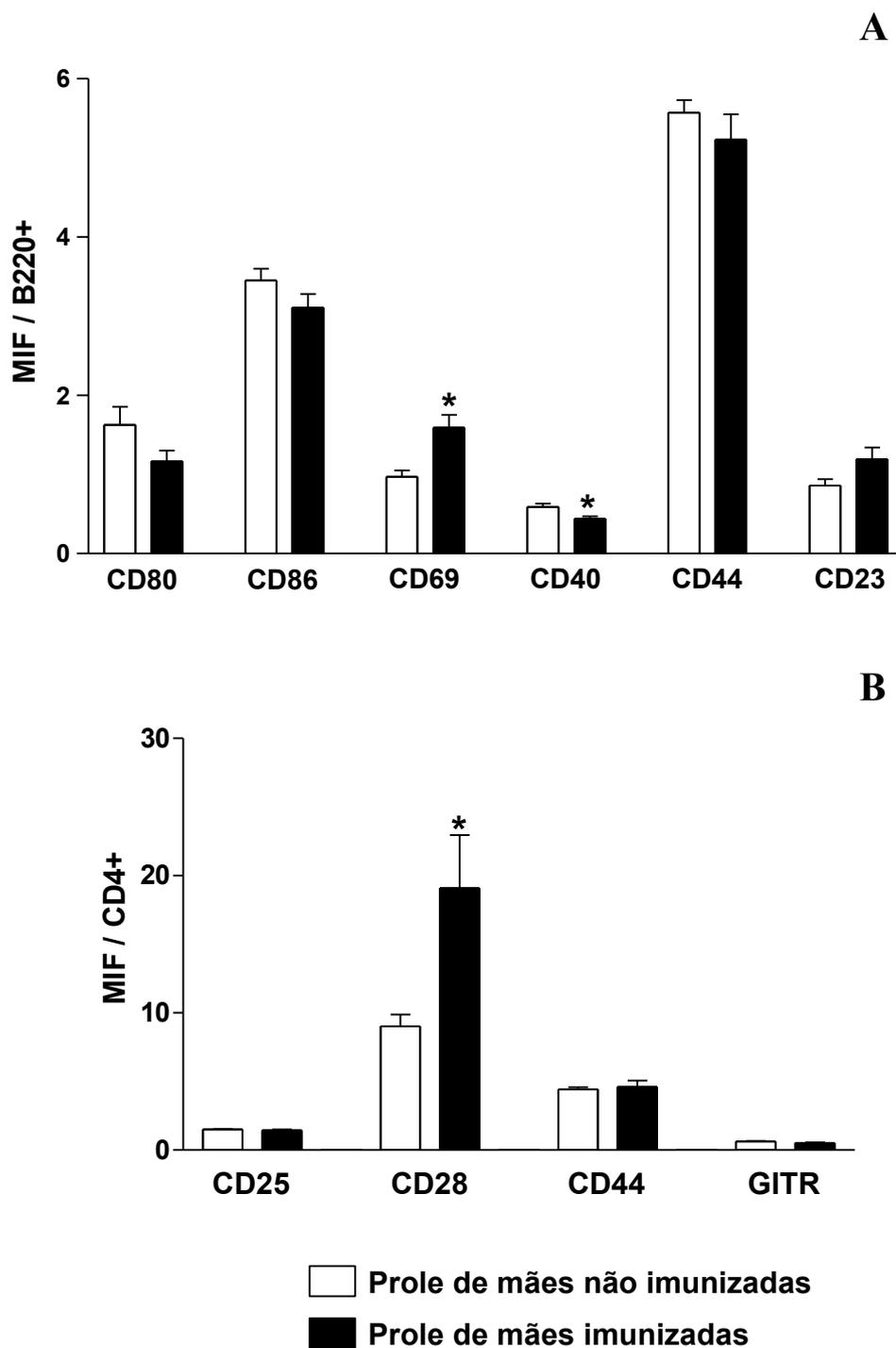
O número absoluto de linfócitos B (B220<sup>+</sup>) esplênicos da prole não foi alterado pela imunização materna (não imune =  $1,365 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,119, imune =  $1,059 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,107). Já o valor absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> das proles de mães imunizadas ( $0,124 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,016) diminuiu significativamente em relação as proles de mães não imunizadas ( $0,265 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,016).

A figura 1A mostra que os linfócitos B de neonatos de mães imunizadas expressam a molécula CD69 com maior intensidade em contraste com menor intensidade de CD40 em comparação à prole de mães não imunizadas. Não foi observada diferença na intensidade de expressão das moléculas CD80, CD86, CD44 e

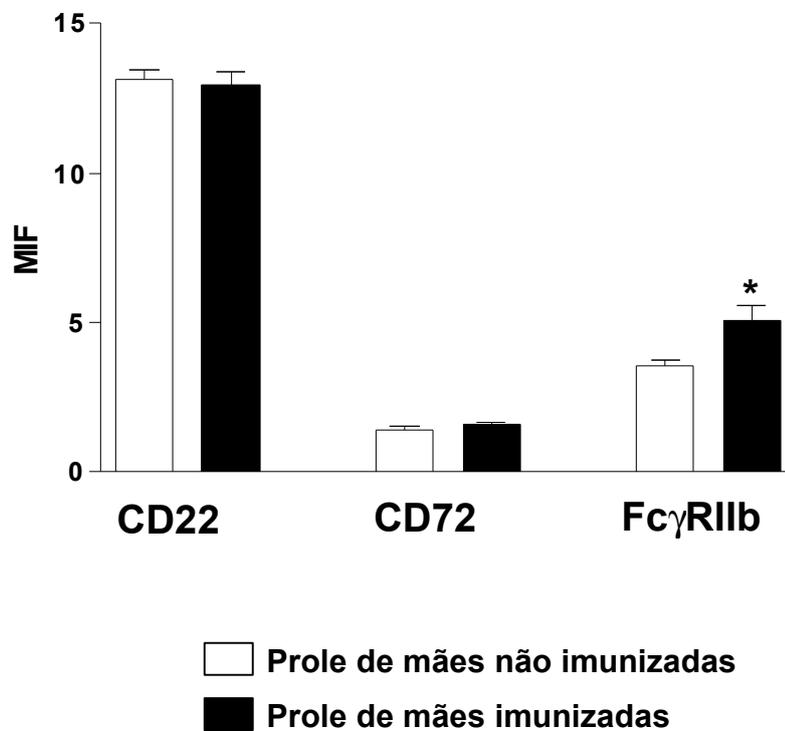
CD23. A avaliação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> revelou um aumento da intensidade de expressão da molécula CD28 nas proles de mães imunizadas (Figura 1B).

A avaliação das moléculas inibidoras em linfócitos B mostra que a expressão de CD22 e CD72 não se alterou com a imunização materna porém, aumentou a intensidade de expressão do receptor FcγRIIb nas proles (Figuras 2 e 3).

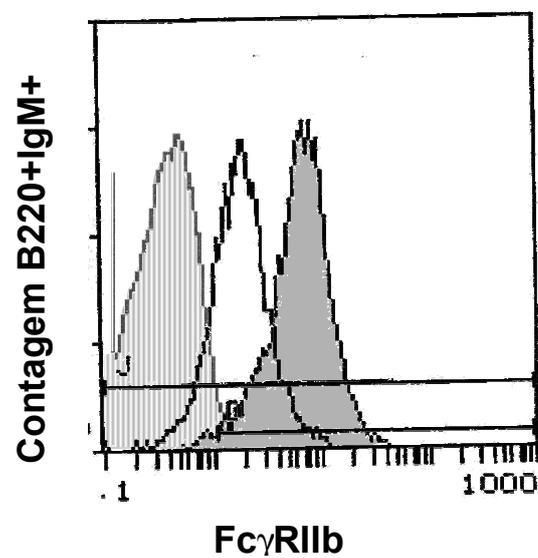
Estes resultados mostram que a imunização materna aumenta a expressão de moléculas de ativação precoce, como o CD69, nos linfócitos B da prole em período neonatal. Entretanto, estas células podem estar menos ativadas pela redução da expressão do CD40 e pelo aumento da expressão dos receptores FcγRIIb. Apesar da queda do número absoluto de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, houve um aumento da expressão da molécula co-estimuladora CD28 nas proles de mães imunes em estágio inicial de vida.



**Figura 1:** Efeito da imunização materna com OVA na expressão de marcadores em linfócitos B e T CD4+ da prole no período neonatal. Grupos de proles de mães imunizadas (n=12) ou não (n=12) com OVA foram sacrificados aos 3 d.i. e os linfócitos esplênicos B220+ (A) ou CD4+ (B) foram avaliados por citometria de fluxo. As barras representam a média de intensidade de fluorescência (MIF) ± erro padrão. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 2:** Expressão de moléculas de inibição em linfócitos B de neonatos. Grupos de proles de mães imunizadas (n=12) ou não (n=12) com OVA foram sacrificadas aos 3 d.i. e as células esplênicas B220+ foram avaliadas quanto a expressão de CD22 e CD72 e as B220+IgM+ quanto a expressão do receptor Fc $\gamma$ RIIb por citometria de fluxo. As barras representam a MIF  $\pm$  erro padrão. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 3:** Histograma da intensidade de expressão da molécula Fc $\gamma$ RIIb em linfócitos esplênicos B220+IgM+ de prole aos 3 d.i. de mãe imunizada ou não com OVA por citometria de fluxo. A área listrada representa o valor obtido com o controle isotípico, a área branca de prole de mãe não imunizada e a área cinza de prole de mãe imunizada.

#### **4.2 Efeito da imunização materna com OVA na expressão de moléculas e produção de citocinas em linfócitos B e TCD4+ da prole em período pré-desmame**

Para averiguar se as alterações observadas nas proles aos 3 dias de idade permanecem em período posterior a expressão de marcadores de ativação e/ou inibição em linfócitos da prole de mães imunizadas foi avaliada aos 20 d.i.

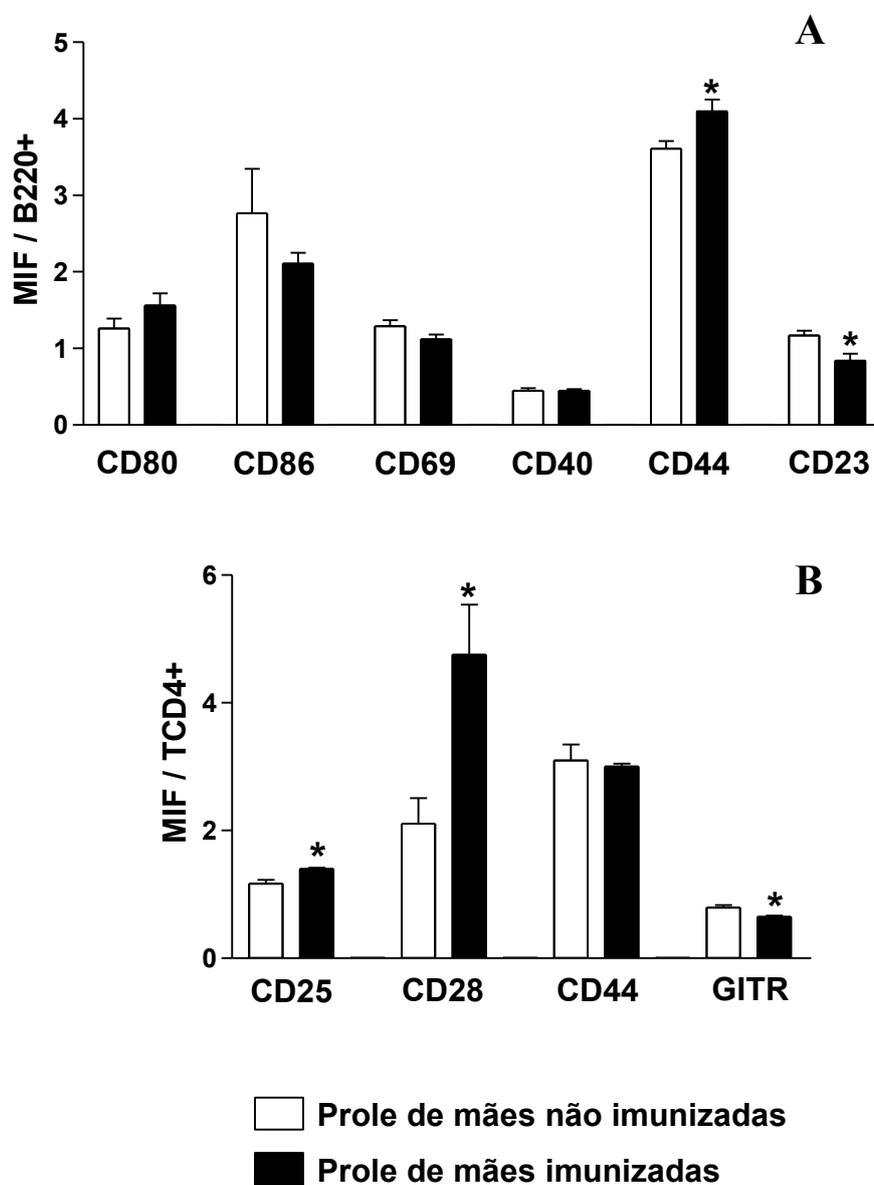
Os mesmos marcadores avaliados nos linfócitos B e TCD4 das proles aos 3 d.i. foram investigados. Além disso, foi realizada a análise das citocinas intracelulares IL-4 e IL-12 (p40/p70) em linfócitos B e IL-4, IFN- $\gamma$  em linfócitos TCD4+ por citometria de fluxo.

A imunização materna com OVA não alterou o número absoluto de linfócitos T CD4+ (não imune =  $1,510 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,304, imune =  $1,615 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,101) ou B (não imune =  $3,325 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,139, imune =  $2,915 \times 10^6$  céls  $\pm$  0,211) das proles com 20 d.i.

