PATRÍCIA MACCHIAVERNI

**Caracterização quantitativa e funcional da transferência
de anticorpos anti-*Dermatophagoides pteronyssinus* via
placenta e colostro materno**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Imunologia.

SÃO PAULO

2008

PATRÍCIA MACCHIAVERNI

Caracterização quantitativa e funcional da transferência de anticorpos anti-*Dermatophagoides pteronyssinus* via placenta e colostro materno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Área de Concentração: Saúde Materno-infantil

Orientador: Prof. Dr. Antônio Condino Neto

SÃO PAULO

2008

Dedicatória

Aos meus pais, Nelson e Luzita, que sempre foram modelo de dedicação à profissão, de justiça e honestidade. Obrigada por todo amor dedicado à família, pelo apoio, compreensão e incentivo constante para realização dos meus sonhos.

*Ao meu filho Pedro, pelo amor, sorrisos
e abraços, que me abastecem para
prosseguir caminhando. Obrigada por
não permitir minha ausência.
Te amo pipoquinha!!!*

*Ao meu querido namorado Walter,
maravilhoso companheiro de todas as
horas a mais de uma década, pelo amor
e compreensão dedicados a mim. Pela
presença constante, compartilhando
com paciência e conforto o final desta
etapa importante em minha vida.*

*Aos meus queridos irmãos Nelson,
Luciana e Juliana, que me ajudaram e
apoiaram cada um a seu modo,
permitindo que eu fosse atrás dos
meus sonhos e concretizasse meus
objetivos.*

Agradecimentos

Ao professor Antônio Condino Neto, pela dedicação ao ensino e pesquisa, por acreditar em mim e pela oportunidade da execução desta tese.

À Carolina Prando, por me apresentar a Imunologia de uma maneira encantadora. Mesmo distante, a amizade estará sempre ao meu lado.

À Christina Kubo Arslanian, por sua infinita paciência, atenção, orientações e incansável disposição em colaborar na realização dos testes de ELISA.

À Patrícia Palmeira e Dora Lisa Friedländer Del Nero, pelas opiniões valiosas e construtivas e pelo interesse em me ajudar.

À Maternidade de Campinas por permitir a coleta de colostro e sangue das doadoras.

Às mães que prontamente se dispuseram a doar seu sangue e colostro.

Aos médicos, residentes e enfermeiras da obstetrícia da Maternidade de Campinas, pelo auxílio na coleta e triagem das voluntárias.

À Rosana, pela colaboração na análise estatística.

Ao Dr João Carlos Mori IPI-ASAC Brasil que forneceu o extrato de açúcar para realização dos testes.

À Silvana, aos funcionários da secretaria do Departamento de Imunologia: Jotelma, Eni e Amarildo e do CIPED: Milton e Simone, pelo desempenho e dedicação em todos os momentos em que precisei.

Às professoras Dra Maria Sato, Dra Solange Carbonari e Dra Sônia Jancar, por examinarem este trabalho e pelas valiosas sugestões que fizeram no exame de qualificação.

Aos colegas e professores do programa de pós-graduação em Imunologia, essenciais em minha formação como pesquisadora. De todos levarei exemplos para minha vida, seja de como agir ou como nunca fazer.

Aos amigos pós-graduandos: Julieta, Thais, Érica, Rafael, Juciane, Débora, Layra, Andréia, Daniel, Tatiana, Natália, Carolina, Stefaniee, Ana, Elaine, Camila, Rosana, Soraya, Marília, Walmir, Otávio, Carolina (Caru) Paulo, Ângela e Paulo-Gabriel (a caminho!), pelos dias compartilhados (sempre muito divertidos) dentro e fora do laboratório!

Aos amigos de hoje e sempre: Edgar, Josias, Juliana, Daniela e Mateo, pelo apoio, auxílio, incentivo e amizade construída. Cujas companhias pude contar da mesma forma nos momentos de dificuldade e me confortar nos momentos de desespero...
- *Acalma-te!!!*

À Jussara pela prontidão e em resolver os “pepinos” inevitáveis do laboratório.

À Silvana pela eficiência e descontração na coleta das amostras de sangue e colostro.

À FAPESP, pela Bolsa de Mestrado e Auxílio concedido a este trabalho (processo nº 05/57593-7).

E, de forma sincera, a todos aqui não citados, mas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Tenho aprendido...

*Que se aprende errando;
Que crescer não significa fazer aniversário;
Que o silêncio, às vezes, é a melhor resposta;
Que trabalhar significa não só ganhar dinheiro;
Que dinheiro não compra classe;
Que amigos a gente conquista mostrando o que somos;
Que os verdadeiros amigos sempre ficam até o fim;
Que a maldade se esconde atrás de uma bela face;
Que quando penso saber tudo ainda não aprendi nada;
Que a natureza é a coisa mais bela da vida;
Que amar significa se dar por inteiro;
Que ninguém é perfeito, até que você se apaixone por esta pessoa;
Que um só dia pode ser muito importante que muitos anos;
Que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;
Que ouvir uma palavra de carinho faz bem à saúde;
Que dar carinho também faz;
Que ser gentil é mais importante que estar sempre certo;
Que sonhar é preciso;
Que se deve ser criança a vida toda;
Que não importa a seriedade que a vida exija de você, precisamos de um amigo
brincalhão;
Que o julgamento alheio não é importante;
Nem sempre posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;
Que se precisa morrer para aprender a viver;
Quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer;*

E, finalmente, tenho aprendido que...

*Todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorrem
quando você está escalando-a.*

(adaptado de William Shakespeare)

Resumo

Macchiaverni P. Caracterização quantitativa e funcional da transferência de anticorpos anti-*Dermatophagoides pteronyssinus* via placenta e colostro materno [Dissertação Mestrado em Imunologia]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo; 2008.

Sabemos a incidência de doenças alérgicas vem crescendo rapidamente nas ultimas décadas e atualmente afetam milhares de crianças no mundo inteiro. Por esta razão, é de grande interesse que estratégias eficazes de prevenção da atopia sejam aplicadas logo nos primeiros anos de vida ou mesmo antes do nascimento. Existem fortes evidências de que a supressão da hipersensibilidade nos recém nascidos pode ser mediada pela transferência de anticorpos maternos, dependendo de sua concentração e especificidade, no entanto carece estudos sobre a eficácia em humanos. Realizamos este estudo a fim de caracterizar qualitativa e quantitativamente a transmissão de anticorpos direcionados ao principal alérgeno da poeira domiciliar (*Dermatophagoides pteronyssinus*; *Der p*), via passagem transplacentária e aleitamento materno, assim como investigar o efeito da sensibilização materna ao *Der p* na transferência passiva destes anticorpos. Para tais objetivos, quantificamos por ELISA, IgG anti-*Der p* em amostras pareadas de sangue materno e cordão umbilical e S-IgA anti-*Der p* no colostro de puérperas sensibilizadas (n=13) e não sensibilizadas (n=26), e analisamos a atividade funcional dos mesmos anticorpos por ensaio de avidéz. Determinou-se a sensibilidade no soro materno, através de RAST específico (Cap System® Pharmacia). Demonstramos pela primeira vez que S-IgA anti-*Der p* pode ser transferida ao lactente em concentrações bastante variáveis e com alto índice de avidéz, independente da sensibilização materna ao mesmo ácaro. Acreditamos assim, que a amamentação é importante, pois fornece S-IgA com potencial para neutralizar de maneira específica e impedir a entrada do *Der p* através da mucosa, tanto em lactentes de mães RAST+ como de mães RAST-. Demonstramos também que o nível de IgG total e específica ao *Der p* é mais elevado em recém nascidos de mães sensibilizadas ao mesmo ácaro quando comparado aos de mães não sensibilizadas, indicando que a sensibilização materna pode influenciar a resposta imune fetal. Já a avidéz específica da IgG anti-*Der p* foi muito semelhante entre as amostras pareadas de cordão umbilical e soro materno, assim como em amostras do grupo estudo e grupo controle, sugerindo que não há seleção quanto à avidéz destes anticorpos durante a passagem transplacentária. Uma vez que a transferência de anticorpos maternos representa importante mecanismo para imunomodulação das respostas alérgicas, ansiamos que o melhor entendimento da influência da sensibilização materna na transferência passiva de anticorpos específicos ao bebê contribua com os avanços na elaboração de estratégias adequadas de prevenção da sensibilização alérgica logo no início da vida.

Palavras-chave: Ácaro; Colostro; Hipersensibilidade; Imunoglobulinas; Gravidez.

Abstract

Macchiaverni P. Quantitative and functional characterization of antibodies anti-*Dermatophagoides pteronyssinus* transference through placenta and maternal colostrum [Master thesis Immunology]. São Paulo: Biomedical Science Institute, University of São Paulo; 2008.

It is known that the incidence of allergic disease has been rising very fast in the last decade and nowadays affects thousands of children worldwide. For this reason, it is of great interest that efficient strategies of prevention of atopy should be applied in the first years of life or even before birth. There are strong evidences that the suppression of hypersensitivity in newborn can be mediated by the transference of maternal antibodies, depending on their concentration and specificity, however still little is known about the mechanisms involving, in special in humans. We made this study aiming to characterize qualitatively and quantitatively the antibodies transmission directed to the main home dust allergen (*Dermatophagoides pteronyssinus*; *Der p*) through placental transference and maternal breastfeeding as well as to investigate the maternal sensitizing effect against to *Der p* in passive transference of these antibodies. For those objectives, we quantified by ELISA, IgG anti-*Der p* in paired samples of maternal blood and umbilical cord and anti-*Der p* S-IgA in colostrums of sensitized mother (n=13) and not sensitized (n=26); and we analyzed the functional activity of the same antibodies by avidity assays. The sensibility was determined in maternal sera by specific RAST (Cap System® Pharmacia). We show by the first time that anti-*Der p* S-IgA is transferred to the infant in very variable concentrations and with high levels of avidity, but is not dependent of maternal sensitization. We believe that breastfeeding is important, because it supplies S-IgA with the capacity to neutralize in a specific manner and block the entrance of *Der p* through mucosa, in infant of RAST+ mothers as well as of RAST-. We also demonstrate that total and specific to *Der p* IgG levels are more elevated in newborns of sensitized mothers when compared to those of control mothers and non-sensitized indicating that the maternal sensitizing can influence the fetal immune response. In the other hand, the specific avidity of anti-*Der p* IgG was very similar between paired samples of umbilical cord and maternal sera, as well as in samples of study group and control group, suggesting that the avidity index of IgG does not influence on placental transfer of specific antibodies. Once that the maternal antibody transference represent a important mechanism for immunomodulation of allergic response, we expect that a better understanding of the influence of maternal sensitivity on passive transfer of specific antibodies to babies will contribute with advances in the elaboration of adequate strategies of prevention of allergic sensitivity with more efficient therapeutic results.

Key words: Mite; Colostrum; Hypersensitivity; Immunoglobulin; Pregnancy.

Lista de Ilustrações

Figura 1.	Mecanismos da alergia.....	21
Figura 2.	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> macho e fêmea	22
Figura 3.	Passagem transplacentária de IgG.....	26
Figura 4.	Estímulos envolvidos no desenvolvimento da imunossupressão da IgE no início da vida	30
Figura 5.	Circulação enteromamária de linfócitos.....	33
Figura 6.	Algoritmo da seleção e análise das amostras.....	42
Figura 7.	Esquema da placa utilizada no ensaio de ELISA para determinação dos índices de avides.....	50
Figura 8.	Mães com RAST+ (score ≥ 3) apresentaram concentração de IgE sérica significativamente mais elevada que às de RAST- (score 0). Kruskal-Wallis, $p=0,003$; Mann Whitney, $*p=0,0008$	53
Figura 9.	Recém nascidos apresentaram maior concentração de IgG total quando comparados à suas respectivas mães (n=74). Mann Whitney $*p<0,0001$	55
Figura 10.	Recém nascidos apresentaram níveis de IgG anti- <i>Der p</i> fortemente correlacionados aos de suas respectivas mães. (n=74). Spearman $r = 0,92$; $*P<0,0001$	55
Figura 11.	Recém nascidos apresentaram níveis de IgG anti- <i>Der p</i> estatisticamente semelhantes aos de suas respectivas mães. (n=74). Mann Whitney $p>0,05$	56
Figura 12.	Nível de S-IgA anti- <i>Der p</i> apresentou correlação com o nível de S-IgA total, ambas quantificadas no colostro. (n=71). Spearman $r = 0,8$; $*P<0,0001$	57
Figura 13.	A IgG dos recém nascidos apresentou índice de avides específico ao <i>Der p</i> fortemente correlacionado ao de suas respectivas mães (n=74). Spearman $r=0,91$; $*p<0,0001$	58
Figura 14.	A IgG dos recém nascidos apresentou índice de avides específico ao <i>Der p</i> estatisticamente igual ao de suas respectivas mães (n=74). Mann Whitney, $p>0,05$	59

Figura 15.	A S-IgA de colostro (n=71) apresentou índice de avidéz específico ao <i>Der p</i> maior que o da IgG materna (n=74) e maior que o índice da IgG do recém nascido (n=74). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo. Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$; Mann Whitney, $*p = 0,0006$ e $*p < 0,001$	60
Figura 16.	O nível de IgG sérica encontrado em mães do grupo estudo (n=13) foi estatisticamente igual ao do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo (Mann Whitney $p > 0,05$	61
Figura 17.	O nível de IgG total foi mais elevado em recém nascidos do grupo estudo (n=13) quando comparado aos do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo (Mann Whitney $p = 0,006$	63
Figura 18.	O nível de IgG anti- <i>Der p</i> foi mais elevado em mães do grupo estudo (n=13) quando comparado às do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo (Mann Whitney, $*p = 0,04$	63
Figura 19.	O nível de IgG anti- <i>Der p</i> foi mais elevado em recém nascidos do grupo estudo (n=13) quando comparado aos do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo (Mann Whitney, $*p = 0,03$).	64
Figura 20.	O nível de S-IgA total (A) e anti <i>Der-p</i> (B), ambas de colostro, foi estatisticamente igual entre puérperas do grupo estudo (n=13) e do grupo controle (n=23). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo. Mann Whitney, $p > 0,05$	66
Figura 21.	A S-IgA de puérperas do grupo estudo (n=13) apresentou índice de avidéz específico ao <i>Der p</i> estatisticamente igual ao do grupo controle (n=23). A barra horizontal indica o valor médio obtido por cada grupo. Teste T, $p > 0,05$	67
Figura 22.	A IgG sérica de puérperas do grupo estudo (n=13) apresentou índice de avidéz específico ao <i>Der p</i> estatisticamente igual ao do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica o valor médio obtido por cada grupo. Teste T, $p > 0,05$	67
Figura 23.	A IgG de recém nascidos do grupo estudo (n=13) apresentou índice de avidéz específico ao <i>Der p</i> estatisticamente igual ao do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica o valor médio obtido por cada grupo. Teste T, $p > 0,05$	68

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Alérgenos do <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	23
Tabela 2.	Classificação das concentrações de IgE anti- <i>Der p</i> segundo CapSystem® Pharmacia.....	45
Tabela 3.	Valores do anticorpo IgE total e anti- <i>Der p</i> no soro materno.....	54
Tabela 4.	Valores dos anticorpos IgG e IgA, total e anti- <i>Der p</i>	57
Tabela 5.	Valores dos índices de avidéz da IgG anti- <i>Der p</i> em amostras pareadas de soro materno e cordão umbilical e da S-IgA anti <i>Der p</i> no colostro..	60
Tabela 6.	Taxa de passagem transplacentária de IgG total no grupo estudo e grupo controle.....	62
Tabela 7.	Valores dos anticorpos IgG, total e anti- <i>Der p</i>	64
Tabela 8.	Taxa da passagem transplacentária de IgG anti <i>Der p</i> no grupo estudo e grupo controle.....	65
Tabela 9.	Valores dos anticorpos S-IgA, total e anti- <i>Der p</i>	66
Tabela 10.	Valores dos índices de avidéz da IgA de colostro e IgG de amostras pareadas de soro materno e cordão umbilical.....	68

Lista de abreviaturas e siglas

APCs	Células apresentadoras de antígeno
Amb 1	Alérgeno grupo 1 do pólen da herbácea <i>Ambrosia artemisiifolia</i>
<i>Bl t</i>	<i>Blomia tropicallis</i>
Bet v 1	Alérgeno grupo 1 do pólen da árvore <i>Betula verrucosa</i> .
CD (ex.21)	Grupo (cluster) de diferenciação
CD45RO+	Isoforma do CD45 que não contém os éxons A,B e C.
<i>Der f 1</i>	Alérgeno 1 do ácaro <i>Dermatophagoides farinae</i>
<i>Der p</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
<i>Der p 1</i>	Alérgeno 1 do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FcεRI	Receptor I para porção Fc da imunoglobulina E
FcγRIIb	Receptor II tipo b para porção Fc da imunoglobulina G
FcRn	Receptor do recém-nascido para porção Fc
<i>Fel d 1</i>	Alérgeno 1 do pelo de gato
GATA3	Proteína 3 ligante da seqüência: guanina adenina, timina e adenina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
BSA	Albumina de soro bovino
Ig (ex.A)	Imunoglobulina A
OVA	Albumina da clara do ovo
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
IL (ex.3)	Interleucina 3
IFN-γ	Interferon-gama
KU/l	Kilounidades por litro
MHC II	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal tipo II
KSCN	Tiocianato de potássio
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
OVA	Ovalbumina
p24	Proteína de 24kD

pIgR	Receptor de imunoglobulina polimérica
<i>rBet v 1</i>	Recombinante do alérgeno 1 do pólen da árvore <i>Betula verrucosa</i> .
RN	Recém nascido
SC	Componente secretor
SIgA	Imunoglobulina A secretória
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento tumoral-beta
T _H 2	Linfócitos T tipo 2
T _H 17	Linfócitos T tipo 17
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
T reg	Linfócitos T regulatórios
UA	Unidade arbitrária
UI	Unidade internacional (1 UI=2,42ng)

Sumário

1 Introdução	19
1.1 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE E ALÉRGENOS AMBIENTAIS	20
1.2 INFLUÊNCIAS DA GESTAÇÃO NA SENSIBILIZAÇÃO DA CRIANÇA.....	25
1.3 INFLUÊNCIA DA AMAMENTAÇÃO NA SENSIBILIZAÇÃO DA CRIANÇA.....	32
1.4 PAPEL “ATIVO” DOS ANTICORPOS MATERNS NO DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA IMUNE DA CRIANÇA.....	35
2 Objetivos.....	38
3 Casuística e métodos.....	40
3.1 SELEÇÃO DAS PUÉRPERAS	40
3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE MATERNO, SANGUE DE CORDÃO E COLOSTRO.....	43
3.3 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE COLOSTRO	43
3.4 OBTENÇÃO DO SORO DE SANGUE PERIFÉRICO E DE CORDÃO UMBILICAL.....	44
3.5 RAST ESPECÍFICO PARA O ÁCARO <i>DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS</i> (CAPSYSTEM® PHARMACIA)	44
3.6 DOSAGEM DE IgE SÉRICA TOTAL	45
3.7 DOSAGEM DE IgG SÉRICA TOTAL.....	46
3.8 DOSAGEM DE IgA TOTAL NO COLOSTRO	46
3.9 DETECÇÃO DE IgG SÉRICA E IgA DO COLOSTRO ESPECÍFICOS PARA O <i>D. PTERONYSSINUS</i> POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	47

a) IgG anti- <i>D. pteronyssinus</i>	48
b) IgA anti- <i>D. pteronyssinus</i>	49
3.10 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE AVIDEZ DE ANTICORPOS IgA E IgG ANTI- <i>D. PTERONYSSINUS</i> POR ELISA	49
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 Resultados	53
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	53
4.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO <i>DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS</i>	54
4.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO <i>DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS</i>	58
4.4 NÍVEIS DE ANTICORPOS TRANSFERIDOS PASSIVAMENTE POR MÃES RAST+ PARA <i>DER P</i> (GRUPO ESTUDO) E MÃES RAST- PARA <i>DER P</i> (GRUPO CONTROLE).....	61
5 Discussão	70
6 Conclusão	83
Referências	84
Anexos	98

1 *Introdução*

O primeiro relato de doenças alérgicas aparece no início do século 19 e refere-se à febre do feno. A doença acometia moradores da região urbana, mas não os trabalhadores rurais que eram expostos a altas doses deste alérgeno no campo (Holt et al., 2005).

As alergias são altamente específicas a cada paciente e dependentes do órgão onde se manifestam. Podem se apresentar como asma, rinoconjuntivite, sinusite, alergia alimentar, dermatite atópica, urticária, anafilaxia e alergia a insetos e drogas; todas podendo ocorrer de forma individual ou em combinação. Embora algumas sejam desencadeadas na ausência de atopia (predisposição genética para produzir IgE sérica), grande parte dos pacientes que sofrem de alergias são atópicos (Holgate et al., 2008).