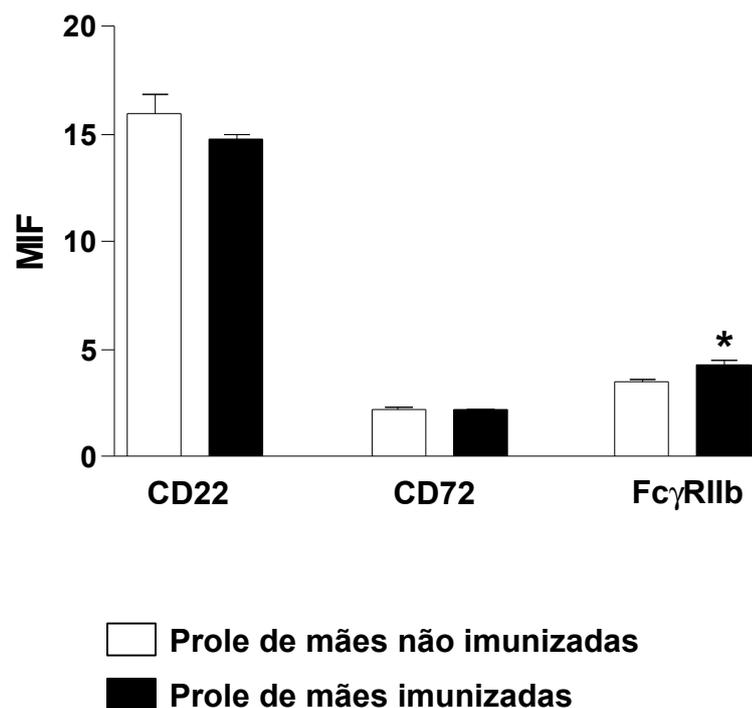
A figura 4A mostra que a imunização materna com OVA é capaz de aumentar a intensidade de expressão da molécula CD44 e diminuir a expressão do CD23 nos linfócitos B de animais não imunizados. Nestas proles foi observado um aumento da expressão das moléculas CD25 e CD28 em linfócitos T CD4+, associado à diminuição da expressão do GITR (Figura 4B). A avaliação de moléculas de inibição nos linfócitos B mostrou que a imunização materna aumenta a intensidade de expressão do receptor Fc $\gamma$ RIIb (Figura 5 e 6).

A figura 7A mostra que a imunização materna diminuiu significativamente o percentual de linfócitos B produtores de IL-4 e IL-12, mas não de IFN- $\gamma$  das proles não imunizadas. Os linfócitos TCD4+ das proles de mães imunes mostraram percentuais reduzidos de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Figura 7B). em relação as proles de mães controles.

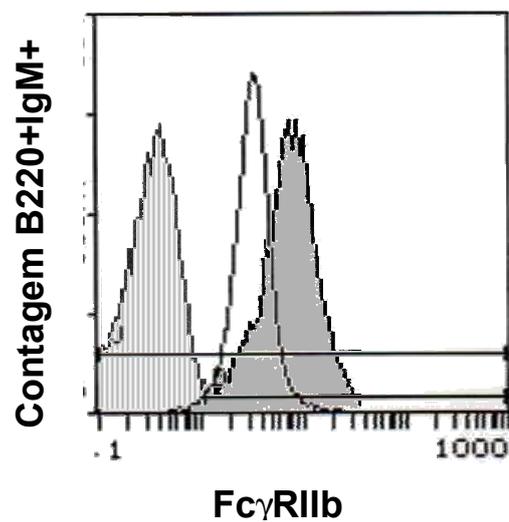
Estes resultados mostram que, com o avanço da idade dos 3 aos 20 d.i., a imunização materna, mantém o aumento da expressão do Fc $\gamma$ RIIb e diminuiu a expressão do receptor de baixa afinidade para IgE (CD23). Paralelamente, a imunização materna manteve o aumento da intensidade de expressão do CD28 e induziu um aumento da expressão do CD25 nos linfócitos TCD4+ com a idade da prole. Além das alterações fenotípicas, a imunização materna diminuiu o percentual de linfócitos B e TCD4+ secretores de citocinas de ambos padrões, Th1 e Th2.



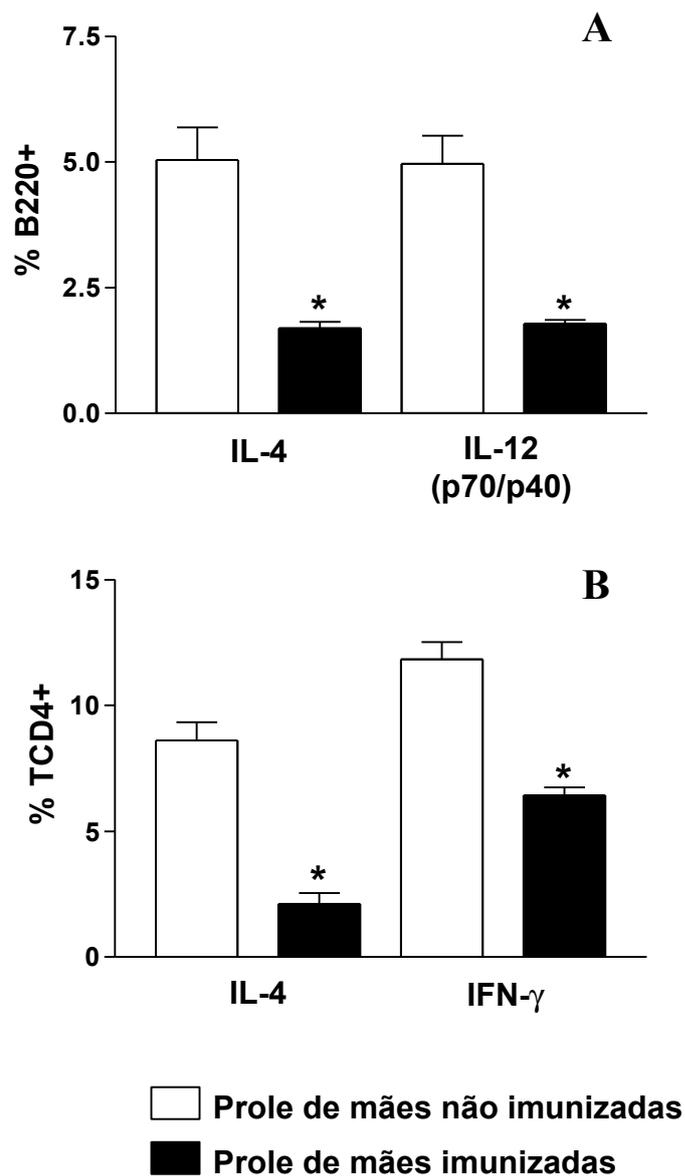
**Figura 4:** Efeito da imunização materna com OVA na expressão de marcadores em linfócitos B e T CD4+ da prole no período pré-desmame. Grupos de proles de ambos os grupos de mães imunizadas (n=9) ou não (n=10) com OVA foram sacrificados aos 20 d.i. e os linfócitos esplênicos B220+ (A) ou CD4+ (B) foram avaliados por citometria de fluxo. As barras representam a MIF  $\pm$  erro padrão. \*  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 5:** Expressão de moléculas de inibição em linfócitos B da prole no período pré- desmame. Grupos de proles de mães imunizadas (n=9) ou não (n=10) foram sacrificadas aos 20 d.i. e as células esplênicas B220+CD22+, B220+CD72+ ou B220+IgM+ FcγRIIb+ foram avaliadas por citometria de fluxo. As barras representam a MIF ± erro padrão. \*= p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle.



**Figura 6:** Histograma da intensidade de expressão da molécula Fc $\gamma$ RIIb em linfócitos esplênicos B220+IgM+ de prole aos 20 d.i. de mãe imunizada ou não com OVA por citometria de fluxo. A área listrada representa o valor obtido com o controle isotípico, a área branca de prole de mãe não imunizada e a área cinza de prole de mãe imunizada.



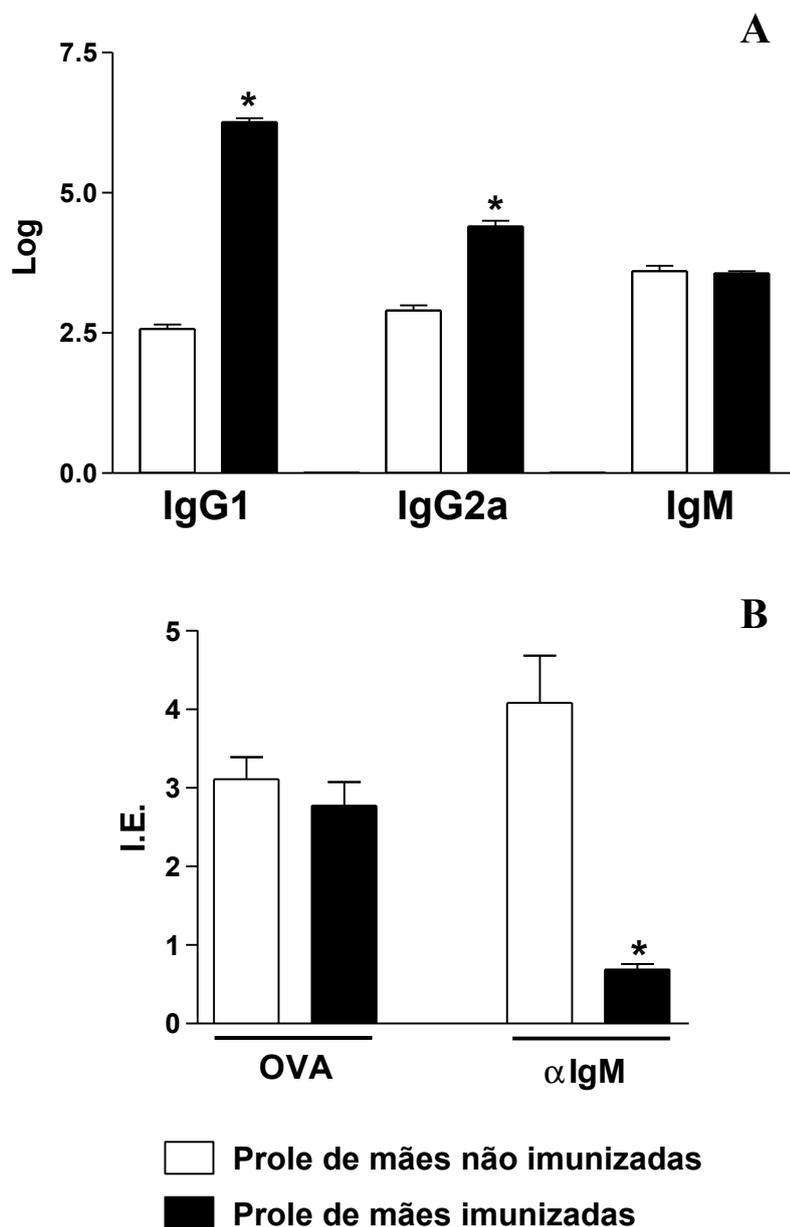
**Figura 7:** Citocinas intracelulares de linfócitos B (A) e TCD4+ (B) esplênicos da prole não imunizada. Grupos de proles de mães imunizadas (n=9) ou não (n=10) com OVA foram sacrificadas aos 20 d.i., os linfócitos esplênicos foram cultivados com Brefeldina A por 24h e avaliados por citometria de fluxo quanto a presença intracelular de citocinas. As barras representam a média %  $\pm$  erro padrão. \*=  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

### **4.3 Efeito da imunização materna com OVA na resposta humoral e celular da prole não imunizada**

Para evidenciarmos se a imunização materna com OVA é capaz de sensibilizar a prole, na resposta humoral ou celular, passamos a analisar a presença de anticorpos IgG1, IgG2a, IgM e a resposta proliferativa das proles aos 20 d.i. Para tanto, a presença de anticorpos foi avaliada por ELISA e a resposta proliferativa antígeno específica e anti-IgM de células esplênicas por cultura celular.

A figura 8A mostra que a imunização materna transfere altos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-OVA para a prole, não estimulando a produção de anticorpos IgM da prole. Além disso, a imunização materna também não induz resposta proliferativa a OVA da prole, considerando que o índice de estimulação foi inferior a 3 (Figura 8B). Entretanto a resposta proliferativa de células B aos estímulos com fragmentos Fab' IgG anti-IgM mostrou que a imunização materna inibe significativamente a proliferação dos linfócitos B das proles (Figura 8B).

Estes resultados mostram que a imunização materna transfere anticorpos IgG anti-OVA para a prole, não induz resposta celular antígeno específica, mas inibe a resposta B via BCR.



**Figura 8:** Efeito da imunização materna com OVA na resposta humoral (A) e celular (B) da prole não imunizada. Grupos de proles de mães imunizadas (n=19) ou não (n=11) com OVA foram avaliados aos 20 d.i. Os soros das proles foram avaliados quanto a presença de anticorpos IgG1 IgG2a e IgM anti-OVA por ELISA e as células esplênicas cultivadas na presença de OVA (200 $\mu$ g/ml) ou Fab' anti-IgM (10 $\mu$ g/ml) por 120h e a resposta proliferativa foi avaliada pela incorporação de timidina triциada. As barras representam a média do I.E.  $\pm$  erro padrão. \*= p  $\leq$  0,05 em relação ao grupo controle.

#### **4.4 Efeito da imunização materna com OVA na resposta humoral e celular da prole imunizada no período neonatal**

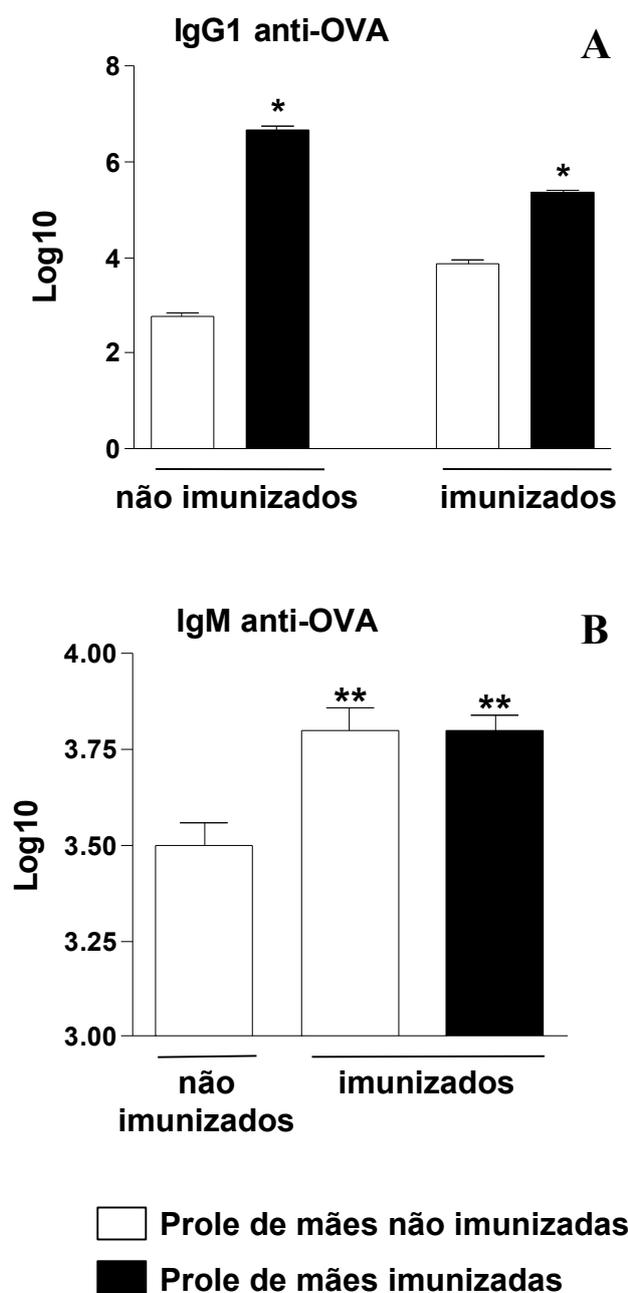
Passamos a investigar o efeito da imunização materna com OVA na resposta imune da prole imunizada com o respectivo antígeno materno. Para tanto, as proles de mães imunes ou não foram imunizadas com OVA aos 3 d.i. e analisadas aos 20 d.i. quanto a presença de anticorpos IgE por anafilaxia cutânea passiva, anticorpos IgG1 e IgM por ELISA e a resposta proliferativa de células esplênicas ou de linfócitos B purificados por cultura celular.

A figura 9 mostra que a imunização materna com OVA inibe a produção de anticorpos IgE anti-OVA da prole, entretanto, não interfere na produção de anticorpos IgG1 e IgM anti-OVA (Figura 10).

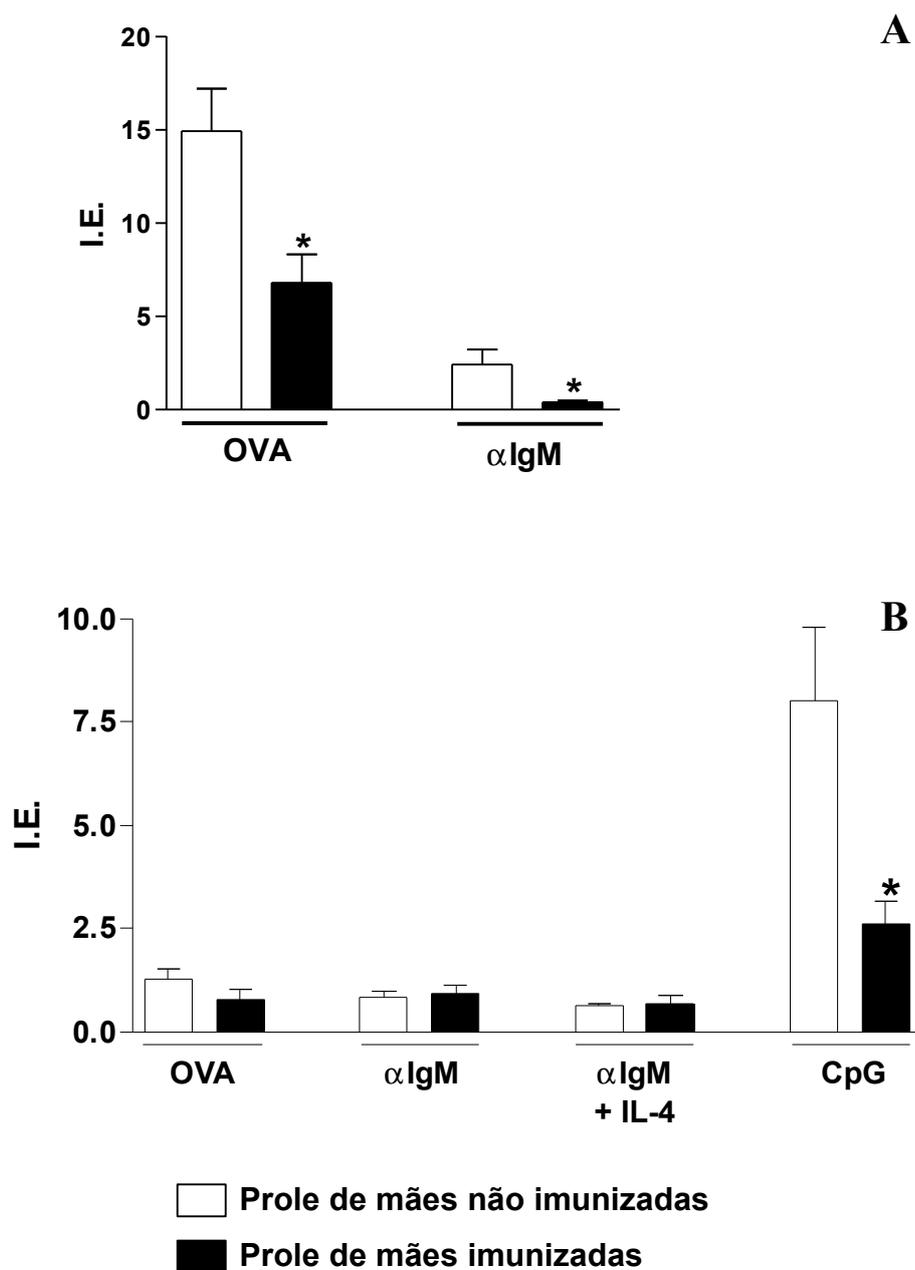
A imunização materna com OVA diminui significativamente a resposta proliferativa antígeno específica das proles imunizadas em relação ao grupo controle (Figura 11A). A proliferação de linfócitos B induzida por anti-IgM, apesar do baixo nível de resposta, também mostrou uma queda na resposta de proles de mães imunizadas (Figura 11A). Experimentos com linfócitos B purificados mostraram baixa resposta proliferativa a anti-IgM, seja na presença ou não de IL-4 recombinante. Em contraste, a resposta proliferativa dos linfócitos B ao oligodeoxinucleotídeo (ODN) CpG do tipo B, um potente ativador da resposta inata de linfócitos B e agonista do receptor TLR-9, foi significativamente diminuída nas proles de mães imunizadas (Figura 11B).

Estes resultados mostram que a imunização materna é capaz de inibir a resposta proliferativa antígeno-específica, proliferação dos linfócitos B pelo estímulo com CpG via TLR e a produção de anticorpos IgE das proles de mães imunizadas. Os achados mostram que a imunização materna pode mediar uma inibição antígeno específica e policlonal da prole.





**Figura 10:** Efeito da imunização materna com OVA na produção de anticorpos de proles imunizadas ou não no período neonatal. Grupos de proles de mães imunizadas (n=15) ou não (n=15) com OVA foram imunizados com OVA aos 3 d.i., reforçados aos 13 d.i. e sangrados aos 20 d.i. Os soros foram avaliados quanto a presença de anticorpos IgG1 e IgM anti-OVA por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. \* =  $p \leq 0,05$  em relação a prole de mãe não imunizada. \*\* =  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo não imunizado de mães não imunizadas.



**Figura 11:** Efeito da imunização materna com OVA na resposta proliferativa de proles imunizadas no período neonatal. Grupos de proles de mães imunizadas (n=9) ou não (n=9) com OVA foram imunizados com OVA aos 3 d.i., reforçados aos 13 d.i. e sacrificados aos 20 d.i. Os linfócitos esplênicos (A, n=15) ou B purificados (B, n=5) foram cultivados com 200 $\mu$ g/ml de OVA, 10 $\mu$ g/ml anti-IgM com ou sem IL-4 recombinante ou 5 $\mu$ g/ml ODN CpG tipo B por 120h e a resposta proliferativa avaliada pela incorporação de timidina triçada. As barras representam a média do I.E.  $\pm$  erro padrão. \*= p  $\leq$  0,05 em relação ao grupo controle.

#### **4.5 Efeito da imunização materna com OVA na expressão de moléculas e produção de citocinas em linfócitos B e TCD4+ da prole imunizada no período neonatal**

Prosseguindo a investigação do efeito da imunização materna com OVA na resposta imune da prole imunizada passamos a avaliar o fenótipo e produção de citocinas dos linfócitos B e TCD4 das proles. Proles de mães imunizadas ou não foram imunizadas com OVA aos 3 d.i., e analisadas aos 20 d.i. com os mesmos marcadores de linfócitos B e TCD4 das proles não imunizadas. Além disso, as citocinas intracelulares em linfócitos B e TCD4+, bem como a secreção de IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura celular estimulada com OVA foram avaliadas por citometria de fluxo.

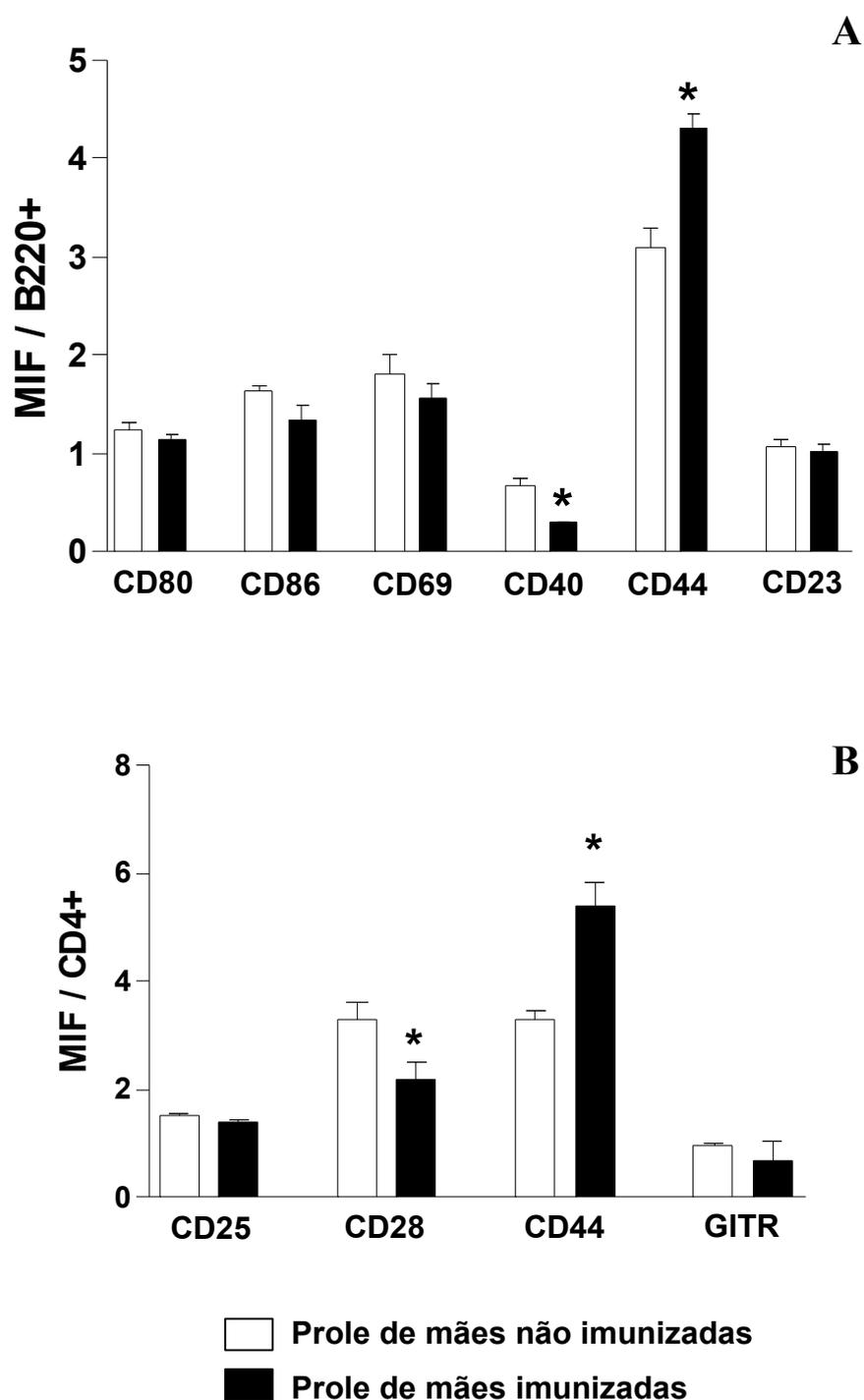
O número absoluto de linfócitos B (B220+) e TCD4+ esplênicos aumentou significativamente nas proles imunizadas de mães imunizadas (B220+ =  $42,040 \times 10^6$  céls  $\pm 3,580$ , TCD4+ =  $14,980 \times 10^6$  céls  $\pm 1,650$ ) comparadas as proles imunizadas de mães não imunizadas (B220+ =  $31,130 \times 10^6$  céls  $\pm 1,267$ , TCD4+ =  $10,560 \times 10^6$  céls  $\pm 0,496$ ).

A imunização materna com OVA aumentou a expressão da molécula CD44 em linfócitos B da prole imunizada (Figura 12A), como observado anteriormente nas proles não imunizadas. Além disso, houve diminuição da expressão da molécula CD40 nos linfócitos B da prole (Figura 12A e 14), característica já detectada nas proles aos 3 d.i. Em relação aos linfócitos TCD4+, a imunização materna aumentou a expressão da molécula de ativação CD44 e diminuiu a expressão da molécula co-estimulatória CD28 em contraste ao observado nas proles não imunizadas (Figura 12B e 14).