A prevalência da sensibilização à alérgenos ambientais começou a crescer paulatinamente na década de 70, juntamente com o desenvolvimento sócio econômico. Atualmente, 25 a 30% da população geral e 10% da população infantil sofrem de doenças alérgicas como asma e rinite (Weiss et al., 1994; Holt et al., 2005). Nas últimas décadas, segundo dados obtidos pelo estudo ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) que avaliou adolescentes entre 13-14 anos em 56 países (n=463.801) e crianças entre 6-7 anos em 38 países (n=257.800), foi registrado modesto aumento na prevalência de rinoconjuntivite no mundo inteiro, no entanto com grande variação entre os países (Krause et al., 2002; Pearce et al., 2007). O maior aumento registrado no período de um ano nos adolescentes entre 13-14 anos foi na Argentina (60%- 65%), Paraguai (67%), França (58%) e Brasil (55%), e as mais baixas em centros da Etiópia (3%), Índia (3–9%) e países que pertenceram à união Soviética (9%- 10%) (Björkstén et al., 2008). O recente aumento nos níveis de rinoconjuntivite no Brasil é ilustrado no estudo de Solé e colaboradores (2007) que registraram, no período de 2006 a 2007, um aumento de 10,3% para 17,4% em crianças de 6-7 anos e de 8.9% para 28.5% entre adolescentes de 13-14 anos, sendo maior entre aqueles da região urbana.

1.1 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE E ALÉRGENOS AMBIENTAIS

A reação de hipersensibilidade a aero-alérgenos inicia-se após inalação e entrada do alérgeno através da membrana da mucosa respiratória (Schwarze et al., 1998). Este será capturado por células dendríticas, que atuarão como apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), apresentando peptídeos selecionados na molécula de MHC II aos linfócitos T naive no linfonodo. A apresentação dos alérgenos direciona a diferenciação dos linfócitos T para subtipo T helper 2 (T_H2), caracterizado por secretar as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9, mediado pelo fator de transcrição GATA3 (Comoy et al., 1998; Georas et al., 2005). A IL-5 atua nos eosinófilos elevando seu número e promovendo sua ativação, a IL-9 no recrutamento de mastócitos e a IL-4 e IL-13 desempenham papel crucial na mudança de classe para IgE nos linfócitos B (Holgate et al., 2008).

Quando um indivíduo atópico, sensibilizado a um alérgeno em particular o reencontra, a ligação cruzada do antígeno a duas moléculas de IgE ligadas ao receptor de alta afinidade ($Fc\epsilon RI$) na membrana dos mastócitos desencadeia sua ativação. A ativação dos mastócitos mediada pela IgE tem como consequência a degranulação e síntese de mediadores inflamatórios poucos minutos após o contato com o alérgeno. Entre os mediadores temos a histamina, leucotrienos e citocinas. Estes promovem a permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e produção de muco. A exposição repetida a aero-alérgenos estimula a liberação de quimiocinas por mastócitos e outros tipos celulares, responsáveis por uma importante cascata inflamatória caracterizada por grande número de eosinófilos, basófilos e linfócitos T_H2 na mucosa nasal, brônquica e tecidos marginais (Bochner et al., 2005; Gould et al., 2008). (Figura 1).

FIGURA 1: Mecanismos da alergia. Em indivíduos atópicos, a exposição inicial de APCs aos alérgenos desencadeia preferencialmente ativação de linfócitos T_H2 e síntese de IgE; conhecida como sensibilização alérgica. Em indivíduos já sensibilizados, a exposição secundária ao alérgeno leva ao recrutamento de células inflamatórias, ativação e liberação de mediadores solúveis. Estes incluem: histamina, leucotrienos e citocinas, que promovem permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e produção de muco. Citocinas liberadas por mastócitos e outros tipos celulares direcionam o recrutamento de células inflamatórias que contribuem para fase tardia da resposta alérgica; caracterizada por influxo de eosinófilos e células T_H2 . Eosinófilos liberam grande número de mediadores e citocinas pro - inflamatórias como interleucina 3 (IL-13), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 3 (IL-3). Células T regulatórias (T_{reg}) é outro importante subtipo de células $CD4^+$ responsáveis por suprimir a resposta de células T_H2 envolvendo a citocina inibitória IL-10 e fator de crescimento tumoral beta ($TGF-\beta$). T_H17 , outro subtipo de linfócito $CD4^+$ recentemente identificado e conhecido por secretar IL-17, parece estar associado especificamente com eventos inflamatórios do neutrófilo que ocorrem durante a exacerbação da resposta imune e no remodelamento tecidual. $Fc\epsilon RI$, receptor de alta afinidade para IgE; TCR, receptor de célula T; cell, célula.

FONTE: Holgate et al., 2008.

Está claro que uma variedade de mudanças socioeconômicas e ambientais em curso, algumas de maneira acelerada, têm o potencial de influenciar a suscetibilidade à alergia. Estudos mostram que a rinite alérgica, asma brônquica e dermatite atópica são as alergias mais características de atopia (Weiss et al., 1994) e os principais agentes

ambientais responsáveis por tais manifestações são os presentes na poeira domiciliar (Platts-Mills et al., 1992; Schwarze et al., 1998). Embora componentes orgânicos de diversas origens, tais como esporos de fungos, polens, fibras vegetais, bactérias, restos de alimentos e células epiteliais humanas sejam característicos da poeira, aqueles derivados de artrópodes (ácaros e baratas) representam os principais fatores etiológicos da alergia (Bronswijk et al., 1981; Chew et al., 1999; Arruda et al., 2001; Holt et al., 2005).

A identificação de ácaros do gênero *Dermatophagoides*, mais conhecidos como ácaros da poeira domiciliar, foi resultado de estudos de médicos e biólogos durante o período que antecedeu a Segunda Guerra Mundial. O primeiro documento os relacionando às alergias respiratórias foi publicado em 1967 e no ano seguinte, o pesquisador Reindert Voorhorst concluiu que a espécie *D. pteronyssinus* (*Der p*) era a principal fonte de alérgeno presente na poeira domiciliar (Spieksma et al., 2004).

FIGURA 2: *Dermatophagoides pteronyssinus* macho (esquerda) e fêmea (direita).
Tamanho do corpo $\approx 320\mu\text{m}$.

FONTE: Spieksma et al., 2004.

Estudos epidemiológicos claramente indicam que o *Der p* pode ser identificado no mundo todo (Fernández-Caldas et al., 1993; Montealegre et al., 1997; Rizzo et al., 1997; Serravalle et al., 1999; Nadchatram et al., 2005) e aproximadamente 5 a 10% da

população em geral está sensibilizada a este ácaro (Tovey et al., 1981; Henszel et al., 2006).

No Brasil, Arruda e colaboradores (1991) observaram que o *Der p* representa 50% dos alérgenos presentes na poeira domiciliar dos moradores da cidade de São Paulo-SP e Rizzo et al. (1993), encontraram níveis maiores que 10µg *Der p* 1/g de poeira em 90% das casas de crianças asmáticas. Em Salvador, Recife e Rio de Janeiro, o mesmo ácaro representa a maior frequência de testes cutâneos positivos, sendo principal indutor da sensibilização alérgica (Sarinho et al., 1996; Geller et al., 1996; Medeiros et al., 1997).

TABELA 1: Alérgenos do *Dermatophagoides pteronyssinus*

Grupo	Função bioquímica	Peso Molecular	Ligação a IgE*
1	Cisteína protease	25,000	80-100
2	Desconhecido	14,000	80-100
3	Tripsina	25,000 (30,000)	16-100
4	α- amilase	57,000	40-46
5	Desconhecido	15,000	50-70
6	Quimotripsina	25,000	40
7	Desconhecido	25,000 (31,000, 29,000, 26,000)	50
8	Glutathione S-Transferase	26,000	40
9	Serina Protease	30,000	90
	Colagenolítica		
10	Tropomiosina	37,000	50-95

*Frequência de ligação (% de pacientes)

FONTE: Adaptado de Thomas et al., 2002.

O principal alérgeno presente nas fezes do ácaro (*Der p* 1) é uma enzima proteolítica homóloga a papaína (Chelw et al., 1999), capaz de clivar a ocludina, proteína que compõe as junções compactas localizadas entre as células epiteliais das vias aéreas. Diante da quebra desta integridade, o alérgeno aumenta a permeabilidade brônquica, entra facilmente em contato com as APCs profissionais sendo apresentado aos linfócitos T (LT) (Wan et al., 1999).

O *Der p 1* também é capaz de clivar o CD40 (molécula co-estimulatória na superfície das células dendríticas) e o CD25 (subunidade α do receptor para IL-2 na superfície do LT), envolvidas na regulação do balanço entre IL-10 e IL-12 e portanto, na polarização dos linfócitos T_H2 (Schultz et al., 1998). Outra propriedade enzimática é a clivagem do CD23 (receptor Fc ϵ RII de baixa afinidade para IgE). O CD23 tem papel central na regulação da síntese de IgE. Em sua forma solúvel, apresenta sítio de ligação para o receptor de membrana CD21 estimulando a síntese de IgE, mas quando junto à membrana, inibe a síntese após ligar-se diretamente ao alérgeno (Gould et al., 2008).

Em pacientes asmáticos, a proporção aumentada de eosinófilos em relação aos neutrófilos no fluido bronco-alveolar está envolvida na obstrução brônquica característica da asma (Tanizaki et al., 1992). A importância do *Der p* nestes pacientes foi demonstrada em modelo murino de inflamação aérea, onde a sensibilização com *Der p* levou essencialmente o influxo de eosinófilos para o pulmão na fase tardia da inflamação, diferente da sensibilização com o ácaro *Blomia tropicalis*, onde o recrutamento de neutrófilos foi maior (Carvalho et al., 2004).

Desde a primeira descrição como “reagina” em 1922 e posterior caracterização como IgE em 1968 (Stanworth, 1993), muitos avanços contribuíram para a compreensão dos mecanismos imunológicos responsáveis pelas reações de hipersensibilidade, no entanto pouco se sabe sobre os mecanismos imunes que regulam sua expressão. Frente a essa situação, há necessidade e crescente interesse em identificar eventos que predisõem às reações alérgicas logo no início da infância e assim desenvolver estratégias eficazes de prevenção.

Assim como em outras doenças, está claro que a manifestação alérgica é resultado da complexa interação entre predisposição genética e influências ambientais. Inevitavelmente os pais têm papel fundamental na predisposição à atopia da criança; em especial a mãe, pois além dos genes, fornece o ambiente onde a criança irá se desenvolver durante os primeiros anos de vida, fase de maior risco à sensibilização (Thomas et al., 2003). Essa forte influência materna pode ser compreendida através de

estudos da transmissão de anticorpos via passagem transplacentária e aleitamento materno.

1.2 INFLUÊNCIAS DA GESTAÇÃO NA SENSIBILIZAÇÃO DA CRIANÇA.

As primeiras evidências de transmissão de imunoglobulinas da mãe para o feto surgiram com Brambell e colaboradores há aproximadamente sessenta anos (Brambell et al., 1949). Hoje sabemos que das cinco classes de anticorpos (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) a única capaz de ser transportada da mãe para o feto é a IgG. A passagem transplacentária inicia-se lentamente com aproximadamente 16 semanas de gestação, mas entre a 22^a e 26^a semana o nível de IgG fetal aumenta rapidamente e dobra de concentração ao final da gestação (Simister, 2003).

A IgG desloca-se da circulação materna aos capilares fetais mediada pelo receptor Fc neonatal (FcRn). Em humanos, este receptor é expresso no sinciciotrofoblasto e liga-se com alta afinidade a IgG quando em pH ácido (<6,5), mas não em pH fisiológico (7,4). Assim, a passagem da IgG ocorre a partir do momento em que o sinciciotrofoblasto internaliza fluido materno em endossomos; as moléculas de IgG ali presentes, juntamente com os receptores, são gradualmente acidificados permitindo a forte ligação entre ambos e proteção contra a ação de enzimas lisossomais. A vesícula se funde à membrana na face fetal do sinciciotrofoblasto, a IgG é dissociada pela ação do pH fisiológico, caindo na circulação (Simister et al., 1997; Moraes-Pinto et al., 2001; Radulescu et al., 2004; Roopenian et al., 2007) (Figura 3).

A quantidade de IgG transmitida depende da quantidade de receptores na superfície celular e a taxa de transmissão depende das taxas de ligação e de liberação de moléculas de IgG desses receptores. O caráter seletivo do processo depende de uma ou de ambas as taxas e varia entre diferentes subclasses de IgG (Moraes-Pinto et al., 2001).

FIGURA 3: Nos humanos, a passagem transplacentária de IgG ocorre através do receptor FcRn localizado no sinciotrofoblasto da placenta. O sinciotrofoblasto é banhado por sangue materno e internaliza IgG sérica. O FcRn é expresso na face interna da vesícula do sinciotrofoblasto. Com a acidificação dos endossomos, o FcRn se liga a IgG materna e a transição à circulação fetal se dá em pH fisiológico.

FONTE: Adaptado de Roopenian et al., 2007.

A habilidade de outras proteínas em atravessar a barreira transplacentária não é restrita à existência de transporte ativo, estando também associada ao seu peso molecular, solubilidade lipídica, polaridade e ionização (Thorton et al., 2002), mas a IgG materna também funciona como veículo ideal no transporte de antígenos em imunocomplexos até a circulação fetal (Casas et al., 2001).

Para verificar a passagem transplacentária de alérgenos em humanos, Szepefalusi e colaboradores (2006) utilizaram modelo *ex vivo* de perfusão de placenta e observaram que tanto os alimentares como os inaláveis atravessam a barreira transplacentária e membrana amniótica, sendo detectados na circulação fetal e líquido amniótico, respectivamente. Metabólitos da nicotina e o antígeno p24 do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) também foram encontrados no tecido placentário, líquido amniótico e circulação fetal de recém-nascidos de mães expostas ao cigarro ou infectadas (Vance et al., 2002). Assim, como o feto respira e ingere grandes

quantidades do líquido amniótico, alérgenos adquiridos durante a gestação podem estimular a imunidade do recém-nascido de forma sistêmica e em nível de mucosa, nos tecidos linfóides associado à mucosa gastrintestinal e respiratória (Holloway et al., 2000).

Sabemos que apenas a presença dos alérgenos na circulação ou mucosa fetal é insuficiente para ativar a resposta imunológica; sendo necessária participação de APCs imunocompetentes e linfócitos T diferenciados (Thorton et al., 2002).

A ontogênese do sistema imune ocorre durante o desenvolvimento fetal e logo após a implantação do embrião já surgem linfócitos B. Um pouco mais tarde, ao final do primeiro trimestre de gestação, linfócitos T começam a expressar seus receptores, com intensa expansão ao final do segundo trimestre. Já os anticorpos IgM e IgE são detectados ainda no primeiro trimestre com aproximadamente 11 semanas de gestação, juntamente com o surgimento do timo (Hertz-Picciotto et al., 2007). Diante dessas evidências, supomos que o feto é capaz de responder de maneira específica a eventuais alérgenos que entrarem em contato durante seu desenvolvimento, mas na ausência de inflamação ou outros sinais que possam induzir a maturação das células dendríticas, o encontro com o alérgeno no período fetal pode levar preferencialmente a tolerância que a ativação (Thorton et al., 2002), ou ainda favorecer a polarização da resposta para Th2 (Holt et al., 2000; Jones et al., 2002).

Kondo e colaboradores (1992) foram os primeiros a observar *in vitro* a resposta proliferativa alérgeno-específica de células mononucleares do cordão umbilical. Atualmente, já foi demonstrado que proliferação de linfócitos T em resposta a alérgenos (do ácaro, do leite de vaca e do ovo), ocorrem com aproximadamente 22 semanas de gestação (Jenmalm et al., 2000; Jones et al., 2002) e que no cordão umbilical alguns apresentam fenótipo de célula de memória (CD45RO+), sustentando a idéia de que a sensibilização pode ocorrer previamente intra-útero (Devereux et al., 2001).

A resposta neonatal com produção de IgM específica a agentes infecciosos como da rubéola, do HIV, da esquistossomose e ao toxóide tetânico, só foi observada no cordão umbilical de recém-nascidos cujas mães haviam sido infectadas ou

vacinadas a tais patógenos durante a gestação, indicando que o desenvolvimento da reatividade específica depende da prévia exposição materna (Jones et al., 2002).

De maneira semelhante, resposta de células mononucleares e produção de IgG específica a alérgenos aéreos e alimentares podem ocorrer em recém-nascidos com ou sem história familiar de atopia, mas não aos alérgenos que a gestante freqüentemente não é exposta (Casas et al., 2001).

A natureza bastante comum do *Der p* em todo mundo permite que a exposição materna ocorra em condições normais de vida (Vance et al., 2002), mas reações cruzadas também contribuem para o desenvolvimento da resposta imune neonatal. Como exemplo, mães que não estiveram grávidas durante a “estação de pólen” apresentam filhos com resposta imune específica a estes alérgenos (Jones et al., 2002), assim como resposta de células mononucleares do cordão umbilical ao toxóide tetânico e difteria, sem exposição materna aparente a estes antígenos durante a gestação (Prescott, 2003).

Ainda não há estudo que mostre relação convincente entre os níveis de exposição materna aos alérgenos (e presumidamente a exposição fetal) com a presença, magnitude ou característica da resposta celular específica no recém-nascido (Chan-Yeung et al., 1999; Miller et al., 2001; Smillie et al., 2001; Marks et al., 2002; Edelbauer et al., 2004; Hagendorens et al., 2004). Embora em crianças já sensibilizadas, reduzir a exposição aos alérgenos diminui os sintomas da doença, não há evidências de que a própria sensibilização também seja reduzida; podendo de fato aumentar em algumas circunstâncias. Essa observação aplica-se para alergia ao amendoim, que quando evitado durante a gestação e primeiros anos de vida ao invés de proteger contra sensibilização, aumenta o risco em desenvolvê-la (Turcanu et al., 2003).

Assim, podemos pensar que a passagem transplacentária de antígenos não seja a única responsável pela influência materna no perfil de resposta imune da criança, existindo outros fatores de igual ou maior importância.

Estudos em modelos experimentais demonstraram que a proteção para sensibilização a aero-alérgenos normalmente ocorre através de mecanismo semelhante à tolerância oral. A principal característica de animais que se tornaram “tolerantes” após repetidos desafios com aerossol, é a inabilidade em sintetizar IgE contra o alérgeno inalado acompanhada por produção de IgG específica (Holt et al., 1981). Em humanos essa resposta também é descrita, onde a presença de altos níveis de IgE específica é característica peculiar de atopia enquanto que anticorpos IgG alérgenos específicos são detectáveis no sangue de indivíduos atópicos e normais (Michils et al., 1999).

Em modelo murino de sensibilização materna seguido por desafio pós natal com *Der p*, Victor e colaboradores (2003) observaram que há efeito inibitório da resposta IgE e IgG1 nos recém-nascidos após desafio com o alérgeno e que este efeito é dependente do nível de anticorpos maternos. Em estudo similar também em modelo experimental, Uthoff e colaboradores (2003) demonstraram que a supressão da resposta imune nos recém-nascidos mediada pela transferência de IgG materna previne completamente a formação de IgE por mecanismo antígeno específico.

Jarrett e colaboradores (1983) foram os primeiros a chamarem a atenção sobre a possibilidade de a IgG materna ser responsável pela supressão da produção de IgE pelo recém-nascido através de três possíveis mecanismos: (1) formação de imune-complexos, (2) ligação ao receptor Fc γ RIIb na superfície do linfócito B e (3) alterações no repertório imune fetal através da elaboração de uma resposta anti-idiotípica aos anticorpos maternos. Todos mecanismos são influenciados pela dose, frequência e forma de exposição ao antígeno; além das características genéticas da mãe e criança (Jarrett, 1984) (Figura 4).

FIGURA 4: Estímulos envolvidos no desenvolvimento da imunossupressão da IgE no início da vida (variáveis entre parênteses).

FONTE: Modificado de Jarrett, 1984.

Apesar de outros estudos confirmarem essas hipóteses (Seenger et al., 1998; Melkild et al., 2002; Richard et al., 2006), são ainda insuficientes para esclarecer o mecanismo de ação da IgG materna. Além disso, grande parte utilizou modelos experimentais e os resultados não podem ser completamente transportados para a realidade da sensibilização e reações de hipersensibilidade em humanos.

Em humanos, alguns estudos longitudinais indicam que a transferência de altas concentrações de anticorpos maternos IgG específicos a aero-alérgenos ou alérgenos alimentares protege contra o desenvolvimento de atopia nos primeiros meses de vida (Dannaeus et al., 1978; Jenmalm et al., 2000; Nafstad et al., 2001). De maneira semelhante, crianças de mães que receberam imunoterapia ao alérgeno do pólen (Bet v 1) durante a gestação apresentaram positividade reduzida ao teste de punção para o mesmo alérgeno após 3-12 anos, comparados às de gestantes que interromperam o tratamento (Glovsky et al., 1991).