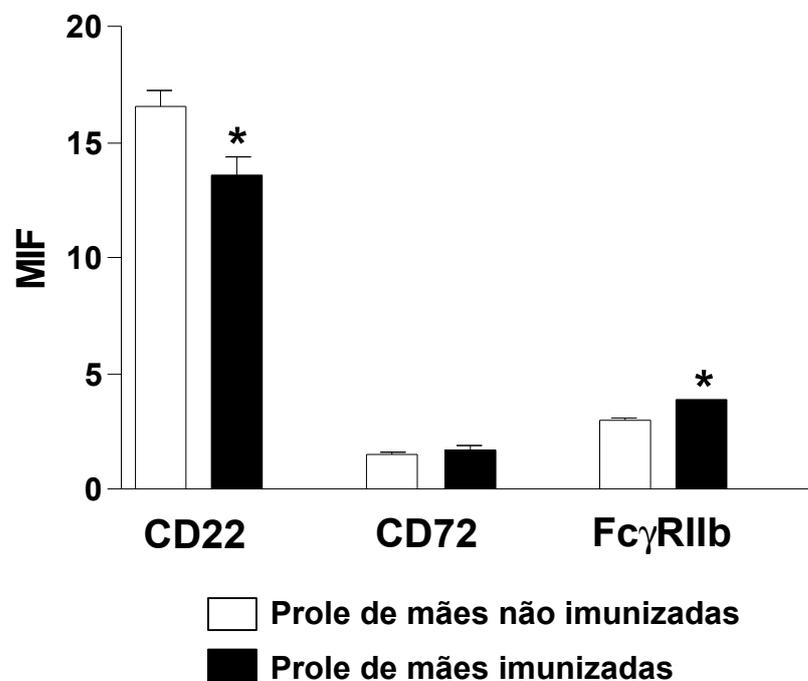
Em paralelo foi observado nestes animais o aumento de intensidade de expressão do receptor Fc $\gamma$ RIIb similarmente ao observado nos animais não imunizados. Além disso, a imunização materna diminuiu a expressão da molécula inibidora CD22 nas células B das proles de mães imunizadas (Figuras 13 e 14).

Quanto as células secretoras de citocinas pode-se observar que a imunização materna diminuiu o percentual de linfócitos B produtores de IL-12 (p40/p70), mas não altera a produção de IL-4 da prole imunizada (Figura 15B). Além disso, a imunização materna diminuiu o percentual de linfócitos T CD4+ produtores de IL-4 da prole (Figura 15A), o qual refletiu na diminuição da secreção de IL-4 induzida pelo antígeno (Figura 15C).

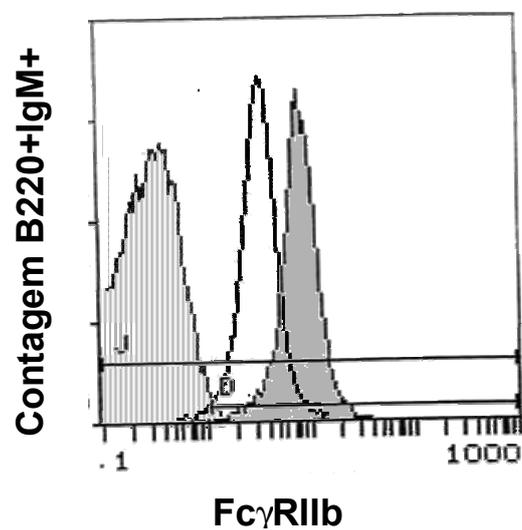
Estes resultados mostram que a imunização materna estimula a expressão dos receptores Fc $\gamma$ RIIb nos linfócitos B das proles imunizadas e em paralelo diminui a expressão da molécula CD28 em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e a produção de citocinas Th2.



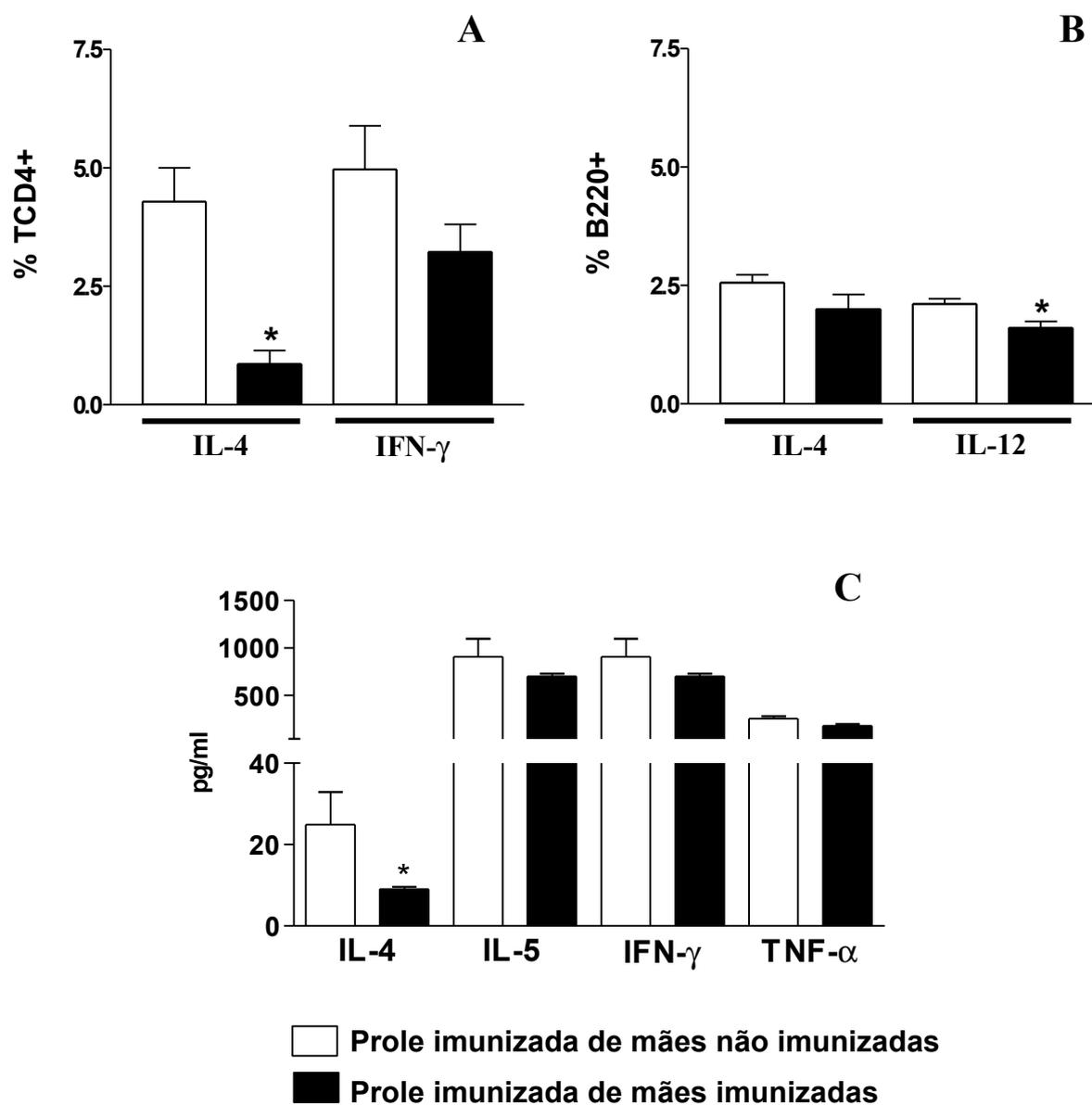
**Figura 12:** Efeito da imunização materna com OVA na expressão de marcadores em linfócitos B e T CD4<sup>+</sup> da prole imunizada no período neonatal. Grupos de proles de ambos os grupos de mães imunizadas (n=17) ou não (n=14) com OVA foram imunizadas aos 3 d.i., sacrificados aos 20 d.i. e os linfócitos esplênicos B220<sup>+</sup> (A) ou CD4<sup>+</sup> (B) foram avaliados por citometria de fluxo. As barras representam a MIF ± erro padrão. \* p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle.



**Figura 13:** Expressão de moléculas de inibição em linfócitos B da prole imunizada no período neonatal. Grupos de proles de mães imunizadas (n=17) ou não (n=14) foram imunizadas aos 3 d.i., sacrificadas aos 20 d.i. e as células esplênicas B220+CD22+, B220+CD72+ ou B220+IgM+ FcγRIIb+ foram avaliadas por citometria de fluxo. As barras representam a MIF ± erro padrão. \*= p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle.



**Figura 14:** Histograma da intensidade de expressão da molécula Fc $\gamma$ RIIb em linfócitos esplênicos B220+IgM+ das proles imunizadas com OVA aos 3 d.i. de mães imunizadas ou não com OVA por citometria de fluxo. A área listrada representa o valor obtido com o controle isotópico, a área branca de prole de mãe não imunizada e a área cinza de prole de mãe imunizada.



**Figura 15:** Efeito da imunização materna com OVA na produção de citocinas da prole imunizada no período neonatal. Grupos de proles de mães imunizadas (n=9) ou não (n=8) com OVA foram imunizados com OVA aos 3 d.i., reforçados aos 13 d.i. e sacrificados aos 20 d.i. Os linfócitos esplênicos foram incubados com Brefeldina A por 24h e o percentual de linfócitos produtores de citocinas avaliado por citometria de fluxo (A e B), ou cultivados por 72h na presença de 200 $\mu$ g/ml de OVA para dosagem de citocinas por citometria de fluxo (C). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. \*=  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

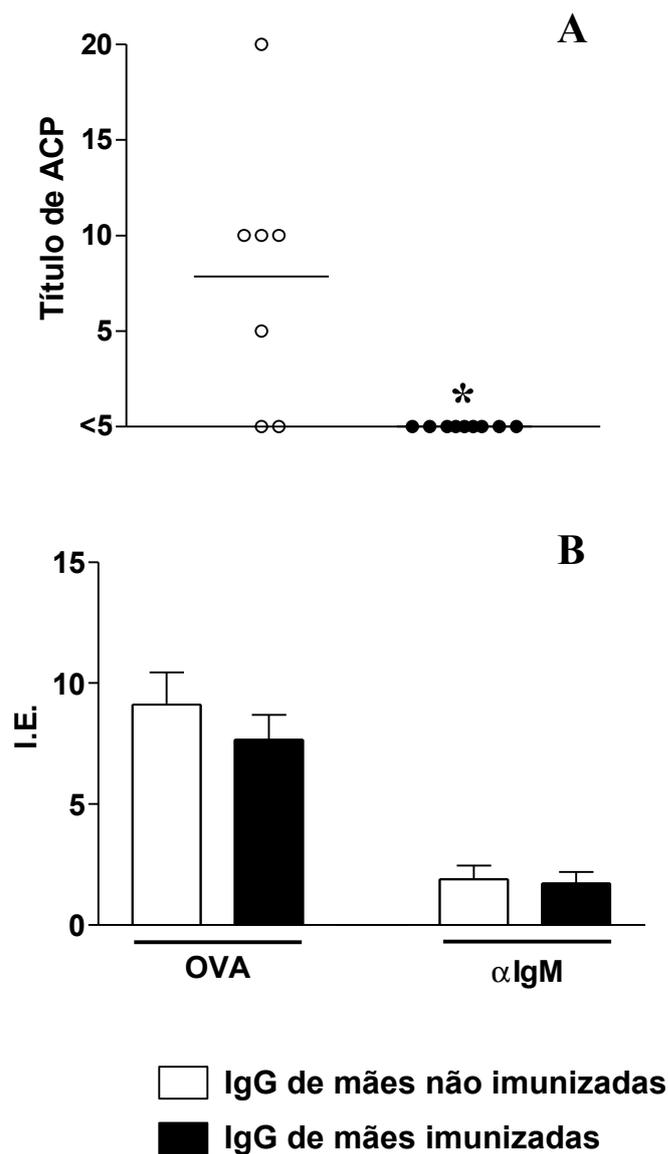
#### **4.6 Efeito da transferência pós-natal de IgG na resposta imune da prole imunizada no período neonatal**

Com o objetivo de evidenciarmos se os anticorpos maternos contribuem para as alterações no fenotípicas e na produção de citocinas dos linfócitos B da prole, foram realizados experimentos de transferência de anticorpos IgG de fêmeas imunizadas com OVA ou não imunizadas, após o nascimento da prole.

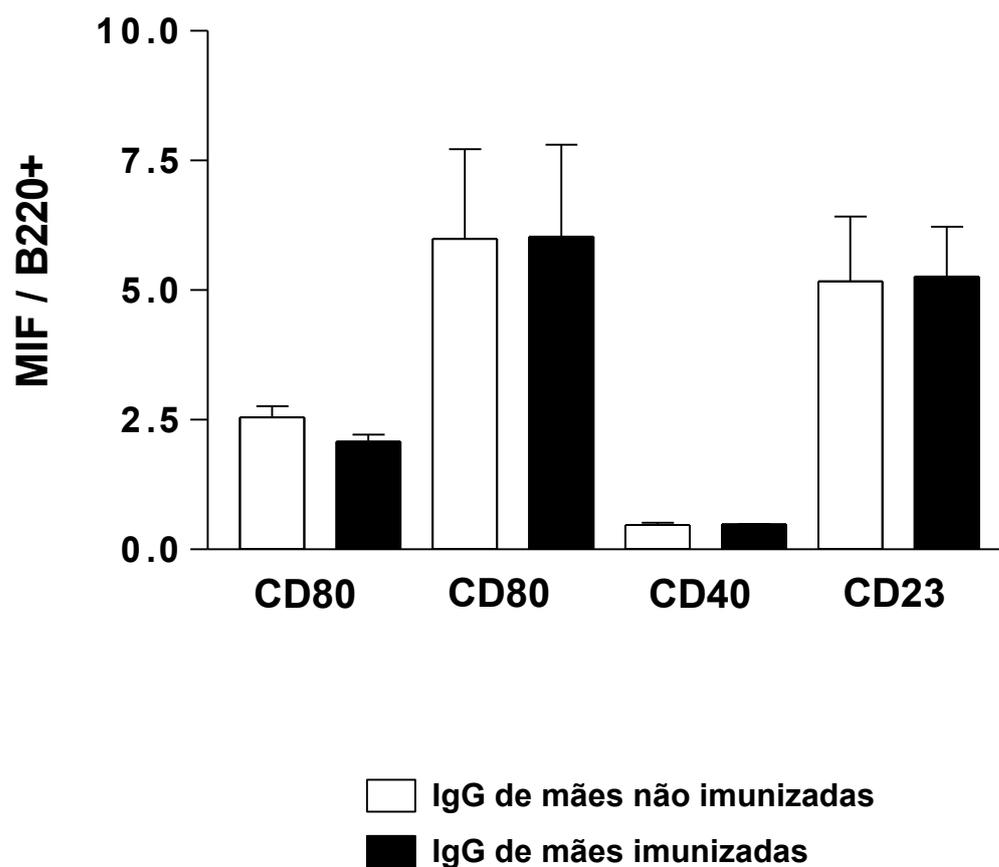
Grupos de proles de mães não imunizadas receberam anticorpos IgG de mães não imunizadas ou imunes a OVA aos 2, 5, 10 e 15 d.i. Posteriormente, as proles foram submetidas ao protocolo de imunização com OVA no período neonatal (3 d.i.). Os animais foram sacrificados aos 20 d.i., os soros foram avaliados por ACP quanto a presença de anticorpos IgE anafiláticos e os linfócitos esplênicos avaliados por citometria de fluxo quanto ao fenótipo e produção intracelular de citocinas.