Muitos pesquisadores atribuem papel protetor à subclasse IgG4 a qual não ativa a cascata do complemento, age como uma molécula monovalente, tem capacidade

reduzida de ligação aos receptores da superfície celular e assim apresenta capacidade de neutralizar o antígeno produzindo menos inflamação que as outras subclasses de IgG. (Gondo et al., 1987; Aalberse et al., 1993; Mori et al 2001). Este padrão de resposta está bem estabelecido nas imunoterapias alérgeno-específicas, que promovem aumento nos níveis de IgA e IgG específicas e queda na concentração de IgE específica (Frew, 2007), apesar deste mecanismo protetor ainda ser questionado, pois uma considerável porcentagem dos indivíduos com alergia respiratória apresentam níveis séricos elevados de IgG4 (Steward et al., 1988; Okahata et al., 1990; Rizzo et al., 1993; Jenmalm et al., 1997; Casas et al., 2001). Há evidências que quando transferida em altas concentrações durante a gestação, a IgG evita a sensibilização a aeroalérgenos na criança; mas não aos alérgenos alimentares (Jenmalm et al., 2000).

O fato de que nem todos os estudos observarem relação entre sensibilização da criança e níveis de IgG no cordão umbilical (Prescott et al., 2000), sugere que a “falha” no efeito protetor da IgG pode estar relacionada com a inabilidade que alguns recém-nascidos têm em responder ao mecanismo regulatório.

Um dos principais determinantes para o risco à sensibilização na infância parece ser o estado de maturação do sistema imune em relação ao balanço T_H1/T_H2 no momento em que entra em contato com o alérgeno; devido à polarização generalizada para T_H2 do sistema imune fetal e do bebê nos primeiros anos de vida (Holt et al., 2005). A função T_H1 com capacidade de produzir $IFN-\gamma$ tende a aumentar progressivamente durante a infância, mas alguns grupos observaram que recém-nascidos com alto risco em desenvolver alergia apresentam lenta polarização para atividade T_H1 com deficiência na resposta ao $IFN-\gamma$, quando comparados aos neonatos de baixo risco (Kondo et al., 1992). Crianças de alto risco também manifestam deficiência na resistência a infecções e resposta a vacinas, aparentemente relacionada com atenuada função T_H1 (Fallon et al., 2007). A redução da resposta T_H1 pode ser parcialmente atribuída à deficiência na função de linfócitos $TCD4^+$ durante a infância e na capacidade das APCs em promover adequada estimulação dos linfócitos durante sua ativação através da IL-12 e outras citocinas (Prescott, 2003).

Também devemos lembrar que a concentração de IgG na mucosa é baixa em relação a encontrada no sangue e após aproximadamente dois meses, quando a maioria da IgG materna é catabolizada, a importância da amamentação destaca-se em relação aos antígenos que utilizam a mucosa intestinal como “porta de entrada”, particularmente em crianças abaixo de 5 anos de idade que exploram o mundo com suas bocas (Lawrence et al., 2007). Logo, existe a possibilidade de que outros isótipos presentes na mucosa, especialmente a IgA, possam modular as reações de hipersensibilidade.

1.3 INFLUÊNCIA DA AMAMENTAÇÃO NA SENSIBILIZAÇÃO DA CRIANÇA.

Embora a resposta imune específica aos alérgenos possa ser ativada antes do nascimento, o ambiente ao qual o recém-nascido será exposto é crucial para determinar o padrão de resposta que será estabelecido após a infância. O colostro e leite materno constituem parte deste ambiente.

Sabemos que a amamentação fornece ao lactente além de nutriente, componentes imunológicos que os protegem contra infecções e contribuem para maturação do sistema imune. Estes incluem a lisozima, lactoferrina, peroxidase, citocinas (TGF- β , IL-10 e IL-6), anticorpos específicos, leucócitos ($\sim 4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$), como macrófagos (55-60%), granulócitos (30-40%), linfócitos (5-10%) e os próprios antígenos (Goldman et al., 1995; Bednar- Tantscher et al., 2001). Os anticorpos, representado por 90% de S-IgA, são os componentes cruciais para proteção do lactente (Dickinson et al., 1998).

Aero-alérgenos como *Der p*, depois de ingeridos ou inalados, são capturados por células M especializadas e apresentados por APCs aos linfócitos. A resposta resulta na ativação de linfócitos B que migram via vasos linfáticos e sangue periférico para sítios efetores que constituem o integrado sistema imune de mucosa (Brandtzaeg, 2003). Durante a gestação e período de lactação, citocinas (IL-5 e IL-6) e hormônios responsáveis pela produção do leite induzem a migração de linfócitos da placa de Peyer, ou de outro órgão linfóide associado à mucosa (como NALT e BALT), para as glândulas mamárias (Roux et al., 1977; Lebman et al., 1994; Brandtzaeg et al., 1995;

Hanson et al., 2002). Nas glândulas, se diferenciam em plasmócitos e produzem preferencialmente dímeros ou grandes polímeros de IgA (coletivamente conhecidos como plgA) unidos por um polipeptídeo de 15kDa denominado cadeia J. Estes, por sua vez, são transportados eficientemente para o colostro ou leite como anticorpos S-IgA através de uma glicoproteína de ~ 100kDa chamada receptor de Ig polimérica (plgR), expresso constitutivamente por células epiteliais, que após clivagem na porção apical da célula epitelial se tornará o componente secretor (SC) associado à IgA (Johansen et al., 2004; Brandtzaeg et al., 2005).

Por este mecanismo, os lactentes recebem S-IgA direcionadas ao variável repertório materno resultante de complexas interações com o meio ambiente; principalmente a antígenos que recentemente entraram em contato com as superfícies de mucosa do aparelho gastrointestinal ou respiratório materno (Hanson et al., 2002).

FIGURA 5: Circulação enteromamária de linfócitos. Linfócitos B ativados migram da placa de Peyer via vasos linfáticos e sangue periférico para a glândula mamária. A distribuição de plasmócitos secretores de IgA além do intestino é crucial para produção de anticorpos secretores (S-IgA e SIgM) no leite. Por este mecanismo o lactente receberá proteção específica no intestino e vias aéreas de maneira similar à mucosa intestinal materna.

FONTE: adaptado de Brandtzaeg, 2003.

A concentração de S-IgA total no colostro pode chegar a 5000mg/dl e no leite a 25mg/dl (Strober et al., 2000). Um lactente com amamentação exclusiva ingere cerca de 0,5 a 1,0g de S-IgA por dia (Van-de-Perre, 2003), mas estas não entram na circulação da criança em quantidades substanciais (Duchén et al., 2000); exceto talvez em recém-nascido pré-termo (Weaver et al., 1991; Sanderson et al., 1993).

A rota do antígeno após administração por aerosol já foi demonstrada utilizando ¹²⁵I-BSA ou ¹²⁵I-OVA marcados com radiação. Ambos os estudos mostraram que 2-4% dos antígenos foram encontrados no pulmão enquanto 65-80% foram encontrados no trato digestivo após 1 a 2 horas da exposição com aerosol. Além disso, muitos dos antígenos inalados ficam aprisionados no muco nasal e são encaminhados ao trato digestivo através dos movimentos ciliares (Willoughby, et al., 1977; Holt et al., 1981). Assim, embora alguns aero-alérgenos penetrem através dos alvéolos distais, grande parte irá concentrar-se na mucosa intestinal e podem ser bloqueados e eliminados por anticorpos S-IgA específicos ali presentes, antes de iniciar a reação alérgica (Kitani et al., 1985) e sem indução de resposta inflamatória (Brandtzaeg, 1992; Albanese et al., 1994; Hanson et al., 1994; Maxson et al., 1995; Walker, 2002).

Estudos epidemiológicos, realizados com o objetivo de estabelecer relação entre amamentação e risco em desenvolver alergia durante a infância, ainda mostram resultados conflitantes, mas a maior parte dos estudos sugere que a amamentação tem efeito protetor especialmente em crianças com hereditariedade de atopia (revisado em Odijk et al., 2003). Em relação à alergia alimentar, baixa concentração de S-IgA específica no colostro parece diminuir a proteção da mucosa intestinal do lactente e facilitar a adesão dos alérgenos (Calbi et al., 1998; Järvinen et al., 2000); já para as outras manifestações, essa relação ainda não foi estabelecida.

Apesar de algumas indicações de que a concentração de S-IgA específica a aero-alérgenos e alérgenos alimentares é mais baixa no leite de mães atópicas quando comparadas às sadias (Casas et al., 2000; Duchén et al., 2000), essa observação não é constante e parece variar individualmente, assim como a concentração de citocinas relacionadas diretamente com produção deste anticorpo durante a lactação, como a IL-

6 e IL-10 (estimulam a produção de IgA), TNF- α (estimula a produção do componente secretor) e TGF- β (desencadeia o switch para IgA no linfócito B) (Van de Perre, 2003).

Recentemente, Verhasselt e colaboradores (2008) demonstraram em modelo experimental, que aero-alérgenos podem ser transferidos através da amamentação, resultando em tolerância antígeno específica e prevenção de danos pulmonares, como inflamação das vias aéreas. A tolerância observada provavelmente se deve ao fato da mãe fornecer de maneira constante ao filhote antígenos em baixa concentração, assim como ocorre na imunoterapia, e a citocina TGF- β , relacionada com indução de células T_{reg} (Frew et al., 2007). No entanto, ainda não está determinado se a tolerância ocorre quando a mãe é alérgica ao mesmo antígeno transferido para o recém-nascido.

1.4 Papel “ativo” dos anticorpos maternos no desenvolvimento do sistema imune da criança.

Além dos mecanismos já mencionados, anticorpos maternos podem ativar e modular a resposta imune específica na criança, antes dela ser exposta ao antígeno propriamente dito. Essa afirmação partiu da observação de que recém-nascidos de mães vacinadas com o poliovírus inativado e com possibilidade praticamente nula de terem sido expostos a este antígeno durante a gestação, apresentaram S-IgA específica na saliva (Mellander et al., 1986). Assim, somente os anticorpos transferidos da mãe para o feto podem ter iniciado a resposta imune específica observada no recém-nascido.

Essa possibilidade origina-se do fato que um anticorpo específico (por exemplo, para o poliovírus) induz anticorpos contra seu sítio de ligação. O primeiro anticorpo (chamado de idiótipo) e o segundo anti-anticorpo (anti-idiótipo) são parte da maioria, se não de todas as respostas humorais (Wigzell, 1987). O efeito regulatório da interação entre eles é geralmente curto nos adultos, mas de longa duração quando induzida no período neonatal, podendo ser transmitida à geração seguinte (Lemke et al., 2004). Se presentes em grandes concentrações, os anti-idiotipos tem efeito regulatório, inibindo a produção de anticorpos da especificidade correspondente, mas se presentes em baixas

concentrações levam a ativação celular (Stein et al., 2007). No último caso, o indivíduo pode adquirir maior proteção contra patógenos, mas ao mesmo tempo sensibilizar-se a peptídeos alimentares ou alérgenos ambientais.

A observação que filhos de mães alérgicas tem maior risco de desenvolver atopia que filhos de pais alérgicos (Jones et al., 2002), corrobora a idéia de que o rápido aumento da incidência de atopia nas últimas décadas tem grande influência materna e não pode ser explicada somente por fatores genéticos. Assim, diante das evidências aqui apresentadas, podemos inferir que a transferência de anticorpos maternos, além de fornecer proteção passiva contra patógenos, “educa” o sistema imune do recém-nascido através de mecanismos imunossupressores e ativadores. A interferência dos anticorpos maternos nos primeiros anos de vida é essencial, pois apesar dos recém-nascidos já apresentarem o “aparato” celular para responderem de maneira específica aos eventuais patógenos, ainda apresentam déficit funcional do sistema imunológico e, a regulação inapropriada da resposta, pode desencadear doenças como a alergia (Kelly et al., 2000).

Esta forte influência, específica e dependente das experiências imunológicas maternas, pode ser compreendida por meio dos estudos de transmissão de anticorpos via passagem transplacentária e aleitamento materno. Assim, é de extrema importância caracterizarmos a transferência passiva de anticorpos específicos ao principal alérgeno da poeira domiciliar (*Dermatophagoides pteronyssinus*), grande colaborador na patogênese da asma e rinite alérgica (Rizzo et al., 1995, Rizzo et al., 1997, Sarrinho et al., 2000, Naspitz et al., 2004), para que possamos avançar com o conhecimento das relações materno-fetais e, mais adiante, estabelecer estratégias eficazes de prevenção das doenças alérgicas durante o desenvolvimento fetal e primeiros anos de vida da criança.

2 Objetivos

Geral:

Caracterizar quantitativa e qualitativamente a transferência passiva de anticorpos específicos ao *Der p* durante a gestação e amamentação.

Específicos:

Analisar a concentração e os índices de avidéz da S-IgA total e anti-*Der p* no colostro e de IgG total e anti-*Der p* no soro materno e de cordão umbilical.

Investigar o efeito da sensibilização materna ao *Der p* na transferência passiva de anticorpos totais e específicos.

3 Casuística e Métodos

3.1 SELEÇÃO DAS PUÉRPERAS

A população avaliada foi constituída de puérperas e seus respectivos recém-nascidos, atendidos na Maternidade de Campinas durante os meses de fevereiro a julho de 2006.

Estabelecemos como critérios de inclusão a idade gestacional (de 37 semanas completas a 39 e 6/7 semanas), ausência de doenças sistêmicas como diabetes e hipertensão, e reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis. Não houve restrições ao grupo étnico, idade, escolaridade, paridade, história de aleitamento anterior, ou tipo de parto. Obtivemos estes dados na ficha de internação.

Na primeira etapa do estudo, analisamos a concentração e os índices de avidéz da S-IgA e IgG, totais e anti-Der p, em 71 amostras de colostro e 74 amostras pareadas de soro materno e de seu respectivo recém-nascido, coletadas aleatoriamente.

Na segunda etapa do estudo analisamos menor número de pacientes, pois focamos somente na sensibilização ao *D. pteronyssinus*: Através de um questionário simples aplicado às puérperas, levantamos os antecedentes de doença alérgica pessoal e, baseado nestes relatos e nos níveis de IgE total e específica anti-Der p, realizamos uma segunda seleção da população estudada, subdividindo as puérperas em dois grupos, conforme algoritmo da figura 6.

O grupo estudo foi constituído de amostras de puérperas sensibilizadas ao *D. pteronyssinus* (RAST anti-Der p positivo com “score” ≥ 3) e o grupo controle constituído por amostras de puérperas não sensibilizadas ao *D. pteronyssinus* (RAST anti-Der p negativo com “score” =0); níveis normais de IgE sérica total (≤ 130 UI/ml) e ausência de história clínica de asma, dermatite e rinite alérgica.

FIGURA 6: Algoritmo da seleção e análise das amostras:

Foram selecionadas aleatoriamente puérperas atendidas na Maternidade de Campinas. Após assinatura do termo de consentimento, coletou-se sangue de cordão umbilical do recém-nascido de cada voluntária e após 48hrs, uma amostra de colostro e outra de sangue periférico materno. Todas as amostras foram encaminhadas ao laboratório e processadas para realização dos testes sorológicos. Verificamos as concentrações totais dos isotipos IgG, IgA e IgE e anti-*Der p*, e determinamos os índices de avidéz para cada isotipo. As amostras foram divididas em dois grupos segundo questionário aplicado 48 horas após o parto: (1) Grupo estudo, em vermelho, constituído por amostras de voluntárias sensibilizadas ao *Der p* (RAST positivo, com “score” ≥ 3) e (2) Grupo controle, em azul, constituído por amostras de voluntárias não sensibilizadas ao *Der p* (RAST negativo com “score”=0); níveis normais de IgE total (≤ 130 UI/ml) e sem histórico de asma, dermatite e rinite alérgica

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE MATERNO, SANGUE DE CORDÃO E COLOSTRO

Após assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, coletou-se de cada mãe voluntária uma amostra de sangue do cordão umbilical e após 48hrs, uma amostra de sangue venoso e outra de colostro. No caso de puérperas menores de 21 anos de idade, o responsável legal autorizou a inclusão no estudo assinando o termo de consentimento. As coletas foram realizadas no período de Janeiro a Julho de 2006.

Sangue de cordão: A pesquisadora ou o obstetra responsável coletaram aproximadamente 15 ml de sangue em tubo seco, logo após sua ligadura ou após dequitação da placenta. O sangue foi coletado, com auxílio de agulha e seringa descartáveis. Os tubos foram identificados e armazenados a 4 °C até serem transportadas ao laboratório.

Colostro: Aproximadamente 5 ml de colostro foram coletados manualmente, 48 horas após o parto, em tubo seco, sempre na mama oposta da última mamada, por enfermeira qualificada. Os tubos foram identificados e armazenados a 4 °C até serem transportados ao laboratório.

Sangue periférico: Aproximadamente 15 ml de sangue materno foram coletados em tubo seco por meio de punção venosa periférica realizada por enfermeira qualificada tomando-se as devidas precauções de assepsia. Os tubos foram identificados e armazenados a 4 °C até serem transportados ao laboratório.

3.3 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE COLOSTRO

No mesmo dia da coleta as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 160xG sob refrigeração a 4 °C. A centrifugação permite a separação do colostro em três fases nítidas: o “botão” celular, uma porção fluida intermediária e uma camada superior de gordura. A camada superior de gordura e o “botão” celular foram desprezados, e a porção fluida aliquotada e estocada a -80 °C.

3.4 OBTENÇÃO DO SORO DE SANGUE PERIFÉRICO E DE CORDÃO UMBILICAL

No mesmo dia da coleta, as amostras de sangue periférico e de cordão umbilical foram centrifugadas por 15 minutos a 160xG. Os soros obtidos foram aliquotados e estocados a - 80 °C.

TESTES LABORATORIAIS

3.5 RAST ESPECÍFICO PARA O ÁCARO *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS* (CAPSYSTEM[®] PHARMACIA)

A sensibilização materna ao *Der p* foi determinada baseada nos níveis de IgE específica quantificados por RAST utilizando-se o equipamento CapSystem[®] da Pharmacia em laboratório especializado.

Neste sistema, o extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* é acoplado covalentemente ao ImunoCAP e reage com a IgE específica da amostra de soro. Após lavagem da IgE inespecífica, adiciona-se anticorpo-anti-IgE marcado enzimaticamente para formação dos complexos. Após incubação o anticorpo-anti-IgE não ligado é lavado, procedendo-se à incubação do complexo ligado ao substrato. Para avaliar os resultados, a fluorescência é convertida em concentrações pelo Software do equipamento, utilizando uma curva de calibração. O equipamento realiza todas as etapas do ensaio e tem amplitude de 0,35 – 100 kU/L, onde resultados abaixo de 0,35 kU/L representam ausência ou níveis indetectáveis de anticorpos alérgeno-específicos.

Os resultados em KU/L são classificados, quanto à reatividade, em classes de 0 a 6 (Instruções de utilização ImmunoCap Specific IgE Conjugate 100 and 400 – Fluoroenzymeimmunoassay. 52-5237-99/05:99-112). (Johansson, 1988) (Tabela1).

TABELA 2: Classificação das concentrações de IgE anti-*Der p* segundo *CapSystem®* Pharmacia

Classes	Faixa (KU/l)	Resultado	Interpretação
0	< 0,35	Indetectável	Negativo
1	0,35 – 0,70	Fraco	Correlação
2	0,70 – 3,50	Moderado	Duvidosa
3	3,50 – 17,50	Forte	Positivo Conclusivo
4	17,50 – 50,00	Muito forte	Positivo Conclusivo
5	50,00 – 100,00	Muito forte	Positivo Conclusivo
6	> 100,00	Muito forte	Positivo Conclusivo

3.6 DOSAGEM DE IgE SÉRICA TOTAL

Determinou-se a concentração de IgE sérica total materna através de imunoensaio tipo sanduíche de quimioluminescência direta, utilizando quantidades constantes de dois anticorpos contra IgE. O ensaio foi realizado por laboratório especializado e utilizou-se o equipamento ADVIA Centaur (124666 ver. E, 2003-04: pg 1-10) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999).

Nesta técnica, o primeiro anticorpo, no reagente Lite, é um anti-IgE humano caprino marcado com éster de acridina e o segundo, na fase sólida, é um anticorpo anti-IgE humano de rato covalentemente ligado a partículas paramagnéticas. O sistema realiza automaticamente as seguintes etapas:

- Adiciona 30 µl de amostra em uma cubeta
- Adiciona 100 µl de Reagente Lite e 450 µl de Fase Sólida e incuba durante 7,5 minutos a 37 °C.
- Separa, aspira e lava as cubetas com água
- Adiciona 300 µl de Reagente Ácido e a mesma quantidade de Reagente Básico para iniciar a reação quimioluminescente.
- Relata os resultados para IgE total no soro em UI/ml sendo a concentração mínima detectável é de 1,5 UI/ml e a máxima de 3.000 UI/ml.

3.7 DOSAGEM DE IgG SÉRICA TOTAL

Os níveis séricos de IgG total materna e do cordão umbilical foram avaliados por nefelometria, realizado por laboratório especializado, utilizando nefelômetro Behring (BN 100 Prospec) com padrões e controles apropriados. As dosagens de imunoglobulinas foram efetuadas segundo protocolo de ensaio para nefelômetro (Behring, EUA), e as amostras de soro diluídas conforme instruções do fabricante (Behring, EUA). (Dati et al., 1996). Os resultados foram expressos em mg/dl.

3.8 DOSAGEM DE IgA TOTAL NO COLOSTRO

A IgA total secretória de colostro foi medida por ensaio imunoenzimático ELISA (método modificado de Nagao et al., 2001).

Microplacas Costar de 96 poços (Corning, NY 3590) foram revestidas com 5µg/ml de anti-IgA humana (I-0884, Sigma) em PBS pH7,4, incubadas *overnight* em câmara úmida a 4 °C e lavadas 4 vezes com solução de PBS – Tween 20 0,1%. Logo após, diluiu-se as amostras em 1:100.000 em tampão PBS NaCL 0,35M-Tween 0,2% e as adicionou à placa em duplicatas de quatro diluições permaneceram incubadas por duas horas a 37 °C. Em todas as amostras, utilizou-se uma curva padrão constituída de 4 pontos (Sigma) nas concentrações de 3,9 ng/ml a 250 ng/ml e dois controles com concentrações já conhecidas. Sendo assim, o limite de detecção correspondeu a 3,9 ng/ml.

[Digite uma citação do documento ou o resumo de uma questão interessante. Você pode posicionar a caixa de texto em qualquer lugar do documento. Use a guia Ferramentas de Caixa de Texto para alterar a formatação da caixa de texto da citação.]

Após novas lavagens, adicionamos 100 µl de conjugado anti-IgA humano marcado com peroxidase (α -chain specific, Sigma A0295), na diluição de 1:20.000 no mesmo tampão de diluição das amostras. A placa foi então incubada novamente por 1 hora e trinta minutos a 37 °C. O substrato constituído por 10mg de ortofenilenodiamina (OPD) dissolvida em 25 ml de tampão citrato fosfato pH 5.0 e 10 µl de água oxigenada (H₂O₂), foi acrescentado no volume de 100 µl /poço e as placas mantidas no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, adicionamos 50 µl em cada

poço de solução “stop”, que consiste em ácido sulfúrico a 2,5 N. Realizou-se a leitura da placa em leitor de ELISA em 492nm.

Para o cálculo das concentrações de IgA total em todas as amostras, utilizamos os resultados da leitura em densidade óptica da amostra referência e o programa GraphPad Prism para a construção da curva padrão.

3.9 DETECÇÃO DE IgG SÉRICA E IgA DO COLOSTRO ESPECÍFICOS PARA O *D. PTERONYSSINUS* POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Em todos os ensaios utilizou-se o “Extrato total de *Dermatophagoides pteronyssinus* liofilizado” (Lote X-1” da IPI-ASAC Brasil), ressuspendido em 7,5 ml de água bidestilada e purificada em sistema de filtragem mili-Q na concentração de 58500 UBE/ml, aliquotado e mantido a -80 °C. A concentração total de proteínas do extrato foi de 4mg/ml, determinada através do “BCA Protein Assay Reagent Kit” (Pierce, 23227) que contém formulação baseada em ácido bicinconínico (BCA), para detecção colorimétrica e quantificação total de proteína. Como não possuíamos soro padrão com concentração conhecida de IgG e IgA anti-*Der p*, houve a necessidade de se utilizar um pool de soro e um de colostro como amostra referência, atribuindo-se aos mesmos um valor arbitrário de 1.000 unidades por mililitro (1.000 UA/ml). A partir destes pools (denominados pools curva) pudemos determinar os níveis de anticorpos específicos presentes nas amostras.

Para o preparo dos dois pools, selecionamos 24 puérperas com histórico de alergia respiratória relacionada à poeira domiciliar e coletamos amostras pareadas de sangue periférico e colostro apenas para a preparação dos pools, ou seja, estas amostras não foram incluídas no estudo. Submetemos cada soro ao teste de alergenidade (RAST) e misturamos 2ml de cada amostra que apresentava RAST $\geq$ 4 (n=8) para construção da curva. Da mesma maneira, também fizemos um pool utilizando as amostras com RAST = 3 (n=6) e RAST = 0 (n=5) que serviram como controles alto (pool A) e baixo (pool B) do ensaio, respectivamente. As amostras com RAST 1 e 2 foram descartadas.

O mesmo foi efetuado com o colostro, utilizando-se as mesmas doadoras e o mesmo volume de amostra.

Para todos os ensaios, dois poços foram “brancos”, nos quais se adicionou somente o extrato e o anticorpo conjugado, não sendo adicionada amostra de soro ou colostro. O “branco” foi empregado para avaliar a ligação inespecífica entre o anticorpo conjugado e as proteínas do extrato. O valor da densidade óptica dos poços “brancos” de cada placa foi sempre subtraído da densidade óptica das amostras, referências e controles.

a) IgG anti-*D. pteronyssinus*

Utilizamos o método modificado de Prescott et al., 2000. Primeiramente adicionou-se às placas (COSTAR-96 poços, Corning, NY 3590) 5µg/ml do extrato diluído em PBS pH 7,4, permanecendo “overnight” a 4 °C em câmara úmida. No dia seguinte, estas foram lavadas (sempre quatro vezes com solução tampão fosfato contendo Tween 0,1% - Denley, EUA) e bloqueadas com solução Molico® (leite de vaca em pó desnatado) 5% em PBS – Tween 20 0,1% por uma hora, em câmara úmida, a 37°C.

Após novas lavagens, as amostras de soro (cordão umbilical e sangue periférico) e os controles (“pool A” e “pool B”) foram testados em duplicatas diluídos em Molico 5% em PBS-T 0,1%, em quatro diluições seriadas, a partir de uma diluição inicial de 1:100. As amostras de soro da mãe e do RN (cordão umbilical) foram analisadas no mesmo dia e no mesmo ensaio. O “pool curva” (usado para a construção da curva padrão dos ensaios) foi testado em sete diluições seriadas de 1:2 a partir de 1:100. As placas permaneceram em incubação durante 2 horas em câmara úmida a 37°C.

A seguir, foram lavadas e adicionou-se o anticorpo anti-IgG humana marcado com peroxidase (A8419- Sigma), diluído 1:4000 em leite Molico® 5% PBS-T 0,1%). As placas permaneceram em incubação durante 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37°C.

Após novas lavagens, foi adicionada solução de tampão citrato fosfato 0,1M pH=5,0 contendo substrato ortofenilenodiamina (OPD, Sigma, EUA) 0,4mg/ml e peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha) a 0,01% de concentração final. As placas permaneceram em incubação à temperatura ambiente durante 30 minutos protegidas da luz. A reação foi interrompida adicionando-se 50µl de ácido sulfúrico 2,5N. A leitura

colorimétrica foi realizada em leitor de placas de ELISA (Labsystems, EUA) no comprimento de onda de 492nm. Os gráficos e cálculos foram realizados com o programa GraphPad Prism e os resultados expressos em UA/ml.

b) IgA anti-*D. pteronyssinus*

Utilizamos o método modificado de Prescott et al., 2000. Resumidamente, com base no “ELISA para IgG específica”, 5µg/ml do extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* foi adsorvido às placas (COSTAR-96 poços, Corning, NY 3590) permanecendo “overnight” a 4 °C em câmara úmida. No dia seguinte, as placas foram lavadas e bloqueadas com solução Molico 5% PBS-T 0,1% por uma hora, em câmara úmida, a 37°C.

Após novas lavagens, as amostras, os controles e o “pool curva” foram adicionados na diluição inicial de 1:50, 1:100 e 1:50 respectivamente; e após 2 horas, incubadas com anticorpo anti-IgA humana marcada com peroxidase (A0295-Sigma), diluído 1:6.000 por 1 hora e 30 minutos. Após novas lavagens, a placa foi revelada com substrato em ortofenilediamina (OPD, Sigma, EUA) e a leitura realizada em 492nm. Os resultados também foram expressos em UA/ml.

3.10 DETERMINAÇÃO DOS ÍNDICES DE AVIDEZ DE ANTICORPOS IgA E IgG ANTI-*D. PTERONYSSINUS* POR ELISA

A avidéz dos anticorpos foi determinada utilizando-se tiocianato de potássio (KSCN) para eluir os complexos formados pela ligação do anticorpo ao alérgeno (Jones et al., 1987). Primeiramente, o extrato comercial de *D. pteronyssinus* foi diluído em PBS pH 7,4 e adsorvido às placas (COSTAR-96 poços, Corning, NY 3590) na concentração de 5µg/ml, permanecendo “overnight” a 4 °C em câmara úmida. No dia seguinte, as placas foram lavadas quatro vezes com solução tampão fosfato contendo Tween 20 0,1% (Denley, EUA) e bloqueadas com solução Molico 5% PBS-T 0,1% por uma hora, em câmara úmida, a 37°C.

Em seguida, as amostras foram diluídas em Molico 5% PBS-T 0,1% e adicionadas às placas, uma amostra em cada coluna e com mesma concentração em todos poços. Permaneceram à 37 °C por 1 hora e 30 minutos em câmara úmida e, após novas lavagens, adicionaram-se 100 µl do KSCN nas concentrações de 0 M; 0,25 M; 0,5 M; 1 M; 2 M; 3 M; 4 M e 5 M, sendo uma fileira para cada molaridade, começando da menor (figura 6). As placas permaneceram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e depois foram lavadas 6 vezes.

Logo em seguida, as placas permaneceram por 1 hora à 37 °C com anticorpo conjugado. Utilizamos anti-IgG humana marcada com peroxidase (A8419- Sigma) a 1:4.000 ou anti-IgA humana marcada com peroxidase (A0295-Sigma) a 1:6.000, ambas diluídas no mesmo tampão das amostras. Após 4 lavagens, as placas foram reveladas e lidas em 492nm como já descrito. O índice relativo de avides foi considerado como a molaridade de KSCN necessária para eluir 50% dos complexos antígeno-anticorpo ligados.

Concentração de KSCN ¹		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0M (PBS-T 0,1%)	A	Molico [®] 5% (Branco)		Pool Controle		Amostra		Amostra		Amostra		Amostra	
0,25M	B												
0,5M	C												
1M	D												
2M	E												
3M	F												
4M	G												
5M	H	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼

FIGURA 7: Esquema da placa utilizada no ensaio de ELISA para determinação dos índices de avides.

¹ Molaridade do Tiocianato de Potássio adicionada em cada fileira da placa.

Estabelecemos a diluição inicial de cada amostra através das absorbâncias obtidas nos ensaios de ELISA para IgG e IgA específica ao *D. pteronyssinus* e utilizamos a diluição da amostra cuja absorbância estivesse entre 0,8 e 1,2 nm. As

amostras de soro de cada mãe com seu respectivo RN (cordão umbilical) foram analisadas no mesmo dia e no mesmo ensaio.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após análise descritiva dos dados incluindo o cálculo de médias, desvio padrão, medianas e quartis e teste de normalidade, utilizamos os seguintes testes: Correlação de Spearman e Pearson para correlacionar as concentrações de anticorpos e avides do soro materno e respectivo recém-nascido; Teste de Mann-Whitney e Teste T para comparar a avides e níveis de anticorpos entre amostras do grupo estudo e controle, assim como amostras maternas e dos recém-nascidos; Teste Kruskal-Wallis para comparar avides da IgA, IgG materna e IgG do recém-nascido. Para análise dos dados, utilizamos alfa de 0,05 ou 5% do nível de rejeição da hipótese de nulidade (Levin, 1987).

4 Resultados

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Participaram deste estudo 74 puérperas com idade média de 26,4 anos, sendo a mais nova com 15 e a mais velha com 40 anos (anexo A). Detectamos sensibilização alérgica ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, definida como nível de IgE anti-*Der p* maior que 3,5 KU/l (RAST $\geq$ 3), em 13 das 74 mães selecionadas. Destas, apenas 3 negaram manifestação clínica de alergia e 10 referiram-se como alérgicas (anexo B).

Constatamos níveis de IgE total extremamente variáveis entre as amostras, com mínimo de 1,5 UI/ml e máximo de 3.910 UI/ml (Tabela 3). Também observamos que a concentração sérica de IgE total correlaciona-se com os níveis de IgE anti-*Der p* (Spearman $r=0,4$; $p=0,001$; $n=74$) e como o esperado, mães com RAST+ apresentaram níveis séricos de IgE total significativamente mais elevados quando comparadas as com RAST- (Mann Whitney, $p=0,0008$, $n=74$. Figura 8).

FIGURA 8: Mães com RAST+ (score ≥ 3) apresentaram concentração de IgE sérica significativamente mais elevada que às de RAST- (score 0). Os resultados são mostrados como valores da mediana $\pm$ erro padrão da mediana. * $p=0,0008$.

TABELA 3: Valores do anticorpo IgE total e anti-Der p no soro materno

	IgE total (UI/ml)	IgE anti- <i>Der p</i> (KU/l)
N	74	74
Mínimo	1,5	0,35
%25	16,5	0,35
Mediana	79,5	0,35
%75	258,2	0,71
Máximo	3910	99,5
Média	308,4	6,6

4.2 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS*

Nesta primeira etapa do estudo, verificamos a transferência passiva de anticorpos específicos ao *Der p* para o feto e recém-nascido.

Iniciamos pela quantificação dos anticorpos maternos. Detectamos IgG anti-*Der p* em 100% das puérperas em concentrações que variaram de 69 UA/ml à 6.968 UA/ml. A concentração de IgG total foi mais constante entre as amostras analisadas (Tabela 4) e não apresentou correlação com os níveis de IgG específica.

A seguir analisamos quantitativamente a passagem transplacentária destes anticorpos. Verificamos que a taxa média de transferência da IgG total foi de 144%, podendo chegar a 377%, onde detectamos no cordão umbilical mais que o triplo da concentração sérica materna (384 mg/dl no soro materno e 1450mg/dl no recém-nascido). Logo, como podemos observar na Figura 09, recém-nascidos apresentaram maior concentração de IgG total quando comparados à suas respectivas mães (Mann Whitney, $P < 0,0001$, $n=74$).

FIGURA 9: Recém-nascidos apresentaram maior concentração de IgG total quando comparados à suas respectivas mães (n=74). O resultado foi analisado com valores da mediana *p<0,0001.

Em relação à passagem transplacentária da IgG específica, verificamos que independente da sensibilização materna, IgG anti-*Der p* foi transferida à todos recém-nascidos e detectada no cordão umbilical em concentrações fortemente relacionadas aos níveis maternos (Spearman test, $r = 0.9$, $P < 0,0001$; n=74. Figura 10).

FIGURA 10: Recém-nascidos apresentaram níveis de IgG anti-*Der p* fortemente correlacionados aos de suas respectivas mães. (n=74). Spearman $r = 0,92$; *P<0,0001.

A taxa média de transferência da IgG específica foi 103%, um pouco abaixo da encontrada para IgG total. Além disso, a maioria dos recém-nascidos apresentaram níveis de IgG anti-*Der p* semelhantes aos de suas respectivas mães e nenhuma amostra de cordão umbilical excedeu o dobro da concentração de IgG específica do soro materno. (Figura 11 e Tabela 4).

FIGURA 11: Recém-nascidos apresentaram níveis de IgG anti-*Der p* estatisticamente semelhantes aos de suas respectivas mães. (n=74). O resultado foi analisado com valores da mediana. $p>0,05$.

Uma vez constatada a presença de anticorpos específicos ao *Der p* no cordão umbilical, analisamos se estes também ocorrem no colostro.

Um dado interessante é que, de maneira semelhante a IgG, demonstramos que S-IgA anti-*Der p* esteve presentes em 100% das amostras de colostro analisadas. O nível de S-IgA anti-*Der p* detectado foi extremamente variável entre as mães, com mínimo de 21,5 UA/ml e máximo de 9925 UA/ml (Tabela 4). Este, não apresentou correlação com o nível de IgE e IgG, tanto total como específico, entretanto

correlacionou-se com a concentração de S-IgA total, também quantificada no colostro (Spearman test $r=0,8$; $*p<0,0001$, $n=71$. Figura 12).

FIGURA 12: O nível de S-IgA anti-*Der p* apresentou correlação com o nível de S-IgA total, ambas quantificadas no colostro. ($n=71$). $r = 0,8$; $*P<0,0001$.

TABELA 4: Valores dos anticorpos IgG e IgA, total e anti-*Der p*.

	IgG total (mg/dl)		IgG anti- <i>Der p</i> (UA/ml)		IgA total (mg/l)	IgA anti- <i>Der p</i> (UA/ml)
	Mãe	RN	Mãe	RN	Colostro	Colostro
N	74	74	74	74	71	71
Mínimo	384,0	665,0	69,00	67,00	0,6	21,5
%25	743,5	1038	240,5	269,5	8,3	222
Mediana	845,5	1155	495,5	491,0	19,9	503
%75	934,5	1323	1277	1158	46,9	1272
Máximo	1540	1790	6968	6456	264,5	9925
Média	850	1183	883,1	904	37	1060

4.3 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA TRANSFERÊNCIA PASSIVA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AO *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS*

Uma vez quantificado os anticorpos IgG anti-Der p no sangue de cordão umbilical e S-IgA anti-Der p no colostro, investigamos o índice relativo de avidez.

Verificamos que as IgGs detectadas no cordão umbilical apresentaram índices de avidez ao Der p fortemente correlacionados aos determinados no soro materno (Spearman $r=0,91$; $p<0,0001$; $n=74$. Figura 13), apresentando valores praticamente iguais entre as amostras pareadas, com média de 2,27 na mãe e 2,20 no recém-nascido (Figura 14; Tabela 5).

FIGURA 13: A IgG dos recém-nascidos apresentou índice de avidez ao *Der p* fortemente correlacionado ao de suas respectivas mães ($n=74$). $r=0,91$; $*p<0,0001$.

FIGURA 14: A IgG dos recém-nascidos apresentou índice de avidéz ao *Der p* estatisticamente semelhante ao de suas respectivas mães (n=74). O resultado foi analisado com valores da mediana. $p>0,05$.

No soro materno, a concentração de IgG mostrou ser inversamente correlacionada com o índice de avidéz ao *Der p* (Pearson, $p=0,03$). No entanto, esta correlação foi baixa ($r= - 0,2$) e não observamos correlação entre concentração de IgG materna e índice de avidéz do recém-nascido.

A seguir, avaliamos o índice de avidéz da S-IgA do colostro e verificamos que este apresenta maior índice relativo quando comparado a IgG sérica, tanto materna como do recém-nascido (Kruskal-Wallis, $p<0,0001$ e Figura 15). O índice de avidéz específica da S-IgA não se correlacionou com a concentração de S-IgA no colostro.

FIGURA 15: A S-IgA de colostro (n=71) apresentou índice de avidéz maior que o da IgG materna (n=74) e maior que o índice da IgG anti-*Der p* do recém-nascido (n=74). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo.

TABELA 5: Valores dos índices de avidéz da IgG anti-*Der p* em amostras pareadas de soro materno e cordão umbilical e da S-IgA anti *Der p* no colostro

	Índice de avidéz da IgG		Índice de avidéz da S-IgA
	Mãe	RN	
N	74	74	71
Mínimo	0,745	1,032	0,825
%25	1,892	1,707	2,178
Mediana	2,218	2,111	2,627
%75	2,642	2,619	3,085
Máximo	4,159	3,991	4,651
Média	2,274	2,201	2,659

O índice relativo de avidéz foi considerado como a molaridade de KSCN necessária para eluir 50% dos complexos antígeno-anticorpo ligados, utilizando extrato total do *Dermatophagoides pteronyssinus*.

4.4 NÍVEIS DE ANTICORPOS TRANSFERIDOS PASSIVAMENTE POR MÃES RAST+ PARA *DER p* (GRUPO ESTUDO) E MÃES RAST- PARA *DER p* (GRUPO CONTROLE)

Nesta segunda etapa do estudo, investigamos a transferência passiva de anticorpos por mães sensibilizadas, ou seja, IgE específica positiva ao *Der p*, comparando puérperas do grupo estudo (definido como RAST anti-*Der p* ≥ 3 ; $n=13$) e do grupo controle (definido como RAST anti-*Der p* =0, IgE sérica ≤ 130 UI/ml e ausência de auto-relato de história clínica de alergia; $n=26$) conforme algoritmo da Figura 6.

Ao compararmos a concentração da IgG sérica entre mães do grupo estudo e controle, observamos que apresentam níveis estatisticamente semelhantes (Figura 16) (Tabela 7).