A figura 16 mostra que a transferência passiva de anticorpos IgG imunes a OVA foi capaz de inibir a produção de anticorpos IgE da prole. Entretanto, não alterou a resposta proliferativa antígeno específica e policlonal da prole (Figura 16) como também na expressão de moléculas de ativação e/ou inibição de linfócitos B e T CD4+ e citocinas intracelulares (Figuras 17, 18 e 19).

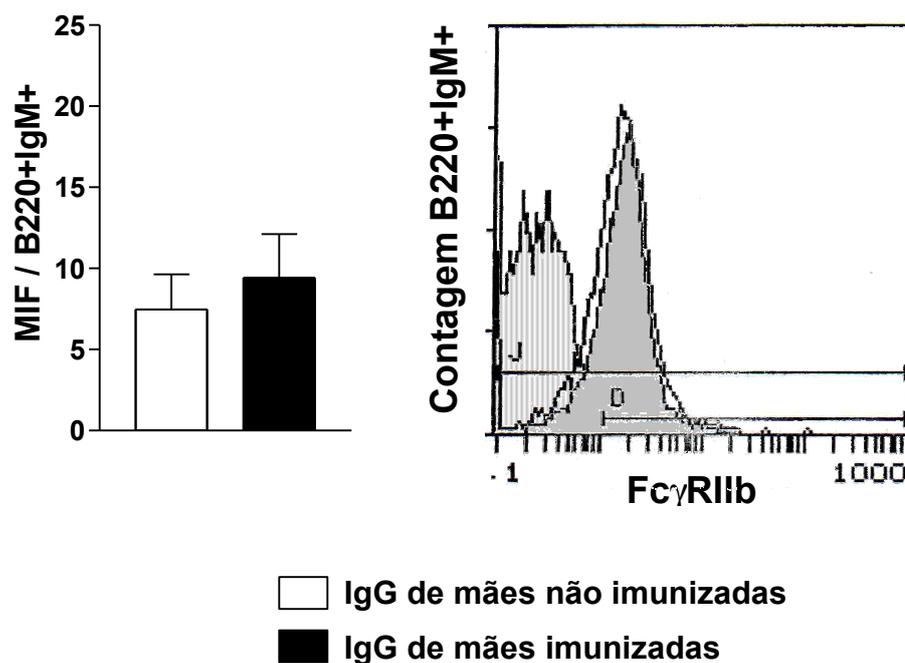
Em conjunto, estes resultados mostram que os anticorpos maternos anti-OVA transferidos no período pós-natal contribuem para inibição da resposta IgE da prole imunizada mas não para as alterações celulares encontradas nas proles de mães imunizadas no período pré-concepção.



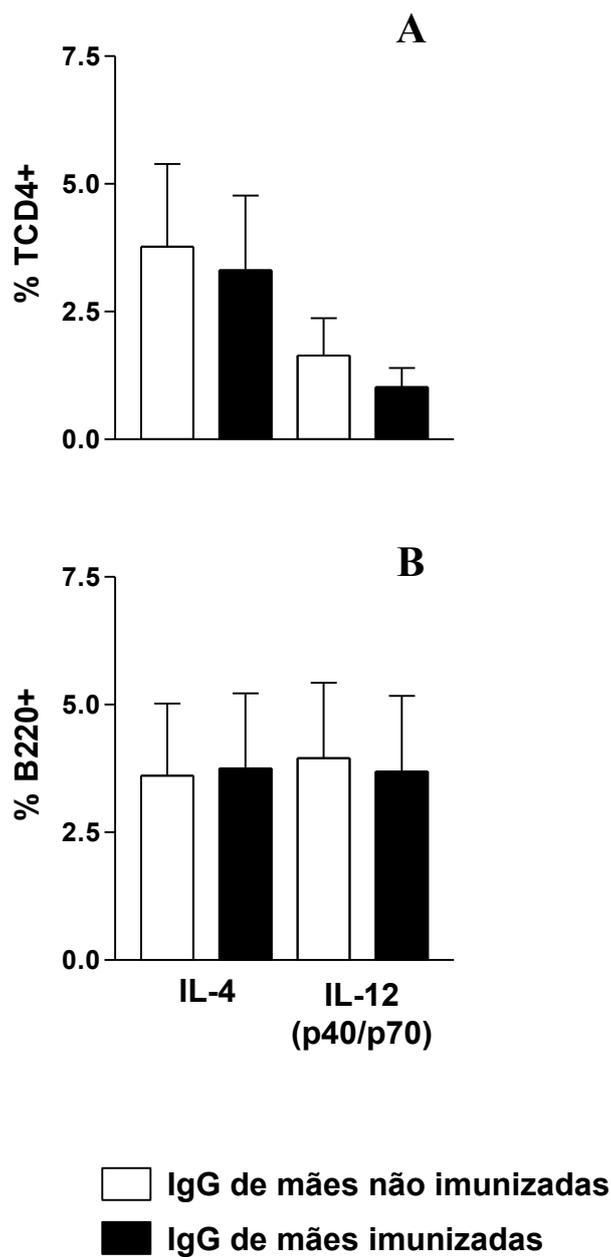
**Figura 16:** Efeito da transferência de anticorpos IgG na produção de anticorpos IgE (A) e resposta proliferativa (B) da prole imunizada no período neonatal. Grupos de proles de mães normais receberam IgG purificada de soro mães imunizadas ou não com OVA aos 2, 5, 10 e 15 d.i. e foram imunizados com OVA aos 3 d.i., reforçados aos 13 d.i. e sangrados aos 20 d.i. Os soros foram avaliados quanto à presença de anticorpos IgE anti-OVA por reação de ACP. Os linfócitos esplênicos foram cultivados com 200µg/ml de OVA ou 10µg/ml de anti-IgM por 120h e a resposta proliferativa avaliada pela incorporação de timidina triciada. Os pontos representam valores individuais e o traço representa a média de cada grupo. As barras representam a média do I.E. ± erro padrão. \*=  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 17:** Efeito da transferência de IgG na expressão de moléculas em linfócitos B da prole imunizada no período neonatal. Grupos de proles receberam IgG purificada de mães imunizadas (n=9) ou não (n=7) com OVA e foram imunizados com OVA aos 3 d.i. e sacrificadas aos 20 d.i. Os linfócitos esplênicos B220+ foram avaliados por citometria de fluxo. As barras representam a MIF ± erro padrão.



**Figura 18:** Efeito da transferência de IgG na expressão do receptor FcγRIIb em linfócitos B da prole imunizada no período neonatal. Grupos de proles receberam IgG purificada de mães imunizadas (n=9) ou não (n=7) com OVA e foram imunizados com OVA aos 3 d.i. e sacrificadas aos 20 d.i. As células esplênicas B220+IgM+FcγRIIb+ foram avaliadas por citometria de fluxo. As barras representam a MIF ± erro padrão. A área listrada representa o valor obtido com o controle isotópico, a área branca do animal tratado com IgG não imune e a área cinza do animal tratado com IgG imune.



**Figura 19:** Citocinas intracelulares de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e B (B) esplênicos da prole não imunizada. Grupos de proles receberam IgG purificada de mães imunizadas (n=9) ou não (n=7) com OVA e foram imunizados com OVA aos 3 d.i. e sacrificadas aos 20 d.i. Os linfócitos esplênicos foram incubados com Brefeldina A por 24h e avaliados por citometria de fluxo quanto a presença intracelular de citocinas. As barras representam a média %  $\pm$  erro padrão.

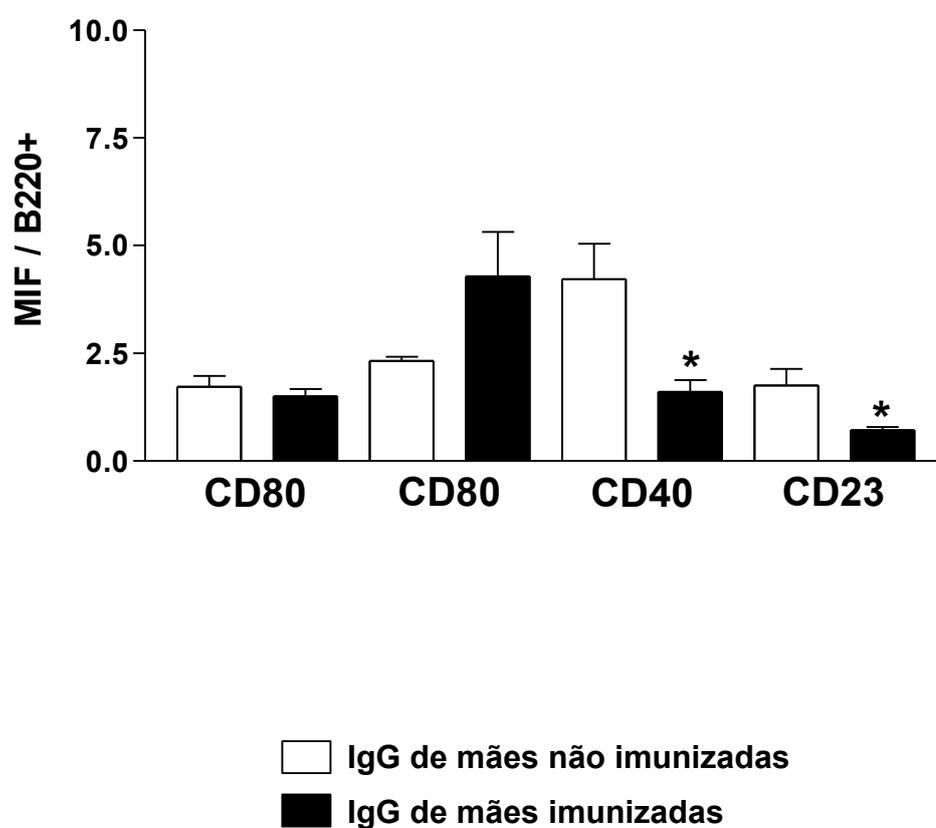
#### **4.7 Efeito da transferência de IgG durante a gestação na expressão de marcadores em linfócitos B da prole no período neonatal**

Com o objetivo de evidenciarmos se os anticorpos maternos transferidos durante a gestação podem induzir alterações em moléculas de ativação e inibição em linfócitos B e TCD4+ da prole no período neonatal, foram realizados experimentos de transferência de anticorpos IgG purificados do soro de fêmeas imunizadas ou não com OVA para fêmeas gestantes não imunizadas.

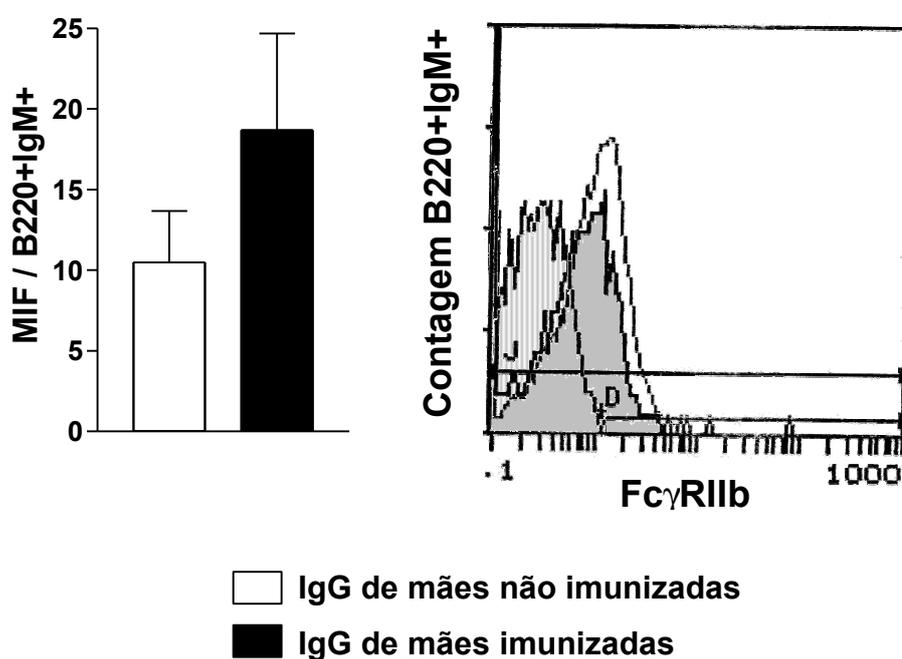
Grupos de fêmeas gestantes não imunizadas receberam por via intra-venosa anticorpos IgG imunes ou não no 10º, 15º e 20º dia de gestação. As proles de ambos os grupos foram avaliadas aos 3 d.i. quanto a expressão de moléculas de ativação e inibição de linfócitos B e ativação de TCD4 esplênicos por citometria de fluxo.

Os resultados mostram uma diminuição da intensidade de expressão das moléculas CD40 e CD23 nos linfócitos B das proles de mães que receberam IgG imune durante a gestação em relação as que receberam IgG normal (Fig. 20). Não houve alteração na expressão do receptor FcγRIIb em linfócitos B da prole (Fig. 21).

Os dados sugerem que os anticorpos IgG anti-OVA transmitidos durante o desenvolvimento fetal, podem alterar a expressão de moléculas de ativação de linfócitos B da prole no período neonatal.



**Figura 20:** Efeito da transferência de anticorpos IgG durante a gestação na expressão de moléculas de ativação de linfócitos B esplênicos da prole no período neonatal. Grupos de fêmeas gestantes receberam 200µg IgG de soro de mães imunizadas (n=5) ou não (n=4) com OVA aos 10, 15 e 20 dias após o acasalamento. Os linfócitos B esplênicos das proles aos 3 d.i. foram avaliados quanto a expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. As barras representam a MFI ± erro padrão. \*= p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle.