FIGURA 16: O nível de IgG sérica encontrado em mães do grupo estudo ($n=13$) foi estatisticamente igual ao do grupo controle ($n=26$). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo. $p>0,05$

Em relação à passagem transplacentária de IgG total, a taxa de transferência foi praticamente a mesma observada entre os dois grupos (Tabela 06), mas ao compararmos a concentração de anticorpos dos recém-nascidos, observamos que os do grupo estudo apresentaram níveis significativamente mais elevados de IgG total que os do grupo controle (Mann Whitney, $p=0,006$; Figura 17 e Tabela 7).

TABELA 6: Taxa de passagem transplacentária de IgG total

IgG Total- mg/dl (mãe)	IgG Total- mg/dl (cordão umbilical)	Taxa de transferência (%)	
860	1050	122	Grupo Estudo
1280	1730	135	
725	1150	158	
698	1500	214	
1050	1140	108	
809	1390	161	
776	1220	157	
1540	1540	100	
903	1170	129	
884	1300	144	
1040	983	94	
887	1130	127	
891	871	97	
860	1030	119	Grupo Controle
746	896	120	
982	1170	119	
923	1070	116	
754	1190	158	
797	1070	134	
684	1020	150	
736	1270	170	
489	920	188	
384	1450	377	
1140	1390	122	
1150	1050	91	
912	1100	120	
846	1060	125	
797	876	110	
831	855	103	
1040	665	64	
991	911	92	
896	1110	123	
822	1330	161	
710	939	132	
778	986	127	
808	917	113	
1050	984	94	
813	974	120	
837	1010	120	

* Taxa de transferência calculada dividindo a concentração séria de IgG do cordão umbilical pela concentração do soro materno. Grupo estudo e grupo controle foram estabelecidos conforme explicado na casuística do trabalho. (Mann Whitney $p > 0,05$)

FIGURA 17: O nível de IgG total foi mais elevado em recém-nascidos do grupo estudo (n=13) quando comparado aos do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo. $p=0,006$

A seguir, analisamos a concentração de anticorpos específicos no soro materno e verificamos, conforme ilustrado na Figura 18, que mães do grupo estudo apresentaram níveis mais elevados de IgG anti-*Der p* quando comparadas às do grupo controle (Mann Whitney, $p=0,04$) (Tabela 7).

FIGURA 18: O nível de IgG anti-*Der p* foi mais elevado em mães do grupo estudo (n=13) quando comparado às do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo $*p=0,04$

Assim como no soro materno, verificamos que recém-nascidos do grupo estudo apresentam concentrações significativamente mais elevadas de IgG anti-*Der p* quando comparados aos do grupo controle (Mann Whitney, $p=0,03$, Figura 19 e Tabela 7).

FIGURA 19: O nível de IgG anti-*Der p* foi mais elevado em recém-nascidos do grupo estudo ($n=13$) quando comparado aos do grupo controle ($n=26$). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo. $*p=0,03$.

TABELA 7: Valores dos anticorpos IgG, total e anti-*Der p*.

	IgG anti- <i>Der p</i>				IgG total			
	Mãe		RN		Mãe		RN	
	RAST+	RAST-	RAST+	RAST-	RAST+	RAST-	RAST+	RAST-
N	13	26	13	26	13	26	13	26
Mínimo	130	69	220	67	698	384	871	665
%25	233,5	222,3	260,5	194	792,5	752	1090	919,3
Mediana	1000	550	1121	471,5	887	826	1170	1025
%75	2230	1167	2239	1119	1045	937,8	1445	1125
Máximo	3321	2078	3704	1893	1540	1150	1730	1450
Média	1271	722,6	1362	671,5	949	837	1244	1048
P	*p= 0,04		*p= 0,03		p>0,05		*p= 0,006	

Apesar de não ser uma diferença estatisticamente significativa, o p de 0,05 é um indicativo de que a taxa de transferência transplacentária de IgG anti-*Der p* também pode ser maior no grupo estudo (Tabela 8).

TABELA 8: Taxa da passagem transplacentária de IgG anti *Der p*.

IgG anti Der p- UA/ml (mãe)	IgG anti Der p- UA/ml (cordão umbilical)	Taxa de transferência (%)	
1266	989	78	
220	292	132	
3321	3704	111	Grupo Estudo
130	220	169	
247	250	101	- mínimo= 70%
1000	1188	118	
2620	3498	133	- média = 113%
1839	1686	91	
215	234	108	- mediana= 129%
368	271	73	
800	1457	182	
1503	1121	70	- máximo =182%
2999	2791	107	
78	67	85	
487	414	85	
692	435	60	
1451	1204	80	
224	226	100	
150	150	100	
234	331	140	
645	733	113	
752	973	130	Grupo Controle
111	84	75	
1698	1776	100	- mínimo= 60%
525	508	96	
1397	1094	78	- média = 94%
69	91	131	
1849	1535	83	- mediana= 90%
2078	1893	91	
262	167	64	- máximo =150%
390	347	89	
779	1205	150	
575	419	73	
756	548	72	
199	203	100	
1561	1071	68	
217	137	63	
519	654	120	
1090	1193	109	

* Taxa de transferência calculada dividindo a concentração séria de IgG do cordão umbilical pela concentração do soro materno. Grupo estudo e grupo controle foram estabelecidos conforme explicado na casuística do trabalho. (Teste T, p= 0,05)

Por fim, analisamos os níveis de S-IgA total e anti-*Der p* no colostro. Diferente do observado em relação à IgG sérica, não encontramos diferença significativa na concentração de S-IgA anti-*Der p* detectada no colostro de puérperas do grupo estudo quando comparadas às do grupo controle. (Figura 20 e Tabela 9).

FIGURA 20: O nível de S-IgA total (A) e anti *Der-p* (B), ambas de colostro, foi estatisticamente igual entre puérperas do grupo estudo (n=13) e do grupo controle (n=23). A barra horizontal indica a mediana obtida por cada grupo. $p>0,05$.

TABELA 9: Valores dos anticorpos S-IgA, total e anti-*Der p*.

	S-IgA total		S-IgA anti- <i>Der p</i>	
	RAST+	RAST -	RAST+	RAST-
N	13	23	13	23
Mínimo	2,8	3	66	21,5
%25	10,6	9,5	201,5	179
Mediana	24	14,4	483	309
%75	41,2	49,7	958	1105
Máximo	264,5	185	2289	3161
Média	44,3	32,5	682,3	785,4
P	$p>0,05$		$p>0,05$	

Após analisar a concentração dos anticorpos, comparamos o índice de avides dos mesmos entre grupo estudo e controle.

Verificamos que anticorpos anti- *Der p*, detectados em amostras do grupo estudo e grupo controle apresentaram índices de avidéz semelhantes, tanto com relação à S-IgA, e à IgG materna como a IgG do RN (Figura 26-28 e Tabela 10).

FIGURA 21: A S-IgA de puérperas do grupo estudo (n=13) apresentou índice de avidéz específico ao *Der p* estatisticamente igual ao do grupo controle (n=23). A barra horizontal indica o valor médio obtido por cada grupo. $p>0,05$.

FIGURA 22: A IgG sérica de puérperas do grupo estudo (n=13) apresentou índice de avidéz específico ao *Der p* estatisticamente igual ao do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica o valor médio obtido por cada grupo. $p>0,05$.

FIGURA 23: A IgG de recém-nascidos do grupo estudo (n=13) apresentou índice de avidéz específico ao *Der p* estatisticamente igual ao do grupo controle (n=26). A barra horizontal indica o valor médio obtido por cada grupo. $p > 0,05$.

TABELA 10: Valores dos índices de avidéz da IgA de colostro e IgG de amostras pareadas de soro materno e cordão umbilical.

	Índice de avidéz da IgG				Índice de avidéz da S-IgA	
	Mãe		RN		Colostro	
	RAST+	RAST -	RAST+	RAST -	RAST+	RAST-
N	13	26	13	26	13	23
Mínimo	1,12	1,14	1,14	1,03	0,82	1,56
%25	2,11	1,96	1,96	1,70	2,12	2,02
Mediana	2,45	2,24	2,37	2,13	2,59	2,45
%75	2,89	3,05	2,72	2,87	2,95	2,94
Máximo	3,55	3,94	3,31	3,99	3,22	3,59
Média	2,46	2,37	2,32	2,26	2,47	2,46
P	p=0,37		p=0,43		p=0,49	

O índice relativo de avidéz foi considerado como a molaridade de KSCN necessária para eluir 50% dos complexos antígeno-anticorpo ligados, utilizando extrato total do *Dermatophagoides pteronyssinus*.

5 *Discussão*

Sabe-se que em pacientes atópicos ocorre exuberante produção de anticorpos da classe IgE específicos para antígenos comuns do meio ambiente, mas a maior parte fixa-se aos receptores de alta afinidade presentes na membrana celular de mastócitos e basófilos. O nível de IgE no soro reflete a quantidade de IgE disponível nos tecidos, freqüentemente encontrada nas barreiras naturais do organismo como a pele, a mucosa gastrintestinal e respiratória (Holgate et al., 2008). Assim, no presente estudo, determinamos sensibilização alérgica ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* através da quantificação sérica de IgE anti-*Der p*, definida como nível maior que 3,5 KU/l (RAST $\geq$ 3).

Estudo anterior na região de Campinas-SP, com pacientes atópicos atendidos no ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia da UNICAMP, demonstrou alta prevalência de sensibilidade imediata ao ácaro *D. pteronyssinus* (65,4%), quando avaliados por meio do teste de puntura (Oliveira et al., 1996). Por outro lado, Soliman e Rosenstreich (1986) detectaram, em uma população de 63 adultos com diagnóstico clínico de asma, positividade ao teste de puntura específico ao *De p* em 68% dos pacientes, mas somente 38% apresentaram altos níveis de IgE específica.

A literatura aponta o teste de puntura, ensaio biológico que avalia a sensibilidade a nível celular, como mais sensível e menos específico comparado ao RAST, teste que avalia somente a concentração sérica de IgE específica (Lopes et al., 2006). Como nosso objetivo foi analisar aspectos quantitativos e funcionais dos anticorpos, optamos por usar o RAST, pois este além de específico, assegurou a seleção de amostras positivas para IgE específica no soro.

Ao analisarmos os níveis séricos de IgE total nesta população, observamos que as concentrações variaram bastante, sendo detectado altos níveis em algumas mães com RAST -, assim como níveis normais em mães com RAST +.

Esta observação, de certa forma, já era esperada uma vez que vários estudos mostram que há considerável sobreposição de valores de IgE sérica entre atópicos e não atópicos (Bousquet et al., 1982; Hamilton et al., 1996; Kerkhof et al., 2003). Além disso, não analisamos a reatividade a outros alérgenos comuns (pólen, pelo de gato,

barata e outras espécies de ácaro, como *Blomia tropicalis*) nem realizamos exames parasitológicos para verificar demais fatores envolvidos na produção total de IgE.

Assim, a simples detecção de altos níveis de IgE sérica não discrimina indivíduos atópicos e não atópicos, mas segundo a literatura, pode levar a quadros mais intensos ou graves de atopia e aumentar acentuadamente o risco de sensibilização (Kerkhof et al., 2003). De acordo com esta observação, verificamos que mães sensibilizadas (RAST+) apresentaram maior concentração de IgE total quando comparada às não sensibilizadas (RAST -) e que os níveis de IgE anti-*Der p* correlacionaram-se positivamente com a concentração de IgE total.

Enquanto altos níveis de IgE alérgeno-específica diferenciam indivíduos atópicos, a IgG específica a alérgenos pode ser detectada tanto no soro de indivíduos atópicos como de não atópicos (Steward et al., 1988; Okahata et al., 1990; Rizzo et al., 1993; Jenmalm et al., 1997; Michils et al., 1999 ; Jenmalm et al., 2000; Casas et al., 2001). No presente estudo, verificamos que 100% das mães analisadas apresentaram níveis séricos detectáveis de IgG específica ao *Der p*, independente da sensibilização ao mesmo ácaro.

Outros estudos detectaram IgG alérgeno específica em uma porcentagem menor de indivíduos: Soliman e Rosenstreich (1986) estudaram 63 adultos com diagnóstico de asma crônica, e demonstraram que 24% apresentaram altos níveis de IgG específica na ausência de reatividade aos ácaros (determinada por teste de puntura). Rizzo (1993) ao estudar a resposta humoral aos ácaros da poeira domiciliar em crianças asmáticas, detectou IgG específica em 90% dos pacientes asmáticos, mas em apenas 15% dos pacientes controle, portanto não sensibilizados. Por outro lado, Kemeny (1989), demonstrou que a maioria dos indivíduos, sendo estes atópicos ou não, após exposição natural aos ácaros da poeira domiciliar ou pólen, respondem de maneira específica aos alérgenos através da síntese de anticorpos IgG1. Recentemente, Pereira e colaboradores (2005) avaliaram pacientes com rinite alérgica e detectaram IgG anti-*Bl t* em 100% dos indivíduos, independente da sensibilização ao ácaro, determinada por teste de puntura. Por fim, Bahrainwala e colaboradores (2005) estudaram 98 puérperas e detectaram IgG anti-*Der p* 1 no soro de 86% delas.

Uma observação que poderia explicar nosso índice de 100% é a alta exposição a ácaros da poeira domiciliar pelos moradores da região de Campinas-SP. Avaliação das espécies acarinas em poeira de cortinas (Binotti et al., 2005) e colchões (Oliveira et al., 2003) de domicílios da cidade de Campinas, mostra que o ácaro *D. pteronyssinus* é a espécie mais observada e geralmente encontrada em grandes concentrações. A segunda observação pode ser exemplificada com o estudo de Oliveira e colaboradores (1999) que avaliaram 124 moradores de Campinas com quadro clínico sugestivo de atopia e encontraram em média 3.254 ácaros de poeira fina na parte inferior dos colchões, sendo o *Der p* a principal espécie. Além da freqüente exposição ao ácaro, outra variável a ser considerada é a metodologia, pois quantificamos IgG específica ao extrato total do ácaro e não somente ao principal alérgeno.

Ao analisarmos a IgG anti-*Der p* no soro materno observamos que a concentração detectada variou mais de 25 vezes, tanto entre mães RAST+ como entre as de RAST-, ou seja, o nível de IgG específica difere muito de indivíduo para indivíduo, independente da reatividade ao mesmo ácaro. De maneira semelhante, estudo com o ácaro *Dermatophagoides farinae* mostrou que 24% dos pacientes asmáticos apresentavam altas concentrações na ausência de reatividade ao mesmo ácaro e por outro lado, 27% apresentavam reatividade alérgica, porém níveis normais de IgG específica (Soliman, 1986). Nosso estudo, por sua vez, demonstrou que mães sensibilizadas ao *Der p* (RAST+), além de alta concentração sérica de IgE específica, apresentaram maior concentração IgG anti-*Der p* quando comparada às de RAST-.

A literatura aponta que pacientes asmáticos e/ou com rinite alérgica apresentam níveis elevados de IgG anti-*Der p* quando comparados a indivíduos não sensibilizados (Stewart et al., 1988; Okahata et al., 1990; Rizzo et al., 1993; Aydogan, 2007), mas o papel da IgG nos mecanismos inflamatórios da asma ou rinite alérgica ainda é uma questão aberta na literatura. De fato, atualmente admite-se que ocorra o envolvimento de mecanismos outros, que não mediados pela IgE, que contribuam para a cronificação da resposta inflamatória alérgica. O fato da IgG fixar complemento e ter grande potencial pro-inflamatório (Abbas, 2005), assim como os níveis de IFN- γ encontrarem-se elevados no soro e no fluído brônquio-alveolar em pacientes asmáticos durante a

fase aguda da reação alérgica (Busse et al., 2001), nos faz acreditar que a classificação das inflamações alérgicas como doença mediadas somente por células Th2 é muito simplista.

Existem evidências que a transmissão passiva de anticorpos específicos tem a capacidade de influenciar significativamente o desenvolvimento imune da criança e o risco para sensibilização alérgica (Jarret, 1983). Assim, analisamos a transferência passiva destes anticorpos ao feto e lactente.

Ao analisarmos a passagem transplacentária de IgG total observamos que a taxa média de transferência foi de 144% portanto, a concentração no cordão umbilical superou a do soro materno, chegando a ser mais que o dobro em alguns recém-nascidos, tanto do grupo estudo como do grupo controle.

Kohler e Farr, já em 1966, mostraram que havia, em média mais anticorpos da classe IgG no cordão umbilical de recém-nascidos que no soro de suas respectivas mães. No mesmo ano, Michaux e colaboradores (1966), esclareceram o fato observando que o transporte de IgG era ativo quando os níveis séricos maternos de IgG total encontravam-se baixos ou dentro da faixa de normalidade mas, quando esses níveis eram altos (acima de 15 g/l), a IgG do cordão tendia a ser mais baixos que os níveis maternos correspondentes (Moraes-Pinto et al., 2001). No presente estudo, somente uma mãe apresentou nível de IgG total sérica um pouco acima de 15 g/l (15,4 g/l) mas, diferente da maioria, a IgG de seu respectivo recém-nascido não excedeu este valor e apresentou exatamente a mesma concentração do soro materno.

Investigamos a seguir a passagem transplacentária de anticorpos IgG específicos ao *Der p*. Verificamos que 100% das puérperas transferiram durante a gestação IgG anti-*Der p* aos seus respectivos recém-nascidos, em concentrações fortemente relacionadas aos próprios níveis séricos. Assim, demonstramos que a passagem transplacentária de IgG anti-*Der p* ocorre em maior concentração em mães sensibilizadas ao mesmo ácaro (RAST+) quando comparadas às não sensibilizadas (RAST-).

IgG específica a outros alérgenos, como OVA, *rBet v 1*, *Fel d 1* e *Der f 1* já foi detectada em níveis mais elevados no cordão umbilical de recém-nascidos de mães atópicas (Thomas et al., 2003; Prescott et al., 2000; Jenmalm et al., 1997), apesar de também ser encontrada em RNs de mães não atópicas freqüentemente expostas a tais alérgenos (Mariani et al., 1992, Jenmalm et al., 1997). Baseado nos estudos da região de campinas (Oliveira et al.1999; Oliveira et al., 2000; Binotti et al., 2005) sabemos que provavelmente todas as mães estudadas foram expostas ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* durante a gestação, sugerindo que a maior concentração de IgG específica nos recém-nascidos de mães RAST+ não foi atribuída à maior exposição ao antígeno.

Os estudos relacionando a presença do *Der p 1* na mãe e no cordão umbilical são muito controversos (Jenmalm et al., 2000; Marks et al., 2002; Hagendorens et al., 2004; Schönberger et al., 2005) indicando que a mera presença deste alérgeno na circulação materna não garante sua transmissão ao recém-nascido existindo assim, outros mecanismos que influenciam o transporte. No entanto, a literatura mostra que há forte correlação entre a concentração sérica de IgG materna específica e a presença de alérgenos no recém-nascido (Bahrainwala et al., 2005) e, paradoxalmente, a exposição materna a alérgenos parece inibir potencialmente o desenvolvimento da alergia no respectivo filho (Jenmalm et al., 2000; Victor et al., 2003).

Camundongos têm sido usados para identificar os mecanismos de regulação da IgE nos primeiros anos de vida e os resultados mostram que, tanto os antígenos como a IgG materna específica, possuem grande efeito supressor da IgE do filhote, sendo capaz de inibir a hipersensibilidade tipo 1 (Jarrett et al., 1983; Seenger et al., 1998; Melkild et al., 2002; Victor et al., 2003).

Embora este mecanismo ainda não esteja bem estabelecido, Jarrett e colaboradores (1983) foram os primeiros a chamar a atenção sobre a possibilidade de que a IgG materna pudesse ser responsável pela supressão da produção de IgE pelo RN. O efeito protetor deste mecanismo deve estar relacionado aos próprios anticorpos ou à imunecomplexos, comumente encontrados no cordão umbilical (Hall et al., 1987). A ligação da IgG ao alérgeno esconde seus determinantes antigênicos e permite sua

eliminação através da fagocitose por macrófagos, já os imunocomplexos, facilitam a ligação cruzada do antígeno e da IgG materna ao BCR e FcγRIIb nos linfócitos B neonatais responsável pela inibição da síntese de anticorpos (Boyle et al., 2006).

Estes mesmos mecanismos podem ocorrer nos RN humanos, uma vez que Dannaeus e colaboradores (1978) demonstraram que altos níveis de IgG específica para proteínas do leite e ovo no cordão umbilical parecem proteger contra o desenvolvimento de atopia nos primeiros 2 anos de vida. No entanto, Jenmalm e Björkstén (2000), observaram que altos níveis de IgG específica somente a aeroalérgenos (pêlo de gato e pólen), mas não aos alérgenos do leite e ovo, estavam associados a um menor índice de desenvolvimento de atopia nos primeiros 8 anos de vida.