**Figura 21:** Efeito da transferência de anticorpos IgG durante a gestação na expressão do receptor Fc $\gamma$ RIIb em linfócitos B esplênicos da prole no período neonatal. Grupos de fêmeas gestantes receberam 200 $\mu$ g IgG de soro de mães imunizadas (n=5) ou não (n=4) com OVA aos 10, 15 e 20 dias após o acasalamento. Os linfócitos B esplênicos da prole aos 3 d.i. foram avaliados quanto a expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. As barras representam a MIF  $\pm$  erro padrão. No histograma a área listrada ilustra o controle isotípico, a área branca o grupo tratado com IgG não imune e a área cinza o grupo tratado com IgG imune.

#### **4.8 Efeito da transferência de IgG durante a gestação na resposta imune da prole imunizada no período neonatal**

Prosseguindo a avaliação da transferência de anticorpos maternos durante a gestação, avaliamos na prole imunizada as alterações na expressão de moléculas de membrana dos linfócitos B e TCD4+.

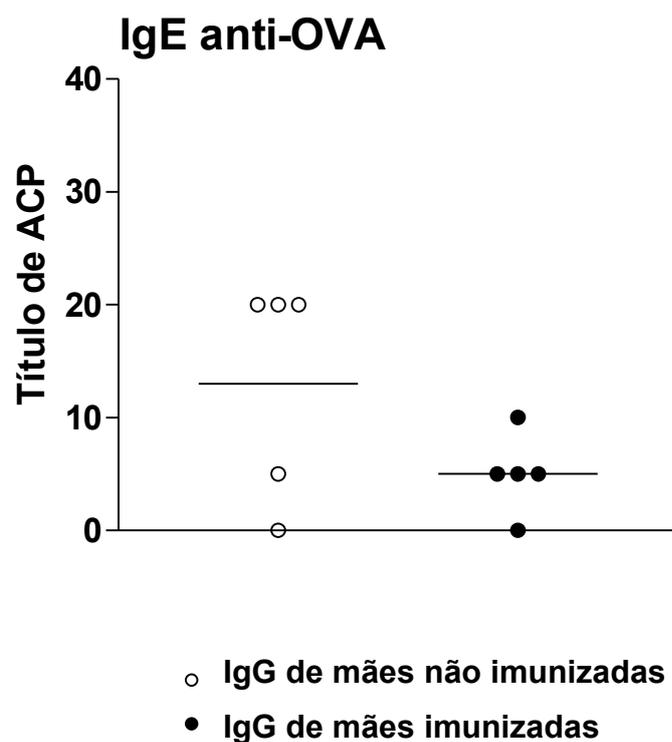
As proles de fêmeas submetidas ao protocolo de transferência de IgG imune ou normal foram imunizadas com OVA aos 3 d.i., reforçadas aos 13 d.i. Os animais foram sacrificados aos 20 d.i., os soros foram avaliados por ACP quanto a presença de anticorpos IgE anafiláticos e os linfócitos esplênicos avaliados por citometria de fluxo quanto ao fenótipo e produção intracelular de citocinas.

A transferência de IgG imune durante a gestação não foi capaz de alterar a produção de anticorpos IgE anafiláticos (Fig. 22) mas reduziu a intensidade de expressão da molécula CD40 nos linfócitos B da prole (Fig. 23).

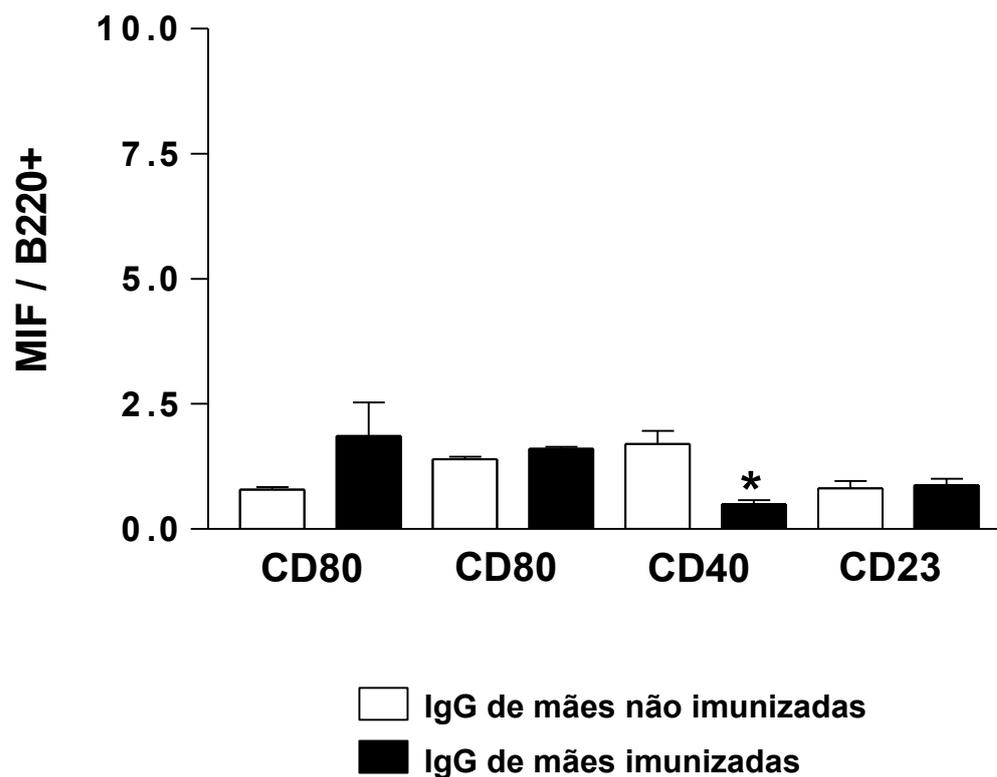
A imunização neonatal não alterou a expressão do receptor inibidor Fc $\gamma$ RIIb em linfócitos B decorrente da transferência de IgG imune (Fig. 24), efeito este também observado nas proles não imunizadas.

A avaliação intracelular de citocinas mostra que a transferência de IgG imune durante a gestação aumentou o percentual de linfócitos TCD4 produtores de IL-10 da prole imunizada, sem alterar a frequência de células produtoras de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Fig. 25A). Não foi observado alteração nos níveis de citocinas intracelulares em linfócitos B (Fig. 25B).

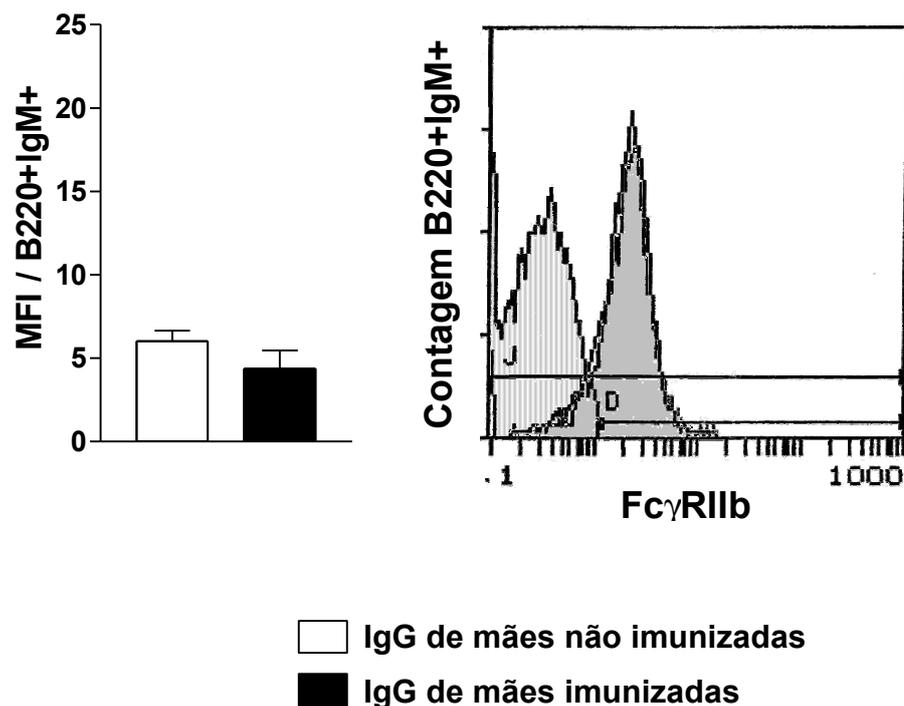
Estes resultados mostram que os anticorpos IgG imunes transferidos durante a gestação, mesmo após a imunização neonatal, reduzem a expressão da molécula CD40 em linfócitos B e aumentam a produção de IL-10 por linfócitos T da prole. Contudo, não foram capazes de alterar a resposta IgE da prole imunizada.



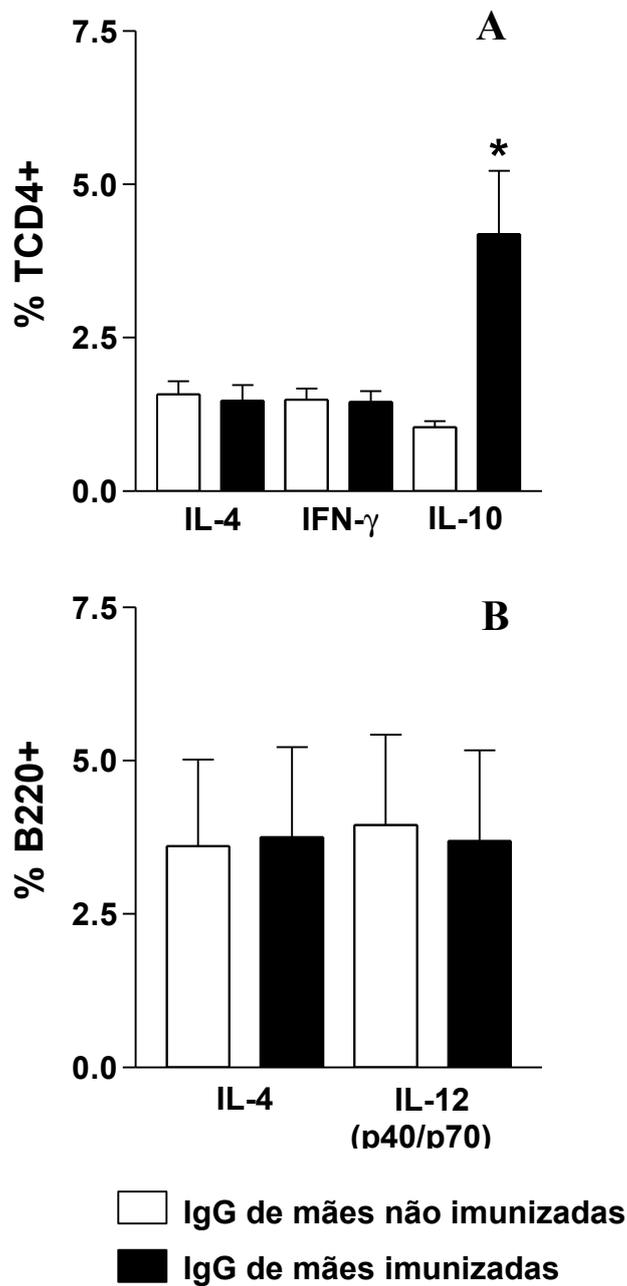
**Figura 24:** Efeito da transferência de anticorpos IgG durante a gestação na produção de anticorpos IgE da prole imunizada no período neonatal. Grupos de fêmeas gestantes receberam 200µg IgG de soro de mães imunizadas (n=4) não (n=4) com OVA aos 10, 15 e 20 dias após o acasalamento. As proles foram imunizadas com OVA aos 3 d.i., reforçados aos 13 d.i. e sangrados aos 20 d.i. Os soros foram avaliados quanto à presença de anticorpos IgE anti-OVA por reação de ACP. Os pontos representam valores individuais e o traço representa a média de cada grupo.



**Figura 25:** Efeito da transferência de anticorpos IgG durante a gestação na produção de IgE e expressão de moléculas de ativação de linfócitos B esplênicos da prole imunizada no período neonatal. Grupos de fêmeas gestantes receberam 200µg IgG purificada de soro de mães imunizadas (n=4) ou não (n=4) com OVA aos 10, 15 e 20 dias após o acasalamento. As proles foram imunizadas com OVA aos 3 d.i., reforçadas aos 13 d.i. e aos 20 d.i. os linfócitos esplênicos foram avaliados quanto a expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. As barras representam a MIF ± erro padrão. \*= p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle.



**Figura 26:** Efeito da transferência de anticorpos IgG durante a gestação na expressão do receptor Fc $\gamma$ RIIb em linfócitos B esplênicos da prole imunizada no período neonatal. Grupos de fêmeas gestantes receberam 200 $\mu$ g IgG purificada de soro de mães imunizadas (n=4) ou não (n=4) com OVA aos 10, 15 e 20 dias após o acasalamento. As proles foram imunizadas com OVA aos 3 d.i., reforçadas aos 13 d.i. e aos 20 d.i. os linfócitos esplênicos foram avaliados quanto a expressão do receptor Fc $\gamma$ RIIb por citometria de fluxo. As barras representam a MFI  $\pm$  erro padrão. No histograma a área listrada representa o valor do controle isotípico, a área branca do grupo tratado com IgG não imune e a área cinza do grupo tratado com IgG imune.



**Figura 27:** Efeito da transferência de anticorpos IgG durante a gestação na produção intracelular de citocinas em linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e B (B) esplênicos da prole imunizada no período neonatal. Grupos de fêmeas gestantes receberam 200 $\mu$ g IgG purificada de soro de mães imunizadas (n=4) ou não (n=4) com OVA aos 10, 15 e 20 dias após o acasalamento. As proles foram imunizadas com OVA aos 3 d.i., reforçadas aos 13 d.i. e aos 20 d.i. os linfócitos esplênicos foram cultivados por 24h na presença de 10 $\mu$ g/mL de Brefeldina A e avaliados quanto a produção intracelular de citocinas por citometria de fluxo. As barras representam a média %  $\pm$  erro padrão. \* =  $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

## 5 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi estudar o efeito da imunização materna com OVA antes da concepção, na resposta imune da prole de camundongos. Considerando que na fase neonatal há predisposição para respostas do padrão Th2 foi proposto avaliar, o efeito da imunização materna principalmente em fase precoce de vida da prole.