Uma limitação de nosso estudo foi que não investigamos as subclasses dos anticorpos. Muitos pesquisadores atribuem o papel protetor da IgG à subclasse IgG4, que seria produzida em resposta a exposição antigênica prolongada e capaz de neutralizar o antígeno ou bloquear o anticorpo (Gondo et al., 1987; Aalberse et al., 1993; Mori et al., 2001), enquanto que a IgG1, seria consequência da exposição natural e reflexo da resposta imune normal ao alérgeno (Almeida et al., 2006).

Há indicações de que a concentração de IgG4 encontra-se mais elevada em indivíduos com alergia respiratória quando comparadas aos não alérgicos, enquanto que os níveis de IgG1 parecem ser similares (Steward et al., 1988; Okahata et al., 1990; Rizzo et al., 1993; Jenmalm & Björkstén, 2000; Casas et al., 2001). No entanto, em relação ao ácaro *Bl t*, Pereira e colaboradores (2005) relataram que a concentração de IgG1 específica foi maior nos indivíduos sensibilizados. Prescott (2000), ao estudar o nível de anticorpos no cordão umbilical, observou concentrações mais elevadas de IgG4 específica ao ácaro da poeira domiciliar nos recém-nascidos de mães com história de atopia e verificou correlação positiva entre o nível de IgE materno.

Tais diferenças no padrão de anticorpos produzidos em resposta à exposição antigênica poderiam ajudar a explicar a observação de que a taxa média de transferência da IgG anti-*Der p* foi um pouco abaixo do encontrado para IgG total

(103%) e por essa razão, o nível de anticorpos específicos dos recém-nascidos foi bem semelhante ao nível materno, sem diferença significativa entre ambos. A concentração final de anticorpo na circulação neonatal para cada especificidade antigênica depende, além dos níveis maternos, da classe à qual pertencem. No entanto, estudos sobre a eficiência das IgGs em atravessarem a placenta ainda mostram resultados controversos, provavelmente por utilizarem diferentes metodologias e limitações éticas óbvias nos experimentos. Ensaio de perfusão *in vitro* da placenta indicou que a habilidade das IgGs em transpor a interface materno-fetal é maior para IgG4>IgG1>IgG3>IgG2 (Malek et al., 1995) mas outros autores acreditam que a IgG1 e a IgG3 possuem maior eficiência, seguidas da IgG4 e IgG2 (Moraes-Pinto, 2001). Outros estudos indicam que os níveis de IgG1 no recém-nascido, logo após ao nascimento, geralmente excedem os maternos, os da IgG2 geralmente são mais baixos, os da IgG3 são tipicamente iguais aos níveis maternos e os da IgG4 são mais variáveis, porém geralmente se igualam aos maternos. (Simister et al., 1997 e Simister, 2003).

Baseado nas literaturas aqui descritas, mas sem levar em consideração a predisposição genética, podemos supor que a sensibilização materna ao *Dermatophagoides pteronyssinus* protege a criança contra o desenvolvimento de doenças alérgicas, por transmitir através da placenta altas concentrações de IgG total e específica ao mesmo ácaro, com potencial para suprimir a ação da IgE nos primeiros anos de vida.

Sabemos que durante o primeiro ano de vida há intensa interação entre mãe e RN durante a amamentação. Nesta fase, o sistema imune do recém-nascido não está completamente desenvolvido e, conseqüentemente, a suscetibilidade às infecções virais e bacterianas é maior. É também neste mesmo período, que a sensibilização aos alérgenos ambientais ocorre mais comumente (Böttcher et al., 2000).

Ao investigarmos os níveis de S-IgA total e específica no colostro de mães sensibilizadas não encontramos diferença significativa quando comparadas às não sensibilizadas. Semelhante ao presente estudo, Duchén e colaboradores (2000) detectaram S-IgA específica a alérgenos do gato em amostras de leite, mesmo de mães

que não eram expostas ao animal, sem haver diferença de concentração entre mães alérgicas e não alérgicas. No entanto, grande parte dos estudos relaciona os níveis de S-IgA de colostro com a predisposição do lactente em desenvolver alergia alimentar, e não do estado de atopia materno.

A relação entre amamentação e alergia ainda é pouco conhecida. Muitos pesquisadores investigam se o leite materno pode conferir proteção ao lactente contra doenças alérgicas, mas os estudos epidemiológicos mostram resultados bastante controversos (Järvinen et al., 2000; Odijk et al., 2003; Friedman et al., 2005). Em relação à alergia alimentar, há indicações que quanto menor a concentração de IgA específica no colostro, maior é a exposição da mucosa intestinal do recém-nascido ao potencial alérgico e conseqüentemente, maior o risco das alergias como eczema atópico (Calbi et al., 1998; Järvinen et al., 2000). Por sua vez, baixos níveis de S-IgA total no colostro também aumentam a suscetibilidade da mucosa intestinal do recém-nascido às infecções (Cunningham et al., 1991; Achi et al., 1992). Com base na hipótese de que o aumento da incidência de alergias respiratórias é causado pela diminuição nas infecções durante a infância (Renz et al., 2006), baixa concentração de S-IgA no colostro poderia ser benéfica para prevenção da atopia no recém-nascido, pois permitiria maior estímulo antigênico na mucosa intestinal e, conseqüentemente, auxilia na inversão da polarização Th2, característica de todo recém-nascido, para Th1.

Nossos resultados mostraram que a concentração de S-IgA, tanto total como específica anti-*Der p*, variou muito entre as mães, independente da sensibilização ao ácaro. Além da S-IgA outros fatores imunológicos responsáveis pela imunoproteção conferida pelo leite materno também variam bastante de mãe para mãe, como por exemplo o TGF- β (Järvinen et al., 2000). Análises demonstraram que esta citocina do colostro é essencial para induzir tolerância à alérgenos no lactente mediada por células regulatórias (Verhasselt et al., 2008), além de estar envolvida na regulação negativa da síntese de IgE e na produção de IgA (Böttcher et al., 2000). Assim, a concentração de S-IgA anti-*Der p* no colostro pode ser influenciada pela produção de TGF- β que, conseqüentemente, interfere na atopia materna e na tolerância do lactente.

Devemos também pensar que se a S-IgA exerce algum mecanismo de regulação da alergia é de se esperar que este seja antígeno-específico como ocorre com os

patógenos. Uma hipótese é que a S-IgA poderia reduzir a quantidade de alérgenos antes do contato com o lactente através da formação de imune-complexos no leite materno e posterior fagocitose por macrófagos também presentes no leite humano (Järvinen et al., 2000).

Fusaro e colaboradores (2007) demonstraram que camundongos imunizados com OVA e expostos ao antígeno durante a gestação e amamentação, apresentaram 4 vezes menos OVA no leite em relação aos não imunizados, além de inibir a resposta IgE específica da prole após exposição pós-natal ao antígeno. Okamoto (1989) também observou que altas doses de OVA impedem a detecção de peptídeos no leite, no entanto, sem produção de anticorpos IgA anti-OVA.

Recentemente, Valérie e colaboradores (2008) demonstraram em camundongos, que alérgeno inalado pela mãe é transferido através da amamentação e resulta em proteção contra inflamação das vias aéreas da prole, comprovada pela diminuição da eosinofilia, muco, citocinas padrão Th2 e hiperreatividade brônquica. Demonstraram também que a proteção pode ser conferida independente dos anticorpos, pois camundongos amamentados por mães com ausência de imunoglobulina, continuaram tolerantes ao alérgeno.

Nosso estudo mostrou pela primeira vez que em humanos, mães fornecem passivamente aos seus filhos S-IgA específica ao *Dermatophagoides pteronyssinus*. Os achados acima relatados e o fato de não encontramos diferença nos níveis de S-IgA específica entre mães RAST+ e RAST-, nos leva a acreditar que se a S-IgA anti-*Der p* tem o potencial de influenciar a imunossupressão da alergia no recém-nascido, este é independente da sensibilização materna ao mesmo ácaro.

Sendo constatada a passagem transplacentária de IgG anti-*Der p* e a presença de IgA anti-*Der p* no colostro tanto de mães atópicas como de mães normais, seria importante verificar se a capacidade funcional dos anticorpos se comporta de maneira semelhante entre os dois grupos e se pode influenciar na taxa de transferências dos anticorpos. Optamos pelo método baseado no ELISA utilizando tiocianato de potássio, pois é considerado um bom método para avaliar a avidéz relativa de IgE específica à

epítomos de proteínas alergênicas em extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Poirier et al., 1997).

O índice de avidéz relativa é medida como o equilíbrio constante entre um antígeno e o anticorpo dependendo da afinidade e da valência entre os ligantes (Steward et al., 1985). A relevância da avidéz nas doenças alérgicas é pouco conhecida e não há trabalhos que descrevam a avidéz específica à alérgenos em anticorpos presentes no colostro e no cordão umbilical.

Sabe-se que a exposição prolongada a antígenos desencadeia mudanças funcionais e estruturais nas imunoglobulinas através da hipermutação somática, levando a maturação na afinidade do anticorpo, e do “switch” de classe, que promove mudanças funcionais específicas após encontro secundário com o antígeno (Abbas, 2005). O que também se verifica, é que alta exposição antigênica ambiental pode induzir uma grande produção de anticorpos com menor avidéz comparativamente a populações menos expostas (Hanson et al., 1990), de forma que uma alta produção de anticorpos possa compensar a baixa avidéz (Hanson et al., 1988; Nagao et al., 1995).

Já foi demonstrado, em adolescentes de 18 anos, que há aparente relação inversa entre a concentração e a afinidade dos anticorpos em se ligarem aos alérgenos (Pierson-Mullany et al., 2002). Assim, na presença de estímulo antigênico constante, como ocorre com o *Dermatophagoides pteronyssinus*, a resposta se direciona para a combinação mais eficiente entre concentração e afinidade operando por feed-back negativo entre os dois (Jachola et al., 2005).

De acordo com essas observações, verificamos que a concentração sérica da IgG anti-*Der p* mostrou ser inversamente relacionada com seu índice de avidéz específica (Pearson $r=-0,2$, $p=0,03$) assim, os índices relativos de avidéz tenderam a ser mais baixos em puérperas com alta concentração de IgG anti-*Der p*. Detectamos, por sua vez, índices de avidéz bastante similares entre as amostras pareadas indicando que grande parte dos recém-nascidos aqui avaliados receberam através da placenta anticorpos IgG anti-*Der p* com a mesma a atividade funcional específica de sua respectiva mãe.

El-Khouly e colaboradores (2007), também utilizando a técnica de tiocianato de potássio, estudaram a relação da avidéz na alergia alimentar e concluíram que aparentemente, a avidéz da IgE e IgG específicas ao extrato de amendoim não influencia na severidade da doença, nem nos resultados de teste de puntura. Já em relação à afinidade dos anticorpos específicos ao alérgeno de grama Amb 1, Jachola e colaboradores (2002), demonstraram que o grupo de não atópicos apresentaram IgG1 com afinidade significativamente mais elevada quando comparada aos indivíduos atópicos que, por sua vez, apresentaram alta afinidade da IgE.

Em relação à IgG total, no presente trabalho, a avidéz específica do grupo estudo foi muito semelhante a observada no grupo controle, assim como não observamos correlação entre avidéz específica e concentração sérica de IgE, tanto total como anti-*Der p*. Sabemos que o método de eluição com tiocianato tem a vantagem de ser um método simples, que fornece uma medida geral e real do índice de avidéz específica, mas uma população pequena de anticorpos com alta avidéz pode ser mascarada, dificultando a análise.

Como a avidéz dos anticorpos afeta a passagem transplacentária ainda não está claro. Estudos mostraram que os anticorpos específicos para os antígenos da *Escherichia coli* transferidos no início da gestação, portanto em concentrações mais baixas, apresentam maior afinidade quando comparados aos do final da gestação (Avanzini et al., 1998; Sennhauser et al., 1990). Este transporte preferencial de anticorpos de alta afinidade em RN pré-termo seria importante para aumentar a capacidade de proteção em relação à baixa concentração dos anticorpos.

Nossos resultados sugerem que não deve existir mecanismo de seleção de anticorpos IgG em relação à avidéz específica ao *Der p*. Acreditamos que uma vez que a avidéz é determinada pelo fragmento Fab, e a passagem transplacentária pelo fragmento Fc, a seleção está relacionada com o número de receptores FcRN na vilosidade fetal bem como à sua afinidade pelas diferentes subclasses.

Alguns autores também sugerem que exista correlação entre a avidéz dos anticorpos e sua capacidade opsonizante (Sennhauser et al., 1990; Lucas et al., 1995; Obaro et al., 2004). O fato de demonstrarmos que a S-IgA apresenta maior índice de

avidez ao *Der p* quando comparada a IgG materna e do cordão umbilical é interessante, pois o alto índice de avidez a torna eficaz para neutralizar e impedir a fixação e entrada do alérgeno através da barreira mucosa. Visto que a S-IgA também exerce papel de neutralizar enzimas (Hanson et al., 1994), sua presença na mucosa pode ser importante para evitar que o *Der p* 1 clive os componentes das junções compactas entre as células epiteliais (Wan et al., 1999). Não há estudos mostrando a relação da avidez S-IgA anti-*Der p* com desenvolvimento de alergia e não se sabe a exata afinidade necessária para neutralizar e eliminar patógenos e toxinas. No entanto, comparações com anticorpos monoméricos (Ma et al., 1998) e anticorpos neutralizantes de outras classes (Macpherson et al., 2008), mostram que a pIgA realiza tal função com maior eficiência; provavelmente pela presença da cadeia J que fornece a IgA maior avidez aos antígenos (Brandtzaeg et al., 1984).

Com base nessas observações acreditamos que a amamentação é importante, pois além de todos os fatores nutricionais e imunológicos já conhecidos (Hanson et al., 1988), fornece S-IgA com potencial para neutralizar de maneira específica o *Der p* e impedir sua entrada através da mucosa, tanto em lactentes de mães sensibilizadas como de mães não sensibilizadas.

Nossos resultados demonstraram que anticorpos IgG e S-IgA específicos ao *Dermatophagoides pteronyssinus* são transferidos passivamente para o feto durante a gestação e recém-nascido durante a amamentação, sem haver seleção quanto à avidez destes anticorpos. No entanto, a passagem transplacentária de IgG total e específica foi maior em mães sensibilizadas ao mesmo ácaro quando comparadas às não sensibilizadas, indicando que a sensibilização materna pode influenciar a resposta imune fetal. Uma vez que a transferência de anticorpos maternos representa um importante mecanismo para imunomodulação das respostas alérgicas, e que esta tem o potencial de ser modulada por intervenções neonatais, acreditamos que a caracterização na transferência passiva de anticorpos alérgeno-específicos ao recém-nascido contribua com os avanços na elaboração de estratégias adequadas e específicas de prevenção da sensibilização alérgica durante o desenvolvimento fetal e primeiros anos de vida.

6 Conclusão

- Anticorpos IgG e S-IgA anti-*Der* são transferidos via placenta e colostro materno, respectivamente, em concentrações bastante variáveis entre os indivíduos.
- A concentração de IgG anti-*Der p* transferida ao recém-nascido apresenta importante correlação com os níveis maternos.
- A IgG dos recém nascidos apresenta índice de avidéz específico ao *Der p* semelhante ao de suas respectivas mães.
- Recém-nascidos de mães sensibilizadas ao *Der p* apresentam maior concentrações de IgG total e específica anti-*Der p* no cordão umbilical, quando comparados aos de não sensibilizadas.
- Não há diferença nos níveis de S-IgA anti-*Der p* no colostro entre mães sensibilizadas e não sensibilizadas ao mesmo ácaro.
- A sensibilização ao *Der p* não interfere na avidéz dos anticorpos IgG e S-IgA específica ao *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Referências Bibliográficas

- Aalberse RC, Van Milligen F, Tan KY, Stapel SO. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy*. 1993; 48:559-69.
- Abbas AK, Lichtman AH. Mecanismos efetores da resposta imune. In: *Imunologia celular & molecular*. Abbas AK. 5. ed. Rio Janeiro: Elsevier; 2005. p. 307-26.
- Albanese CT, Smith SD, Watkins S, Kurkchubasche AK, Simmons RL, Rowe MI . Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. *J Am Coll Surg*. 1994;179(6):679-88.
- Almeida KC, Gennai-Cardoso ML, Cunha-Júnior J.P, Ynoue LH, Alves R, Resende R.O, Sung S.J, Taketomi E,A. Responses of IgE, IgG1 and IgG4 to concavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. *Bras J Med Biol Res*. 2006; 39: 1445-54.
- Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernan-dez-Caldas E, Baggio D. Platts Mills TAE, Naspitz CK. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy*. 1991;21:433-9.
- Arruda LK, Ferriani VP, Vailes LD, Pomés A, Chapman MD. Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001;1(5):466-73.
- Avanzini MA, Pignatti P, Chirico G, Gasparoni A, Jalil F, Hanson LA. Placental transfer favours high avidity IgG antibodies. *Acta Paediatr*. 1998;87:180-5.
- Aydogan M, Mete N, Yazı D, Akkoc T, Ozdemir C, Blaser K, et al. Comparison of Der p1-specific antibody levels in children with allergic airway disease and healthy controls. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18:320-5.
- Bahrainwala A, Hassan S, Long M, Kaplan J. Cord blood house dust mite allergens in newborns: relationship to maternal blood levels of allergen and allergen specific IgG and IgE. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;95:480-3.
- Barros MD, Kulesza TM, Rañna W, Carneiro-Sampaio M. Papel do leite materno da defesa do lactente contra infecções. *Pediatrics*. 1982;4:88-102.
- Bednar-Tantscher E, Mudde GC, Rot A. Maternal Antigen Stimulation Downregulates via mother's milk the specific immune responses in Young mice. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;126:300-8.
- Binotti RS, Oliveira CH, Santos JC, Binotti CS, Muniz JRO, Prado A P. Survey of acarine in dust samplings of curtains in the city of campinas, Brasil *Braz J Biol* 2005; 65(1):25-28.

Björkstén B, Clayton T, Ellwood P, Stewart A, Strachan D, ISAAC Phase III Study Group. Worldwide time trends for symptoms of rhinitis and conjunctivitis: Phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008;19:110-24.

Bochner BS, Busse WW. Mechanisms of asthma and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115:953-59.

Böttcher MF, Jenmalm MC, Björkstén B, Garofalo RP. Cytokines in Breast Milk from Allergic and Nonallergic Mothers. *Pediatr Res.* 2000;47:157-62.

Boyle RJ, Tang MLK. Can allergic diseases be prevented prenatally? *Allergy.* 2006;60:1423-31.

Bousquet J, Coulomb Y, Arrendal H, Robinet-Levy M, Michel FB. Total serum IgE concentration in adolescents and adults using the Phadebas IgE PRIST technique. *Allergy.* 1982;37:397-406.

Brambell FWR, Hemmings WA, McCarthy EF, Kerkwick RA. The passage into the embryonic yolk-sac cavity of maternal plasma protein in rabbits. *J Physiol.* 1949;108:177-85.

Brandtzaeg P. The secretory immune system of lactating human mammary glands compared with other exocrine organs. *Ann N Y Acad Sci* 1983;409:353-81.

Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature.* 1984; 311,71-73.

Brandtzaeg P. Humoral Immune Response Patterns of Human Mucosae: Induction and Relation to Bacterial Respiratory Tract Infections Disease. *J Infect Dis.* 1992;165(1):S167-176.

Brandtzaeg P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine.* 2003;21:3382–3388.

Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev.* 2005; 206: 32–63.

Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS.* 1995;103:1-19.

Bronswijk J. House dust biology for allergist, acarologist and mycologists. Zoelmond: JEMH; 1981.

Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Méd.* 2001;344:350-62.

Calbi M, Giacchetti L. Low breast milk IgA and high blood eosinophil count in breast-fed newborns determine higher risk for developing atopic eczema after an 18-month follow-up. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1998;8(3):161-64.

Carvalho AF, Fusaro AE, Oliveira CR, Brito CA, Duarte AJS, Sato M. *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* mites evoke distinct airway cellular influx in type I hypersensitivity murine model. *J Clin Immunol*. 2004;24:533-40.

Casas R, Böttcher MF, Duchén K, Björkstén B. Detection of IgA antibodies to cat, beta-lactoglobulin, and ovalbumin allergens in human milk. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:1236-40.

Casas R, Björkstén B. Detection of Fe d 1-immunoglobulin G immune complexes in cord blood and sera from allergic and non-allergic mothers. *Pediatr Allergy Immunol*. 2001;12: 59-64.

Chan-Yeung M, McClean PA, Sandell PR, Slutsky AS, Zamel N. Sensitization to cat without direct exposure to cats. *Clin Exp Allergy*. 1999;29(6):725-8.

Chew FT, YI FC, Chua KY, Fernandez-Caldas E, Arruda LK, Chapman MD, Lee BW. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy*. 1999;29: 982-88.

Comoy EE, Pestel J, Duez C, Stewart GA, Vendeville C, et al. The house dust mite allergens, *Dermatophagoides pteronyssinus*, promotes type 2 response by modulating the balance between IL-4 and IFN- γ . *J Immunol*. 1998;160:2456-62.