Previamente, foi observado que a imunização materna com o ácaro Der p antes do acasalamento, previne a resposta de hipersensibilidade do tipo I da prole de camundongos A/Sn (VICTOR et al., 2003). Além disso, a inibição da produção de anticorpos IgE anti-Der p da prole manteve-se nas respostas secundária e terciária. A especificidade do efeito inibitório pela imunização materna com Der p, foi observada com a imunização primária da prole com OVA, o que não afetou a resposta IgE anti-OVA, apenas gerando um aumento transitório na produção de anticorpos IgG anti-OVA (VICTOR et al., 2003 ).

O efeito inibitório mediado pela imunização materna com Der p foi observado com a imunização da prole aos 45 d.i., considerando que animais jovens produzem baixos níveis de anticorpos IgE contra alérgenos. Já a imunização com OVA em camundongos aos 3 d.i. induziu importante produção de anticorpos IgE, o que permitiu a investigação dos mecanismos regulatórios mediados pela imunização materna em período neonatal.

No modelo de imunização materna com OVA foi observado que os neonatos não imunizados possuem linfócitos B em um estado de ativação precoce, caracterizado pelo aumento da expressão da molécula indutora de ativação (AIM) ou CD69. Em paralelo, nos linfócitos B, houve aumento da expressão dos receptores inibidores Fc $\gamma$ RIIb que permaneceu até o período de desmame. Este achado pode representar uma tentativa de inibição da ativação dos linfócitos B via BCR como mecanismo regulatório mediado pela imunização materna. Os receptores Fc $\gamma$ RIIb possuem motivos citoplasmáticos inibidores (ITIM), que regulam a ativação dos linfócitos B pelo seqüestro de grupamentos fosfato, responsáveis pela sinalização da ativação celular. Além disso, a expressão de receptores Fc $\gamma$ RIIb em plasmócitos residentes na medula óssea é responsável pela indução de apoptose, conseqüentemente, atuando na regulação das células produtoras de anticorpos (XIANG et al., 2007).

Neste sentido, seria necessária a formação de imunocomplexos de anticorpos IgG/OVA para que ocorra a ligação via Fc $\gamma$ RIIb, para inibir os linfócitos B. De fato, na circulação destas proles são detectáveis níveis elevados de anticorpos IgG anti-OVA maternos que poderiam formar imunocomplexos com o alérgeno e desta maneira, prevenindo a sensibilização da prole. Além disso, previamente foi demonstrado que o antígeno pode ser transferido à prole pela via placentária e pelo leite materno em forma livre ou em imunocomplexos por mães que foram intensamente expostas ao antígeno por via oral (FUSARO et al., 2007).

Outras alterações observadas nos linfócitos B das proles de mães imunes foram a diminuição da expressão do receptor de baixa afinidade para IgE (CD23) e o aumento do CD44. A diminuição da expressão de CD23 em linfócitos B pode estar relacionada com a menor captura de imunocomplexos IgE/Alérgeno, e conseqüentemente diminuição da apresentação para os linfócitos TCD4<sup>+</sup> (HJELM et al., 2006). O papel do CD44 em linfócitos B é pouco explorado, embora diversas funções para o CD44 em linfócitos T foram descritas, as quais incluem adesão, rolamento, migração e ativação.

A estimulação *in vitro* de linfócitos B de camundongos BALB/c com anticorpos anti-CD44 imobilizados é capaz de inibir a proliferação e produção de anticorpos induzida via CD40L, especialmente de IgE, efeito também observado com o estímulo com LPS mas não via BCR (WYANT et al., 2005). Este efeito não parece ser mediado por receptores Fc $\gamma$ RII, considerando que o bloqueio do CD44 não interferiu na resposta.

Além das alterações fenotípicas dos linfócitos B das proles de mães imunizadas também foi observado uma diminuição do número de células B esplênicas produtoras de IL-12 e IL-4. Em associação ao aumento da expressão de moléculas com função inibitória, é possível que a imunização materna module negativamente a função dos linfócitos B da prole. A diminuição de IL-12 pelos linfócitos B, pode ter contribuído, em parte pela diminuição dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  das proles não imunizadas de mães imunes. A IL-12 possui um papel importante na proliferação e produção de IFN- $\gamma$  de linfócitos T e NK, o que favorece o padrão Th1 (SARTORI et al., 1997).

De fato, nas proles de mães imunizadas houve um menor percentual de linfócitos T produtores de IL-4, em paralelo a diminuição da secreção de IL-4 em relação as proles de mães controle. Considerando o papel da IL-4 necessário para a

resposta Th2 e na troca de isótipo de anticorpo para a classe IgE, a inibição da resposta Th2 das proles de mães imunes pode estar contribuindo para a inibição da resposta IgE.

Os achados mostram que a imunização materna com OVA é capaz de inibir a produção de citocinas de ambos os padrões Th1 e Th2 na prole. Estes resultados estão de acordo com o modelo de imunização materna com Der p que foi capaz de controlar a exacerbação da produção de IL-4 e inibir a produção de IFN $\gamma$  após a imunização da prole (VICTOR et al., 2003).

A imunização dos camundongos no período neonatal com OVA, permitiu observar a inibição da produção de anticorpos IgE e da resposta proliferativa antígeno específica nas proles de mães imunes. Uma alta expressão da molécula CD28 nos linfócitos CD4 foi observado nas proles aos 3 d.i., que posteriormente, aos 20 d.i., diminuiu significativamente. A expressão de CD28 é fundamental na ativação dos linfócitos TCD4+ (CHAMBERS e ALLISON, 1999), considerando que a ausência desta molécula em camundongos é capaz de inibir o desenvolvimento de doença linfoproliferativa (SINGHN et al., 2007). Desta forma, nas proles de mães imunizadas houve uma ativação inicial dos linfócitos TCD4+, que por um *feedback* negativo de CD28, resultou na diminuição de resposta proliferativa antígeno específica. Entretanto, não descartamos a influência de outros subtipos celulares, como os linfócitos B ou das células dendríticas que poderiam expressar em menor intensidade o ligante do CD28 influenciando sua expressão.

Já nos linfócitos B das proles de mães imunes, mesmo com a imunização neonatal com OVA, manteve o aumento da expressão dos receptores Fc $\gamma$ RIIb. Esta evidência reforça que na prole imunizada o aumento da expressão destes receptores e dos níveis de anticorpos maternos propiciaram a interação de imunocomplexos IgG materna/OVA ou anticorpos maternos idiotípicos aos receptores inibidores, que poderia levar à inibição da ativação e/ou maturação dos linfócitos B.

Além disso, houve uma diminuição da expressão da molécula CD40 nos linfócitos B da prole. O CD40 é um receptor crucial para a troca de isótipo de anticorpo pelo linfócito B e sua expressão é naturalmente elevada no estágio avançado de ativação do linfócito B.

Os animais imunizados de mães imunizadas com OVA mostraram também um aumento do percentual de CD72 nos linfócitos B (dados não demonstrados). Considerando que apenas linfócitos B perdem a expressão do CD72 na diferenciação do

linfócito B em plasmócito (ERICKSON et al., 1996) provavelmente os linfócitos B da prole não se diferenciaram em células secretoras de anticorpos.

O comprometimento das células B das proles de mães imunes também foi verificado na resposta proliferativa ao estímulo via TLR-9 pelo CpG. O ODN CpG tipo B, possui motivos que mimetizam o DNA bacteriano e é caracterizado por induzir a proliferação policlonal dos linfócitos B de camundongos (KRIEG, 2002), estimulando a entrada no ciclo celular e por impedir sua apoptose (YI et al., 1998). A diminuição da resposta ao ODN CpG mostra que os linfócitos B das proles de mães imunes estão em um estado anérgico, que impede a resposta a estímulos seja de resposta inata bem como via BCR.

É possível que a expressão de receptores Fc $\gamma$ RIIb pode influenciar na ativação de linfócitos B via TLR-9, via sinalização com ITIMs, entretanto, não é conhecido se a sinalização via Fc $\gamma$ RIIb pode influenciar negativamente na cascata de sinalização via NF $\kappa$ B desencadeada pela ativação via TLR-9.

Para outros receptores TLR, como o TLR-3, determinantes antigênicos administrados para indução de resposta imune em camundongos é capaz de neutralizar a atividade inibitória dos receptores Fc $\gamma$ RIIb, permitindo o controle do crescimento de tumor hematológico maligno e a indução de células de memória (BOT et al., 2006).

Como observado, a imunização materna proporciona a transferência de anticorpos a prole prevenindo a sensibilização, seja por formação de imunocomplexos ou neutralizando o antígeno, e por outros mecanismos regulatórios na resposta alérgica. Para avaliar a participação dos anticorpos maternos nos períodos pós e pré natal foram realizados experimentos de transferência de anticorpos IgG imunes. O protocolo de transferência de anticorpos IgG em neonatos, mas não durante a gestação, suprimiu a produção de anticorpos IgE, sem alterar os outros parâmetros avaliados. Estes achados contrastam com o observado com a imunização materna que, além de inibir a resposta IgE induziu alterações fenotípicas e funcionais nos linfócitos da prole imunizada. A inibição da produção de IgE da prole imunizada foi provavelmente devido a neutralização do antígeno, impedindo a sensibilização da prole.

É possível que a imunização materna favoreça a transferência de anticorpos durante o desenvolvimento fetal que exercem influência no repertório dos linfócitos da prole ou transferem outros fatores regulatórios maternos, como citocinas, capazes de induzir as alterações celulares observadas nas proles.

A transferência de linfócitos Th2 específicos ao alérgeno OVA para fêmeas normais aumenta o desenvolvimento da hiperreatividade pulmonar das proles de camundongos (HUBEAU, 2006). Citocinas como a IL-16, IL-17 e IL-18 podem ser detectadas na interface materno-fetal e aparentemente sua regulação não está relacionada ao balanço Th1/Th2 (OSTOJIC, 2003), colocando em questão a importância do balanço Th1/Th2 na regulação do desenvolvimento da resposta imune da prole (CHAOUAT et al, 2007).

A transferência de anticorpos maternos à prole é abundante durante a gestação e estes podem interferir na resposta imunológica da prole. Considerando que a transferência de anticorpos IgG maternos durante a gestação ocorre predominantemente durante os últimos 5 dias da gestação, foi elaborado um protocolo em fêmeas gestantes não imunizadas com três injeções intra-venosas aos 10, 15 e 20 dias de gestação. A concentração de IgG transferida foi de 0,6mg, abaixo do nível fisiológico, considerando que os níveis de IgG em camundongos adultos é de aproximadamente 2mg/mL (MALANCHERE et al., 1997).

Além disso, devemos considerar que a transferência de anticorpos IgG durante a gestação via receptor FcRn não é seletivo quanto a especificidade dos anticorpos transmitidos para o feto por ser via Fc da IgG (SIMISTER, 2003). Este fato pode ter influenciado na seleção dos anticorpos transferidos considerando que não foram capazes de interferir na resposta IgE da prole imunizada e na expressão dos receptores Fc $\gamma$ RIIb das proles.

Nestes camundongos houve diminuição da intensidade de expressão da molécula CD23 nos linfócitos B da prole aos 3 d.i. e da molécula CD40 que manteve-se posteriormente, entretanto não foi suficiente para controlar a resposta IgE da prole, sugerindo a ausência de algum fator/célula desencadeada pela imunização materna.

Um dado interessante foi o aumento da frequência de linfócitos TCD4 produtores de IL-10 nas proles imunizadas de mães que receberam IgG imune. A IL-10 é uma citocina com potencial inibitório na resposta do padrão Th2, característica de respostas alérgicas (WU et al., 2007). O aumento da frequência de linfócitos TCD4 produtores de IL-10 nos animais imunizados de mães que receberam IgG imune sugere uma tentativa de regulação da resposta alérgica da prole. Este aumento da produção da citocina IL-10 pode ainda ser decorrente da ativação ou estimulação de populações de linfócitos regulatórios.

Os anticorpos IgG imunes transferidos durante a gestação podem afetar a expressão de moléculas de membrana em linfócitos B e a produção de citocinas em linfócitos TCD4 da prole na ausência de imunização. Portanto, os anticorpos maternos *per se* parecem mediar interações idiotípicas entre os receptores de linfócitos B da prole.

As interações idiotípicas entre receptores de linfócitos B ocorrem constantemente formando uma rede de reconhecimento mútuo conhecida como rede idiotípica (JERNE, 1974). Esta rede caracteriza-se pela interação direta entre os idiótipos dos anticorpos que acabam exercendo uma função estimulatória e/ou regulatória na proliferação clonal dos linfócitos B e T (JERNE, 1984).

A formação do repertório imunológico ocorre especialmente durante o período fetal e neonatal quando a ontogenia dos linfócitos B ocorre mais intensamente. Neste período, é possível que os anticorpos anti-idiotípicos maternos transferidos durante a gestação influenciem no repertório de linfócitos B da prole, seja pela interação direta com os receptores dos linfócitos B, pela seleção de clones, ou pela formação de imunocomplexos solúveis (LEMKE e LANGE, 2002).

Já foi demonstrado que as interações idiotípicas entre os anticorpos maternos e os receptores BCR de linfócitos B ou T imaturos especialmente no período fetal, são capazes de selecionar negativamente o repertório de linfócitos B e T da prole (VAKIL et al., 1986, BOGEN et al., 1993).

Apenas com a imunização materna observamos a inibição da resposta IgE, o aumento da expressão do receptor inibidor Fc $\gamma$ RIIb, a diminuição da expressão da molécula CD40 e a inibição da resposta proliferativa antígeno específica e policlonal além das alterações da produção de citocinas dos linfócitos T e B das proles. Estes resultados mostram que os mecanismos envolvidos no controle da resposta alérgica da prole mediada pela imunização materna com OVA não são mediados apenas pelos anticorpos maternos indicando o envolvimento de outros fatores ou células regulatórias induzidas pelo sistema imune materno.

## 6 CONCLUSÃO

As evidências mostram que a imunização pré-concepcional com OVA induz mecanismos que regulam negativamente a resposta IgE da prole imunizada no período neonatal, incluindo alterações fenotípicas e funcionais em linfócitos B e TCD4. Estas Alterações que foram parcialmente observadas em decorrência da transferência passiva de anticorpos IgG durante a gestação ou após o nascimento, sugerindo o envolvimento de outros fatores na regulação da resposta alérgica mediada pela imunização materna.