Critério Padrão de Classificação Econômica Brasil/2008. O Novo Critério Padrão de Classificação Econômica Brasil. Disponível em: www.abep.org/codigosguias/Criterio_Brasil_2008. [2007 out 02].

Dannaeus A, Johansson SGO, Fourcard T. Clinical and immunological aspects of food allergy. II. Development of Allergic symptoms and humoral immune response to foods in infants of atopic mothers during the first 24 months of life. *Acta Paed Scand*. 1978;67: 497.

Dati F, Schumman G, Thomas L. Consensus of a group of Professional societies and diagnostic companies on guidelines for reference ranges for 14 protein in serum base on the standardization against the IFCC/BCR/CAP. International Federation of Clinical Chemistry. Community Bureau of reference of commission of the European Communities. College of American Pathologists. *Eur J Clin Biochem*. 1996;34:517-520.

Deverelux G, Seaton A, Barber RN. In utero priming of allergen-specific helper T-cells. *Clin Exp Allergy*. 2001;31: 1686-95.

Dickinson EC, Gorga JC, Garrett M, et al. Immunoglobulin A supplementation abrogates bacterial translocation and preserves the architecture of the intestinal epithelium. *Surgery*. 1998;124:284–90.

Duchén K, Casas R, Fageras-Böttcher M, Yu G, Björkstén B. Human milk polynsaturated long-chain fatty acids and secretory immunoglobulin A antibodies and early childhood allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2000;11:29-39.

Edelbauer M, Loibichler C, Nentwich I, Gerstmayr M, Urbanek R, Sze´ pfalusi Z. Maternally delivered nutritive allergens in cord blood and in placental tissue of term and preterm neonates. *Clin Exp Allergy.* 2004;34: 189-93.

El-Khouly F, Lewis SA, Pons L, Burks AW, Hourihane JO. IgG and IgE avidity characteristics of peanut allergic individuals. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007;18(7):607-13.

Fallon PG, Mangan NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:220-30.

Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo LR. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy.* 1993; 23(4):292-7.

Frew AJ. How does sublingual immunotherapy work? *J allergy clinical immunol.* 2007;120(3)533-36.

Friedman NJ, Zeiger RS. The role of breast-feeding in the development of allergies and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1238-48.

Fusaro AE, Brito CA, Victor JR, Rigato PO, Goldoni AL, Duarte AJ, Sato MN. Maternal-fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. *Immunology.* 2007;122 (1):107-15.

Geller M. Alergia aos ácaros no Rio de Janeiro: análise prospectiva em 700 pacientes com asma e (ou) rinite. *J Bras Med* 1996;71:164-70

Georas, SN, Guo JFU, Casolaro V. T_H helper cell type₂ regulation in allergic disease. *Eur Respir J.* 2005;26,1119–37.

Glovsky MM, Ghekiere L, Rejzec E. Effect of maternal immunotherapy on immediate skin test reactivity, specific rye I IgG and IgE antibody, and total IgE of the children. *Ann Allergy.* 1991;67: 21-24.

Goldman AS, Goldblum RM. Defence agents in human milk. In: Jensen RG, editor. *Handbook of milk composition.* San Diego: Academic Press; 1995. p. 727-45.

Gondo A, Saeki N, Tokuda Y. IgG4 antibodies in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1987; 117(3):301-10

Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:205-17.

Hagendorens MM, Ebo DG, Bridts CH, Van de Water L, De Clerck LS, Stevens WJ. Prenatal exposure to house dust mite allergen (Der p 1), cord blood T cell phenotype and cytokine production and atopic dermatitis during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004;15:308-15.

Hall EP, Gault EA. Regulation of rat IgE responses by immune complexes. *Immunology.* 1987;61: 415-19.

Hamilton RG, Adkinson Jr NF. Assessment of human allergic disease. In: Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W editors. *Clinical Immunology, Principles and Practice.* St Louis: Mosby Yearbook; 1996. p. 2169-86.

Hammad H, Lambrech B.N. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:193-204.

Hanson LA: Comparative immunologic studies of the immune globulins of human milk and of blood serum. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1961;18:241-67.

Hanson LA, Anderson B, Carlsson B, Catrignano SB, Hahn-Zoric, Dahlgren V. Breastfeeding protects against infections and allergy. *Breastfeeding Rev.* 1988;13:19-22.

Hanson LA, Ashraf R, Cruz JR, Hahn-Zoric M, Jalil F, Nave F, Reimer M, Zaman S, Carlsson B. Immunity related to exposition and bacterial colonization of the infant. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1990;365:38-45.

Hanson LA, Hahn-Zoric M, Berndes M, Asraf R, Herias V, Jalil F, Bhutta TI, Laeeq A, Mattsby-Baltzer I. Breast feeding: overview and breast milk immunology. *Acta Paediatr Jpn.* 1994;36(5):557-61.

Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, et al. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr Intern.* 2002;44:347-52.

Hertz-Picciotto I, Park HY, Dostal M, Kocan A, Trnovec T, Sram R. Prenatal Exposures to Persistent and Non-Persistent Organic Compounds and Effects on Immune System Development. *J compilation.* 2008;102:146–54.

Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* 2008. 8:218-30.

Holloway JA, Warner JO, Vance GHS, Diaper ND, Warner JA, Jones CA. Detection of house-dust-mite allergen in amniotic fluid and umbilical-cord blood. *The Lancet.* 2000; 356.

Holt PG, Batty JE, Turner KJ. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology.* 1981;42(3):409-17.

Holt PG, O'Keeffe PO, Holt BJ, Upham JW, Baron-Hay MJ, et al. T cell "priming" against environmental allergens in human neonate: sequential deletion of food antigens

specificities during infancy with concomitant expansion of responses to ubiquitous inhalant allergens. *Pediatr Allergy Immunol.* 1995;6:85-90.

Holt GP, Macaubas C, Prescott SL, Sly PD. Primary sensitization to inhalant allergens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162: 91-4.

Holt PG, Thomas WR. Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues. *Nat Immunol.* 2005;6 (10) 957-60.

Ikura Y, Akimoto K, Odajima Y, Akazawa A, Nagakura T. How to prevent allergic disease. I. Study of specific IgE, IgG, and IgG4 antibodies in serum of pregnant mothers, cord blood, and infants. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989;88 (1-2): 250-2.

Jackola RD, Liebelera CL, Ching-Yuang L, Yi-Kai C, Blumenthal MN, Rosenberga A. Evidence that negative feedback between antibody concentration and affinity regulates humoral response consolidation to a non-infectious antigen in infants. *Mol Immunol.* 2005; 42:19–30.

Janeway CA. *Imunobiologia – o sistema imunológico na saúde e na doença.* Porto Alegre: Artes Médicas Sul; 2000.

Jarrett EEE, Hall E. IgE suppression by maternal IgG. *Immunology.* 1983;48: 49-57.

Jarret EEE. Perinatal influences on IgE responses. *The Lancet* 6: 797-799, 1984. Perinatal influences on IgE responses. *Lancet.* 1984;6;2(8406):797-9.

Järvinen KM, Laine ST, Järvenpää AL, Suomalainen HK. Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatr Res.* 2000;48 (4):457-62.

Järvinen KM, et al. Does Low IgA in Human Milk Predispose the Infant to Developed of Cow's Milk Allergy? *Pediatr Res.* 2000;48: 457-62.

Jenmalm MC, Holt PG, Björkstén B. Maternal influence on IgG subclass antibodies to Bet v 1 during the first 18 months of life as detected with a sensitive ELISA. *Allergy Immunol.* 1997;114:175-84.

Jenmalm MC; Björkstén 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 Expl Allergy.* 2000; 30: 34-40.

Johansen , F . E . & Brandtzaeg , P . Transcriptional regulation of the mucosal IgA system . *Trends Immunol.* 2004;(25):150-7.

Johansson SGO. Ed. *Clinical Workshop. IgE antibodies and the Pharmacia CAP System in allergy diagnosis.* Lidköping: Landströms, 1988.

Jones CL, MacDonald RA, Hosking CS, Robertson CM. Estimating the relative avidity of mucosal IgA for antigen. *J Immunol Methods.* 1987;105:11-7.

Jones CA, Holloway JA, Warner JO. Fetal immune responsiveness and routes of allergic sensitization. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2002;13 (suppl. 15): 19-22.

Kaan A, Dimich-Ward H, Manfreda J et al. Cord blood IgE : its determinants and prediction of development of asthma and other allergic disorders at 12 months. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000; 84:37-42.

Kelly D, Coutts AGP. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:177-85.

Kemeny DM, Urbanek R, Ewan P, McHugh S, Richards D, Patel S, et al. The subclass of IgG antibody in allergic disease: II. The IgG subclass of antibodies produced following natural exposure to dust mite and grass pollen in atopic and non-atopic individuals. *Clin Exp Allergy*. 1989;19(5):545-9.

Kerkhof M, Dubois AE, Postma DS, Schouten JP, de Monchy JG..Role and interpretation of total serum IgE measurements in the diagnosis of allergic airway disease in adults. *Allergy*. 2003;58(9):905-11.

Kitani S, Ito K, Miyamoto T. IgG, IgA, and IgM antibodies to mite in sera and sputa from asthmatic patients. *Ann Allergy*. 1985;55(4): 612-20.

Kohler PF, Farr RS. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature*. 1966;210:1070-5.

Kondo N, Kobayashi T, Shinoda S. et al. Cord blood lymphocyte responses to food antigens for the prediction of allergic disorders. *Arch Dis Child*. 1992;67: 1003-7.

Krause, T. et al. Frequency of atopy in the Arctic in 1987 and 1998. *Lancet*. 2002; 360,691–2.

Kuiper S, Muris JWM, Dompeling E, Schayck CP, Schönberger HJAM, Wesseling G, Knottnerus JA. Association between first-degree familial predisposition of asthma and atopy (total IgE) in newborns. *Clin Exp Allergy*. 2006;36 (5):594–601.

Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: Current concepts of Immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2007;1:7-35.

Lebman DA, Coffman R. Cytokines in the Mucosal Immune System. In: Ogra, PL, Strober W, Mestecky J, editors. *Handbook of Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press; 1994. p. 243-50.

Lenke H, Coutinho A, Lange H. Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes. *Trends Immunol*. 2004;25 (4):180-6.

Levin J. *Estatística Aplicada a Ciências Humanas*: Harbra; 1987.

Lopes MIL, Miranda PJ, Sarinho E. Use of the skin prick test and specific immunoglobulin E for the diagnosis of cockroach allergy *Diagnóstico de alergia a baratas*

no ambiente clínico: estudo comparativo entre o teste cutâneo e IgE específica. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82(3):204-9.

Lucas AH, Granoff DM. Functional Differences in Idiotypically Defined IgG1 Anti-Polysaccharide Antibodies Elicited by Vaccination with Haemophilus influenzae Type b Polysaccharide-Protein Conjugates. *J Immunol*. 1995;154(8): 4195-202.

Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med* 1998;4:601-6.

Macpherson AJ , McCoy KD, Johansen F-E, Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Nat Mucosal Immunol*. 2008;1(1):11-22.

Malek A, Sager R, Sakher A, Schneider H. Transport of immunoglobulin G and its subclasses across the in vitro perfused human placenta. *Am. J. Obst. Gynecol*. 1995. 173:760-67.

Mandic Z, Marusic M, Boranic M. Low levels of immunoglobulin A in children with intrinsic asthma: a possible protection against atopy. *Med Hypotheses*. 2004;62:600-4.

Mariani M-P, Price JF, Kemeny DM. The IgG subclass antibody response to an inhalant antigen (*Dermatophagoides pteronyssinus*) during the first year of life: evidence for early stimulation of the immune system following natural exposure. *Clin Exp Allergy*. 1992;22: 29-33.

Marks GB. Et al. Cord blood mononuclear cell cytokine responses in relation to maternal house dust mite allergens exposure. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:355-60.

Maxon RT, Jackson RJ, Smith S. The Protective Role of Enteral IgA Supplementation in Neonatal Gut Origin Sepsis. *J Pediatr Surg*. 1995;30(2):231-3.

Medeiros Jr. M, Figueredo JP. Sensibilização a aeroalérgenos em indivíduos portadores de asma brônquica e / ou rinite crônica em Salvador, Bahia. *Rev bras alerg imunopatol*. 1997. 20:143-54.

Melkild I, Groeng EC, Leikvold RB, Granum B, Lovik M. Maternal allergen immunization during pregnancy in a mouse model reduces adult allergy-related antibody responses in the offspring. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:1370-6.

Mellander L, Carlsson B, Hanson LA. Secretory IgA and IgM antibodies to E. coli and poliovirus type 1 antigens occur in amniotic fluid, meconium and saliva from newborns. A neonatal immune response without antigen exposure- a result of anti-idiotypic induction? *Clin Exp Immunol*. 1986;63:555-61.

Michaux JL, Heremans JF, Hitzig WH. Immunoglobulin levels in cord-blood serum of negroes and caucasians. *Trop Geogr Méd*. 1966;18:10-4.

Michils A, Vervier I, Choufani G, Gossart B, Duchateau J. Relationship between allergic status and specificity of IgG antibody to inhaled allergens: the grass pollen model. *Clinical and Experimental Allergy*, 1999;29:832-9.

Michils A. Relationship between allergic status and specificity of IgG antibody to inhaled allergens: the grass pollen model. *Clinical and Experimental Allergy*, 1999;832-9.

Miller RL, Chew GL, Bell CA, Biedermann SA, Aggarwal M, Kinney PL, Tsai WY, Whyatt RM, et al. Prenatal exposure, maternal sensitization, and sensitization in utero to indoor allergens in an inner-city cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(6):995-1001.

Montealegre F, Sepulveda A, Bayona M, Quiñones C, Fernández-Caldas E. Identification of the domestic mite fauna of Puerto Rico. *Health Sci J*. 1997;16(2):109-16.

Moraes-Pinto MI, Iazzetti AV, Farhat CL. Transporte transplacentário de anticorpos: implicações na proteção do recém nascido e em estratégias de imunização. *Rev Paula Ped*. 2001;19:87-92.

Mori J.C, Pires M.C, Galvão C.E, Ferreira de Melo J, Golcher F.M, Montealegre F. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG subclasses in atopic dermatitis patients. *Allergy*, 2001. 56(2):180-4.

Nadchatram M. House dust mites, our intimate associates. *Trop Biomed*. 2005; 22(1):23-37.

Nafstad P, Magnus P, Gaarder P I, Jackola JJ. Exposure to pets and atopy-related diseases in the first 4 years of life. *Allergy*. 2001;56:307-12.

Nagao AT, Carneiro-Sampaio MMS, Carlsson B, Hanson LA. Antibody titre and avidity in saliva and serum are not impaired in mildly to moderately undernourished children. *J Trop Pediatr*. 1995;41(3):153-7.

Nagao AT, Friedlander-Del D, Arslanian C, Carneiro-Sampaio S. Elevated levels and different repertoire profile of colostral anti-LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity. *Scand J Immunol*. 2001;53:602-9.

Naspitz CK, Solé D, Jacob C A, Sarinho E, Soares FJP, Dantas V et al., Sensitization to inhalant and food allergens in Brazilian atopic children by in vitro total and specific IgE assay. *Allergy Project . PROAL. J Pediatr (Rio J)*. 2004;80(3):203-10.

Wayne PA. National committee for clinical laboratory standards. Procedures for the handling and processing of blood specimens. NCCLS Document H18-A2, NCCLS Press; 1999.

Obaro SK, Deubzer HE, Newman VO, Adegbola RA, Greenwood BM, Henderson DC. Serotype-specific pneumococcal antibodies in breast milk of Gambian women immunized with a pneumococcal polysaccharide vaccine during pregnancy. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23(11):1023-9.

Odijk J, Kull I, Borres MP, Brandtzaeg P, Edberg U, et al. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestation. *Allergy*. 2003;58:833-43.

Okahata H, et al., Development of serum Dermatophagoides farinae-, ovalbumin- and lactobumin- specific IgG, IgG1, IgG4, IgA and IgM in children with bronchial asthma/allergic rhinitis or atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*. 1990;20(1): 39-44.

Okamoto Y, Freiherst J, Ogra PL. Maternal determinants of neonatal immune response to ovalbumin: Effect of breast feeding on development of anti-ovalbumin antibody in the neonate. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;89:83-9.

Olivera CH, Graudenz GS, Gonçalves BS, Villela CA, Pinho Jr AJ, Lazzarini S. Prevalência de sensibilização em atópicos de Campinas - SP. *Anais XXV Cong Bras Alerg e Imunopatol*. 1996;19 (supl). [Congresso da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia; 1996].

Oliveira CH, Taketa LMH, Jiun HS, Gruenwaldt J, Graudenz GS, Barros PMG, Pinho JAJ, Lazzarini S. Avaliação da sensibilidade imediata a aeroalérgenos em alunos de graduação do curso de medicina. *Rev bras alerg imunopatol*. 1998;21:3-8.

Oliveira CH, Binotti RS. House dust mites in mattresses in the city of Campinas – SP. *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 1999;22(6):188-97.

Oliveira CH, Binotti RS, Muniz JR, dos Santos JC, do Prado AP, de Pinho AJ Jr. Comparison of house dust mites found on different mattress surfaces. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;91(6):559-62.

Orgel HA, Hamburger RN, Bazaral M et al. Development of IgE and allergy in infancy. *J Allergy Clin Immunol*. 1975;56:296–307.

Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C, ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;62:758–66.

Pereira EAL, Silva DAO, Cunha-Junior JP, Almeida KC, Alaves R, Sung SJ, Taketomi EA. IgE, IgG1 and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. *Allergy*. 2005;60:401-6.

Platts-Mills TA, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Champman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;89:1046-60.

Platts-Mills TAE, Erwin EA, Allison AB, Blumenthal K, Barr M, Sredl D, Burge H, Gold D. The relevance of maternal immune responses to inhalant allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first 2 years of life. *J allergy Clin Immunol*. 2003;30: 111-23.

Poirier MP, Ahlstedt S, Ford J; Dolen WK. Use of Thiocyanate Elution to Estimate Relative Avidity of Allergen Specific IgE Antibodies. *Allergy Asthma Proc.* 1997;18(6):359-62.

Prescott SL, et al. Effects of maternal allergen-specific IgG in cord blood on early postnatal development of allergen-specific T-cell immunity. *Allergy.* 2000;55: 470-5.

Prescott SL. The significance of immune responses to allergens in early life. *Clin Exp Allergy.* 2001;31:1167-69.

Prescott SL. Allergy: when does it begin and where will it end? *Allergy.* 2003;58: 864-7.

Raduresco L, Antohe F, Jinga V, Ghetie V, Simionescu M. Neonatal Fc receptors discriminate and monitor the pathway of native and modified immunoglobulin G in placental endothelial cells. *Hum Immunol.* 2004;65:578-85.

Renz H, Blümer N, Virna S, Sel S, Garn H. The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem Immunol Allergy.* 2006;91:30-48.

Rizzo MC, Arruda LK, Chapman MD, Fernandez-Caldas E, Baggio D, Platts-Mills TA, Naspitz CK. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brasil. *Ann Allergy.* 1993;71(2): 152-8.

Rizzo MC, Solé D, Rizzo A, Holanda MA, Rios JBM, Wandalsen NF, et al. Etiologia da doença atópica em crianças brasileiras, estudo multicêntrico. *J Pediatr.* 1995;71:31-5.

Rizzo MCV, Fernandez-Caldas E, Sole D, Naspitz CK. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in São Paulo, Brazil. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1997;7:242-8.

Roopenian CD, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:715-25.

Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quazeita JM. Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *J Exp Med.* 1977;146:311.

Sanderson IR, Walker WA. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 1993;104:622–39.

Sarinho E, Fernandez-Caldas E, Just E, Solé D. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade de Recife-Per-nambuco. *Rev bras alerg imunopatol.* 1996;19: 228-30.

Sarinho E, Rizzo MC, Just E, Fernandez-Caldas E, Sole D. Sensibilização aos ácaros domésticos em crianças atópicas e não-atópicas de Recife, PE, Brasil. *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2000;23:105-10.

Schönberger HJ, Dompeling E, Knottnerus JA, Kuiper S, van Weel C, van Schayck CP. Prenatal exposure to mite and pet allergens and total serum IgE at birth in high-risk children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16:27-31.

Schulz O, Sewell HF, Shakib F. Proteolytic cleavage of CD25, the alpha subunit of the human T cell interleukin 2 receptor, by Der p 1, a major mite allergen with cysteine protease activity. *J Exp Med*. 1998;187(2):271-5.

Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Sun LK, Sun WN, Chang TW, Hamelmann E, Gelfand EW. Antigen-specific Immunoglobulin-A Prevents Increased Airway Responsiveness and Lung Eosinophilia after Airway Challenge in Sensitized Mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158: 519-25.

Seenger 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*. 1998;28: 2124-30.