## REFERÊNCIAS

- ADKINS B, BU Y, CEPERO E, PEREZ R. Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates. **J. Immunol.** 164:2347-53, 2000.
- AMIGORENA S, BONNEROT C, CHOQUET D, FRIDMAN WH, TEILLAUD JL. Fc $\gamma$ RII expression in resting and activated B lymphocytes. **Eur. J. Immunol.** 19: 1379-1385, 1989.
- BEER AE, BILLINGHAM RE. Immunologic benefits and hazards of milk in maternal-perinatal relationship. **Ann Intern Med.** 1975 Dec;83(6):865-71.
- BERNSEN RM, NAGELKERKE NJ, AL-RAMADI BK. Does paternal antigen-induced secretion of interleukin-10 by T regulatory cells mediate the birth order effect? **Med Hypotheses.** 67(4):740-3, 2006.
- BLÜMER N, HERZ U, WEGMANN M, RENZ H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. **Clin Exp Allergy.** 35(3):397-3402, 2005.
- BOGEN B, DEMBIC Z, WEISS S. Clonal deletion of specific thymocytes by an immunoglobulin idiotype. **EMBO J.** 12(1):357-63, 1993.
- BORGHESI C, NICOLETTI C. Autologous anti-idiotypic antibody response is regulated by the level of circulating complementary idiotype. **Immunology.** 89(2):172-7, 1996.
- BOT A, ANTOHI S, BOT S, GARCIA-SASTRE A, BONA C. Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. **Int Immunol.** 9(11):1641-50, 1997.
- BOT A, SHEARER M, BOT S, WOODS C, LIMMER J, KENNEDY R, CASARES S, BONA C. Induction of antibody response by DNA immunization of newborn baboons against influenza virus. **Viral Immunol.** 12(2):91-6, 1999.
- BOT A, SMITH D, PHILLIPS B, BOT S, BONA C, ZAGHOUBANI H. Immunologic control of tumors by in vivo Fc gamma receptor-targeted antigen loading in conjunction with double-stranded RNA-mediated immune modulation. **J Immunol.** 176(3):1363-1374, 2006.
- BRUGNONI D, AIRO P, GRAF D, MARCONI M, LEBOWITZ M, PLEBANI A, GILIAN S, MALACARNE F, CATTANEO R, UGAZIO AG e cols. Ineffective expression of CD40 ligand on cord blood T cells may contribute to poor immunoglobulin production in the newborn. **Eur. J. Immunol.** 24(8):1919-24, 1994

BUSINCO L, MARCHETTI F, PELLEGRINI G, PERLINI R. Predictive value of cord blood IgE levels in 'at-risk' newborn babies and influence of type of feeding. **Clin Allergy**. 1983 Nov;13(6):503-8.

CHAMBERS CA, ALLISON JP. Costimulatory regulation of T cell function. **Curr Opin Cell Biol**. 11(2):203-210, 1999.

CHAOUAT G, DUBANCHET S, LEDÉE N. Cytokines: Important for implantation? **J Assist Reprod Genet**. 11:491-505, 2007.

COFFMAN RL, MOSMANN TR. CD4+ T-cell subsets: regulation and function. **Res Immunol**. 142(1):7-9, 1991.

COOMBS RRA, GELL PGH. Classification of allergic reactions responsible of clinical hypersensitivity and disease. p. 761 em: *Clinical Aspects of Immunology*.

DAERON M. Structural bases of Fc gamma R functions. **Int Rev Immunol**. 1997;16(1-2):1-27.

DEALTRY GB, O'FARRELL MK, FERNANDEZ N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **Inter Arch Allergy Immunol**. 123:107-19, 2000.

DEL PRETE, G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. **Allergy**. 47: 450-5, 1992.

ERICKSON LD, TYGRET LT, BHATIA SK, GRABSTEIN KH, WALDSCHMIDT TJ. Differential expression of CD22 (Lyb8) on murine B cells. **Int Immunol**. 7:1121-9, 1996.

FUSARO AE, BRITO CA, VICTOR JR, RIGATO PO, GOLDONI AL, DUARTE AJS, SATO MN. Maternal fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. **Immunology**. 122(1):107-15, 2007.

FUSARO AE, MACIEL M, VICTOR JR, OLIVEIRA CR, DUARTE AJ, SATO MN. Influence of maternal murine immunization with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract on the type I hypersensitivity response in offspring. **Int Arch Allergy Immunol**. 127(3):208-216, 2002.

GHOSH SK, CHAKRABARTI D. Immunoregulation by processed immunoglobulin on B-cells. **Indian J Biochem Biophys**. 30(6):414-21, 1993.

HEYMAN B. Functions of antibodies in the regulation of B cell responses in vivo. **Springer Semin Immunopathol**. 23(4):421-32, 2001.

HIERNAUX J, BONA C, BAKER PJ. Neonatal treatment with low doses of anti-idiotypic antibody leads to the expression of a silent clone. **J Exp Med**. 153(4):1004-8, 1981.

HOLT PG, JONES CA. The development of the immune system during pregnancy and early life. **Allergy**. 55:688-697, 2000.

HOWIE PW, FORSYTH JS, OGSTON SA, CLARK A, FLOREY CD. Protective effect of breast feeding against infection. **BMJ**. 300(6716):11-6, 1990.

HUBEAU C, APOSTOLOU I, KOBZIK L. Adoptively transferred allergen-specific T cells cause maternal transmission of asthma risk. **Am J Pathol**. 168(6):1931-1939. 2006.

JANEWAY JR, CHARLES A, TRAVERS P, WALPORT M. **Imunobiologia - O Sistema Imune na Saúde e na Doença**. 6ª Edição, 2007.

JARRETT EE, HALL E. IgE suppression by maternal IgG. **Immunology**. 48(1):49-58, 1983.

JENMALM MC, BJORKSTEN B. Cord blood levels of immunoglobulin G subclass antibodies to food and inhalant allergens in relation to maternal atopy and the development of atopic disease during the first 8 years of life. **Clin Exp Allergy**. 30(1):34-40, 2000.

JERNE NK. Clonal selection in a lymphocyte network. **Soc Gen Physiol Ser**. 29:39-48, 1974.

JERNE NK. Idiotypic networks and other preconceived ideas. **Immunol Rev**. 79:5-24, 1984.

JONES EA, WALDMANN TA. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. **J Clin Invest**. 51(11):2916-27, 1972.

KATZ HR. Inhibitory receptors and allergy. **Curr Opin Immunol**. 14(6):698-704, 2002.

KELM S, PELZ A, SCHAUER R, FILBIN MT, TANG S, DE BELLARD ME, SCHNAAR RL, MAHONEY JA, HARTNELL A, BRADFIELD P, et al. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. **Curr Biol**. 4(11):965-72, 1994.

KRIEG AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annu Rev Immunol**. 20:709-60, 2002.

LEMKE H, LANGE H. Generalization of single immunological experiences by idiotypically mediated clonal connections. **Adv Immunol**. 80:203-241, 2002.

LI L, LEE H, BELL JJ, GREGG RK, ELLIS JS, GESSNER A, ZAGHOUBANI H. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. **Immunity**. 20:429-440, 2004.

LIMA C, SOUZA VM, FAQUIM-MAURO EL, HOSHIDA MS, BEVILACQUA E, MACEDO MS, TAVARES-DE-LIMA W, VARGAFTIG BB. Modulation of the induction of lung and airway allergy in the offspring of IFN-gamma-treated mother mice. **J Immunol**. 175(6):3554-3559, 2005.

MALANCHERE E, HUETZ F, COUTINHO A. Maternal IgG stimulates B lineage cell development in the progeny. **Eur J Immunol.** 27:788-793, 1997.

MARSHALL-CLARKE S, REEN D, TASKER L, HASSAN J. Neonatal immunity: How well has it grown up? **Immunol. Today.** 21:35-41, 2000.

MATSON AP, ZHU L, LINGENHELD EG, SCHRAMM CM, CLARK RB, SELANDER DM, THRALL RS, BREEN E, PUDDINGTON L. Maternal transmission of resistance to development of allergic airway disease. **J Immunol.** 179(2):1282-91, 2007.

MOSSMAN TR, COFFMAN RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.** 7: 145-73, 1989.

MOTA I, WONG D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. **Life Science.** 8: 813-20, 1969.

MUTA T, KUROSAKI T, MISULOVIN Z, SANCHEZ M, NUSSENZWEIG MC, RAVETCH JV. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. **Nature.** 1994 May 26;369(6478):340.

NITSCHKE L, TSUBATA T. Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. **Trends Immunol.** 10:543-50, 2004.

OLIVEIRA CR, TANIGUCHI EAF, FUSARO AE, VICTOR JR, BRITO CA, DUARTE AJS, SATO MN. Bystander effect in synergy to anergy in oral tolerance of *Blomia tropicalis*/Ovalbumin murine co-immunization model. **J. Clin. Immunol.** 25(2), 2005.

OSTOJIC S, DUBANCHET S, CHAOUAT G, ABDELKARIM M, TRUYENS C, CAPRON F. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. **Am J Reprod Immunol.** 49(2):101-12, 2003.

PEDEN DB. Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. **Environ. Health Perspect.** 108(3):475-82, 2000.

POWELL LD, JAIN RK, MATTA KL, SABESAN S, VARKI A. Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22. Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding. **J Biol Chem.** 270(13):7523-32, 1995.

ROMAGNANI S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Mol. Immunol.** 38(12-13):881-5, 2002.

RUSSO M, NAHORI MA, LEFORT J, GOMES E, DE CASTRO KELLER A, RODRIGUEZ D, RIBEIRO OG, ADRIOUCH S, GALLOIS V, DE FARIA AM, VARGAFTIG BB. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 24(5):518-526, 2001.

SARTORI A, MA X, GRI G, SHOWE L, BENJAMIN D, TRINCHIERI G. Interleukin-12: an immunoregulatory cytokine produced by B cells and antigen-presenting cells. **Methods.** 11(1):116-27, 1997.

SEEGER M, THIERSE HJ, LANGE H, SHAW L, HANSEN H, LEMKE H. Antigen-independent suppression of the IgE immune response to bee venom phospholipase A2 by maternally derived monoclonal IgG antibodies. **Eur J Immunol.** 28(7):2124-30, 1998.

SIEGRIST CA, BARRIOS C, MARTINEZ X, BRANDT C, BERNEY M, CORDOVA M, KOVARIK J, LAMBERT PH. Influence of maternal antibodies on vaccine responses: inhibition of antibody but not T cell responses allows successful early prime-boost strategies in mice. **Eur J Immunol.** 1998 Dec;28(12):4138-48.

SIEGRIST CA. Neonatal and early life vaccinology. **Vaccine.** 19(25-26):3331-46, 2001.

SIMISTER NE, REES AR. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. **Eur J Immunol.** 15: 733-738, 1985.

SIMISTER NE. Placental transport of IgG. **Vaccine.** 21:3365-3369, 2003.

SINGH N, CHANDLER PR, SEKI Y, BABAN B, TAKEZAKI M, KAHLER DJ, MUNN DH, LARSEN CP, MELLOR AL, IWASHIMA M. Role of CD28 in fatal autoimmune disorder in scurfy mice. **Blood.** 26. 2007.

SOHN HW, TOLAR P, PIERCE SK. Membrane heterogeneities in the formation of B cell receptor-Lyn kinase microclusters and the immune synapse. **J Cell Biol.** 182(2):367-79, 2008.

VAKIL M, SAUTER H, PAIGE C, KEARNEY JF. In vivo suppression of perinatal multispecific B cells results in a distortion of the adult B cell repertoire. **Eur J Immunol.** 16(9):1159-65, 1986.

VANCE GH, GRIMSHAW KE, BRIGGS R, LEWIS SA, MULLEE MA, THORNTON CA, WARNER JO. Serum ovalbumin-specific immunoglobulin G responses during pregnancy reflect maternal intake of dietary egg and relate to the development of allergy in early infancy. **Clin Exp Allergy.** 34(12):1855-1861, 2004.

VEKEMANS J, AMEDEI A, OTA MO, D'ELIOS MM, GOETGHEBUER T, ISMAILI J, NEWPORT MJ, DEL PRETE G, GOLDMAN M, MCADAM KP, MARCHANT A. Neonatal bacillus Calmette-Guérin vaccination induces adult-like IFN-gamma production by CD4+ T lymphocytes. **Eur J Immunol.** 31(5):1531-1535, 2001.

VERHASSELT V, MILCENT V, CAZARETH J, KANDA A, FLEURY S, DOMBROWICZ D, GLAICHENHAUS N, JULIA V. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. **Nat Med.** 2:170-5, 2008.

VICTOR JR, FUSARO AE, DUARTE AJS, SATO MN. Preconceptional maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring. **J. Allergy. Clin. Immunol.** 111:269-77, 2003.

VON MUTIUS E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. **J. Allergy. Clin. Immunol.** 109:525-32, 2002.

WEGMANN TG, LIN H, GUILBERT L, MOSMANN TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol. Today.** 14(7):353-6, 1993.

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

WERNERSSON S, KARLSSON MC, DAHLSTRÖM J, MATTSSON R, VERBEEK JS, HEYMAN B. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice. **J Immunol.** 163(2):618-22, 1999.

WILCZYNSKI JR, RADWAN M, KALINKA J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. **Front Biosci.** 13:2266-74, 2008.

WU K, BI Y, SUN K, WANG C. IL-10 producing type 1 regulatory T cells and allergy. **Cell Mol Immunol.** 4:269-275, 2007.

WYANT TL, FISHER MT, MCKALLIP RJ, NAGARKATTI PS, NAGARKATTIM, Conrad DH. Mouse B cell activation is inhibited by CD44 cross-linking. **Immunol Invest.** 34(4):399-416, 2005.

XIANG Z, CUTLER AJ, BROWNLIE RJ, FAIRFAX K, LAWLOR KE, SEVERINSON E, WALKER EU, MANZ RA, TARLINTON DM, SMITH KGC. FcgammaRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. **Nat Immunol.** 8:419-429, 2007.

YI AK, KRIEG AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. **J Immunol.** 161(9):4493-7, 1998.

# 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](#)