Sennhauser FH, Balloch R, McDonald RA, Shelton MJ, Robertson DM. Maternofetal Transfer of IgG Anti-Escherichia coli Antibodies with Enhanced Avidity and Opsonic Activity in Very Premature Neonates. *Pediatr Res*. 1990;27(4):365-71.

Serravallo K, Medeiros M. House dust mites in the city of Salvador-BA. *Rev. bras. alerg. imunopatol*. 1999; 22(1):19-24.

Smillie FI, Elderfield AJ, Patel F, Cain G, Tavenier G, Brutsche M, Craven M, Custovic A, Woodcock A. Lymphoproliferative responses in cord blood and at one year: no evidence for the effect of in utero exposure to dust mite allergens. *Clin Exp Allergy*. 2001;31(8):1194-204.

Simister EM, Story MG. Human placental Fc receptor and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J Reprod Immunol*. 1997;37:1-23.

Simister NE. Placental transport of Immunoglobulin G. *Vaccine*. 2003;21:3365-9.

Solé D, Camelo-Nunes IC, Wandalsen GF, Rosário Filho NA, Naspitz CK. Prevalence of rhinitis among Brazilian schoolchildren: ISAAC phase 3 results. *Rhinology*. 2007;5(2):122-8.

Soliman MY, Rosenstreich DL. Natural immunity to dust mites in adults with chronic asthma. I. Mite-specific serum IgG and IgE. *Am Rev Respir Dis*. 1986;134(5):962-8.

Spieksma FT, Dieges PH. The history of the finding of the house dust mite. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;(3):573-6.

Stanworth DR. The discovery of IgE. *Allergy*. 1993;48,67-71.

Stein KE, Söderström T. Neonatal administration of idiotypic or anti-idiotypic primes for protection against E.coli K13 infection in mice. *J Exp Med*. 1984;160:1001-11.

Steward MS, Lew AM. The importance of Antibody Affinity in the Performance of Immunoassays for Antibody. *J Immunol Methods*. 1985;78(2):173-90.

Stewart GA, Dowse GK, Turner KJ, Alpers MP. Isotype specific immunoglobulin responses to the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* and the purified allergen Der p 1 in asthmatic and control subjects from the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Clin Allergy*. 1988;18(3): 235-43.

Strober W, Fuss IJ. O sistema imunológico das mucosas. In: Sittes DP, Terr AL, Parslow TG, editors. *Imunologia Médica*. São Paulo: Guanabara Koogan; 2000. p. 157-62.

Szépfolusi Z, Loibichler C, Hänel-Dekan S, Dehlink E, Gerstmayr M, Pichler J, Eiwegger T, Horvat R, Urbanek R. Most of diaplacentally transferred allergen is retained in the placenta. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(9):1130-7.

Tanizaki Y, Okazaki M, Mifune T, Mitsunobu F, Ochi K, Harada H. Cellular composition of fluid in the airways of patients with house dust mite sensitive asthma, classified by clinical symptoms. *Inter Méd*. 1992;31:333-8.

Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills K, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129: 1-18.

Thomas AE, Platts-Mills, Erwin EA, Allison AB, Blumenthal K, Barr M, et al. The relevance of maternal immune responses to inhalant allergens to maternal symptoms, passive transfer to the infant, and development of antibodies in the first 2 years of life. *J allergy Clin Immunol*. 2003;30: 111-23.

Thorton CA, Vance SHG. The placenta: a portal of fetal allergen exposure. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:1537-9.

Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature*. 1981;289,592-3.

Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J. Clin. Invest*. 2003;111,1065–72.

Uthoff H, Spenner A, Reckelkamm W, Ahrens B, Wölk G, Hackler R, Hardung F, et al. Critical Role of Preconceptional Immunization for Protective and Nonpathological Specific Immunity in Murine Neonates. *J Immunol*. 2003; 171: 3485–92.

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. *Nature Med*. 2008; 14(2):170-5.

Van de Perre P. Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*. 2003;21: 3374-6

Vance GH, Holloway JA. Early life exposure to dietary and inhalant allergens. *Pediatr. Allergy Immunol*. 2002;13 (Suppl. 15): 14-8.

Victor JR, Fusaro AE, Duare AJS, Sato MN. Preconception maternal immunization to dust mite inhibits the type I hypersensitivity response of offspring. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;11:269-77.

Walker TS. Development of the Intestinal Mucosal Barrier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002;34(1):33-9.

Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert CD, Thompson PJ, et al. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin Invest*. 1999;104:123–33.

Weaver LT, Wadd N, Taylor CE, Greenwell J, Toms GL. The ontogeny of serum IgA in the newborn. *Pediatr Allergy Immunol* 1991;2:72–5.

Weiss KB, Sullivan SD, Kevin B. Socio-economic burden of asthma, allergy, and other atopic illnesses. *Pediatric Allergy and Immunology*. 1994;5:7–12.

Wigzell H. Regulation of immunity by anti-idiotypic antibodies. *Vet Immunol Immunopathol*. 1987;17:161-72.

Willoughby JB, Willoughby WF. In vivo responses to inhaled proteins I. Quantitative analysis of antigen uptake, fate, and immunogenicity in a rabbit model system. *J Immunol*. 1977;119 (6): 2137-46.

Anexo A – Nível e índice de avides dos anticorpos, totais e específicos, determinados nas 74 amostras selecionadas.

Mãe	Idade	IgE anti-Der p (mãe)		IgE total (UI/ml)		IgG Total (mg/dl)		IgG- anti Der p (UA/ml)		S-IgA de colostro		Índice de Avides (molaridade de KSCN)		
		RAST (escala)	RAST (KU/L)	Mãe	RN	Mãe	RN	Mãe	RN	total (mg/l)	anti-Der p (UA/ml)	IgG mãe	IgG RN	S-IgA
1	28	5	52,4	804,4	<1	860	1050	1266	989	28,2	305	1,927	1,822	2,593
2	23	5	92,4	3910	8,31	1280	1730	220	292	35,5	484	2,907	2,781	2,848
3	40	4	25	237,7	<1	725	1150	3321	3704	19,9	621	2,446	2,142	3,219
4	30	3	11,5	51,4	<1	698	1500	130	220	6	163	2,877	2,517	2,515
5	16	4	20,7	1487,3	<1	1050	1140	247	250	264,5	2289	2,422	2,371	3,053
6	26	5	99,5	422,9	<1	809	1390	1000	1188	18,4	1098	2,318	2,104	1,766
7	24	3	12,2	296,1	<1	776	1220	2620	3498	2,8	66	1,123	1,136	3,085
8	32	4	46,3	264	<1	887	1130	1839	1686	30,8	299	3,547	3,068	0,825
9	29	3	3,64	78,8	<1	1540	1540	2999	2791	78	483	2,298	2,314	1,96
10	20	3	3,78	243,7	1,39	903	1170	215	234	46,9	818	2,796	2,572	2,627
11	30	5	71,2	998,8	1,03	891	871	368	271	12	222	2,655	2,668	2,832
12	22	3	16,2	194,5	<1	884	1300	800	1457	9,3	181	1,538	1,324	2,274
13	39	3	9,4	25,1	<1	1040	983	1503	1121	24	1841	3,180	3,316	2,483
14	29	0	< 0,35	80,7	<1	860	1030	78	67	21	173	2,298	2,314	2,944
15	34	0	< 0,35	74,6	<1	746	896	487	414	33,7	600	2,137	1,449	2,948
16	18	0	< 0,35	16,7	<1	982	1170	692	435	88	3161	2,204	2,365	2,025
17	19	0	< 0,35	63,1	<1	923	1070	1451	1204	3,7	179	2,218	2,117	2,307
18	34	0	< 0,35	13	<1	754	1190	224	226	9,5	258	1,790	1,842	2,321
19	21	0	< 0,35	41,5	<1	797	1070	150	150	10	46	3,128	3,055	3,593
20	17	0	< 0,35	12,2	<1	684	1020	234	331	11	370	3,115	2,856	2,594
21	29	0	< 0,35	9,8	<1	736	1270	645	733	16	209	2,513	2,040	2,393
22	30	0	< 0,35	1,5	<1	489	920	752	973	185	2761	3,759	2,910	2,352
23	17	0	< 0,35	7,8	<1	384	1450	1090	1193	3,3	119	2,300	2,093	3,107
24	23	0	< 0,35	11,4	<1	1140	1390	111	84	5,6	254	1,879	1,673	1,753
25	28	0	< 0,35	36,6	<1	1150	1050	1698	1776	49,7	2969	3,042	3,454	1,903
26	20	0	< 0,35	46,4	<1	912	1100	525	508	na	na	2,012	1,545	na
27	31	0	< 0,35	24	<1	846	1060	1397	1094	69,8	1992	2,340	2,394	1,558
28	17	0	< 0,35	85,1	<1	797	876	69	91	67	429	1,525	1,401	1,859

Mãe	Idade	IgE anti-Der p (mãe)		IgE total (UI/ml)		IgG Total (mg/dl)		IgG- anti Der p (UA/ml)		S-IgA de colostro		Índice de Aidez (molaridade de KSCN)		
		RAST (escala)	RAST (KU/L)	Mãe	RN	Mãe	RN	Mãe	RN	total (mg/l)	anti-Der p (UA/ml)	IgG mãe	IgG RN	S-IgA
29	21	0	< 0,35	5	<1	831	855	1849	1535	4,5	21,5	1,350	1,032	2,449
30	23	0	< 0,35	1,5	<1	1040	665	2078	1893	14,4	224	2,009	1,742	2,765
31	15	0	< 0,35	129,5	<1	991	911	262	167	11	248	2,255	1,721	2,982
32	33	0	< 0,35	27,8	<1	896	1110	390	347	21,9	309	2,547	3,923	2,676
33	28	0	< 0,35	4,8	<1	822	1330	779	1205	na	na	1,687	1,716	na
34	29	0	< 0,35	5	<1	710	939	575	419	62	843	3,104	3,000	1,746
35	23	0	< 0,35	12,4	<1	837	1010	756	548	11,8	1310	1,990	2,139	2,141
36	23	0	< 0,35	1,5	<1	778	986	199	203	na	na	1,145	1,128	na
37	37	0	< 0,35	8	<1	808	917	1561	1071	12,4	446	2,221	2,178	2,667
38	20	0	< 0,35	13,8	<1	1050	984	217	137	3	38	3,067	2,788	3,05
39	37	0	< 0,35	48,5	<1	813	974	519	654	34	1105	3,944	3,991	2,479
40	21	0	< 0,35	2249,5	na	894	1400	333	360	48,5	1160	3,122	3,078	3,032
41	19	0	< 0,35	254,8	na	783	1220	524	605	50,9	1904	2,637	2,385	2,67
42	25	0	< 0,35	452,4	na	969	1420	340	306	70,7	2668	2,531	2,513	3,981
43	25	0	< 0,35	317,9	na	667	1320	310	475	39	663	1,516	1,504	2,413
44	27	0	< 0,35	165,4	na	619	1430	196	359	7,2	123	1,775	1,614	2,357
45	19	0	< 0,35	219,9	na	653	1220	169	219	120,1	1272	1,924	1,55	2,468
46	24	0	< 0,35	229,6	na	621	1310	851	1148	20,6	1926	1,896	1,679	2,783
47	17	0	< 0,35	132,9	na	857	1390	1901	1980	5,2	266	2,829	2,871	2,028
48	28	0	< 0,35	1554,8	na	974	1280	196	185	13,2	594	1,953	1,958	2,052
49	25	0	< 0,35	387,2	na	676	1010	268	309	8,3	552	2,042	1,958	2,978
50	35	0	< 0,35	266,5	na	749	1060	241	203	13,3	305	2,146	2,054	3,114
51	22	0	< 0,35	243,9	na	671	1370	314	464	7,7	135	2,534	2,602	1,867
52	31	0	< 0,35	256,3	na	1010	1620	678	664	14,6	1114	2,945	2,200	1,585
53	22	0	< 0,35	160,3	na	867	1500	252	258	5	204	1,619	1,664	3,38
54	35	0	< 0,35	478,7	na	661	1170	397	487	5,4	233	1,466	1,314	3,089
55	18	0	< 0,35	199,1	na	1090	1190	1162	876	7,5	575	2,803	3,125	2,178
56	30	0	< 0,35	669	na	809	1440	1711	2183	17,3	474	2,429	2,340	3,565
57	23	0	< 0,35	168,3	na	845	1040	134	113	0,6	46	4,159	3,977	3,632
58	35	0	< 0,35	527,7	na	1040	1500	1311	1408	39	1065	1,278	1,354	3,805

Mãe	Idade	IgE anti-Der p (mãe)		IgE total (UI/ml)		IgG Total (mg/dl)		IgG- anti Der p (UA/ml)		S-IgA de colostro		Índice de Aidez (molaridade de KSCN)		
		RAST (escala)	RAST (KU/L)	Mãe	RN	Mãe	RN	Mãe	RN	total (mg/l)	anti-Der p (UA/ml)	IgG mãe	IgG RN	S-IgA
59	25	2	0,71	16	na	907	1150	387	409	34,8	366	1,732	1,749	2,548
60	20	2	0,72	21,1	na	605	1310	368	495	57,7	3284	1,944	1,838	2,29
61	29	2	0,78	227,7	na	853	1120	1365	1025	147,6	5666	2,191	1,972	1,878
62	22	2	2,35	1349,4	na	1020	1790	375	461	12,8	920	1,839	1,969	3,266
63	29	2	1,43	234	na	754	1120	179	1090	127,4	749	1,993	2,977	3,339
64	17	2	1,58	1870,6	na	700	1130	208	309	35,4	1279	2,218	1,932	4,651
65	31	0	< 0,35	127,6	na	914	1380	304	265	10,3	122	2,051	1,759	3,957
66	34	0	< 0,35	34,9	na	983	1300	456	325	44,9	1229	2,084	2,071	3,847
67	33	0	< 0,35	62	na	914	1160	595	555	6,25	88	1,923	2,197	2,532
68	21	0	< 0,35	15	na	890	1260	1038	958	4,2	112	1,966	1,883	2,698
69	38	0	< 0,35	2,2	na	820	1100	504	628	21,3	3496	1,632	1,663	3,403
70	22	0	< 0,35	51,8	na	848	1120	432	301	39	1378	2,605	2,386	2,067
71	35	0	< 0,35	25,8	na	664	1090	239	264	28,7	743	2,542	3,019	2,734
72	31	0	< 0,35	1,5	na	778	1180	1707	1668	110,5	9925	2,525	2,161	1,96
73	34	0	< 0,35	29,1	na	724	870	3623	3923	123	3450	0,745	1,32	3,098
74	38	0	< 0,35	25,2	na	1000	1160	6968	6456	5,2	503	1,089	1,217	2,83

(RN) = soro de cordão umbilical; (mãe) = soro de sangue periférico; (na): não avaliada

amostras de 1-13 = grupo estudo

amostras de 14-39 = grupo controle

Anexo B: Dados da gestação, do parto, do recém nascido e histórico alérgico da família (mãe, pai e irmão (s))

		Alergia dos pais		Dados do irmão (se houver)			Alergia na gestação	Dados do recém-nascido					
mãe	Gesta	Mãe	Pai	Alergia	Gestação	Sexo	Trimestre	Idade gestacional	Tipo de parto	Apgar (1-5min)	Sexo	Peso (kg)	Comprimento (cm)
1	II gesta (2p)	rinite	rinite	não			1º, 2º e 3º	termo	N	9.10	F	3,08	48
2	I gesta (1p)	rinite	não					termo	C	9.10	M	3,66	51
3	II gesta (2p)	rinite	não	não				termo	C	9.10	F	3,24	47,3
4	I gesta (1p)	rinite e dermatite	rinite					termo	C	6.10	F	3,76	50,5
5	I gesta (1p)	não	não				3º	termo	N	10.10	F	3,00	47,8
6	III gesta (3p)	rinite	não	não				termo	C	10.10	M	3,15	47,7
7	I gesta (1p)	rinite	rinite					termo	C	9.10	M	2,32	45
8	I gesta (1p)	rinite	rinite					termo	C	9.10	F	3,51	50
9	II gesta (2p)	rinite	rinite	não			3º	termo	C	9.10	M	3,24	49
10	I gesta (1p)	não	não					termo	C	10.10	M	3,58	50,5
11	III gesta (3p)	rinite	dermatite	rinite e dermatite	1ª e 2ª	F e F		termo	C	9.10	F	2,75	47
12	I gesta (1p)	não	não					termo	N	9.10	F	2,93	47,5
13	I gesta (1p)	rinite	não				1º	termo	C	9.10	M	4,22	51,5
14	I gesta (1p)	não	não					termo	N	8.10	F	2,9	49,5
15	III gesta (3p)	não	não	rinite	1ª	F		termo	C	8.10	M	3,48	50,5
16	I gesta (1p)	não	não					termo	C	9.10	M	3,88	50,5
17	II gesta (2p)	não	não	não			1ª e 2ª	termo	C	9.10	F	2,6	46
18	VI gesta (3p)	não	não	asma e rinite	1ª e 2ª	M e M		termo	C	8.10	F	4,32	52,5
19	I gesta (1p)	não	rinite					termo	C	8.9	M	3,56	51
20	I gesta (1p)	não	não					termo	C	9.10	M	3,42	52,8
21	I gesta (1p)	não	não					termo	C	8.9	F	4,17	51,5
22	I gesta (1p)	não	rinite e alimentar					termo	C	10.10	F	3,47	50,5

		Alergia dos pais		Dados do irmão (se houver)			Alergia na gestação	Dados do recém-nascido						
Mãe	Gesta	Mãe	Pai	Alergia	Gestação	Sexo	Trimestre	Idade gestacional	Tipo de parto	Apgar (1-5min)	Sexo	Peso (kg)	Comprimento (cm)	
23	II gesta (1p)	não	não	não	1ª	M		termo	C	9.10	F	3,56	50,5	
24	IV gesta (4p)	não	não	asma				termo	C	9.10	M	3,90	50,5	
25	I gesta (1p)	não	não					termo	C	9.10	F	4,56	51,0	
26	II gesrta (1p)	não	não	não				termo	N	9.10	F	2,77	46,5	
27	III gesta (3p)	não	não	não				termo	C	9.10	F	3,70	50,3	
28	II gesta (2p)	não	não					termo	N	9.10	F	3,48	49,0	
29	I gesta (1p)	não	não					termo	C	n.i	M	n.i	n.i	
30	I gesta (1p)	não	não		2ª	F		termo	C	9.10	F	3,38	48,5	
31	I gesta (1p)	não	n.i					termo	N	10.10	F	2,62	44,5	
32	IV gesta (4p)	não	não	rinite				termo	C	9.10	M	3,49	47,0	
33	I gesta (1p)	não	não					termo	C	9.10	M	2,89	47,0	
34	I gesta (1p)	não	n.i	não				termo	C	9.10	F	3,25	49,0	
35	III gesta (3p)	não	não	não				termo	N	9.10	M	3,7	51,5	
36	II gesta (2p)	não	não	não				termo	C	9.10	M	3,37	49,0	
37	III gesta (3p)	não	rinite	rinite	1ª	M		termo	C	3.10	F	2,51	46,0	
38	II gesta (2p)	não	não	não				termo	N	n.i	M	3,4	n.i	
39	VI gesta (6p)	não	não	não				termo	N	9.10	M	3,19	47,5	
40	II gesta (2p)	não	não	não				termo	N	9.10	F	2,58	445	
41	II gesta (2p)	não	não	não				termo	N	8.10	F	3,19	50,5	
42	II gesta (2p)	rinite	n.i	não				termo	N	8.10	F	2,97	41,1	
43	II gesta (2p)	não	não	não				termo	C	9.10	M	3,11	49,4	
44	IV gesta (4p)	não	não	não	1º	M	3º	termo	C	9.10	F	2,98	47,5	
45	I gesta (1p)	outros	não					termo	N	8.10	M	3,2	50,0	
46	I gesta (1p)	dermatite	não					termo	C	5.8	F	3,7	49,0	
47	I gesta (1p)	rinite	n.i					termo	N	8.9	M	2,8	46,0	
48	IV gesta (4p)	não	n.i	dertatite				1ª		C	9.10	M	2,9	47,0
49	VI gesta (4p)	não	não	não					termo	C	9.10	M	4,05	51,0
50	II gesta (2p)	não	não	não				1ª	F	termo	C	9.10	M	3,68
51	III gesta (3p)	não	não	rinite	termo	C				8.10	M	3,21	48,0	

		Alergia dos pais		Dados do irmão (se houver)			Alergia na gestação	Dados do recém-nascido					
Mãe	Gesta	Mãe	Pai	Alergia	Gestação	Sexo	Trimestre	Idade gestacional	Tipo de parto	Apgar (1-5min)	Sexo	Peso (kg)	Comprimento (cm)
52	III gesta (2p)	rinite	n.i	não	2 ^a	M	2º	termo	N	9.10	M	3,31	50
53	IV gesta (4p)	não	não	asma				termo	N	n.i	M	2,57	45,5
54	IV gesta (4p)	não	não	não				termo	C	9.10	F	3,06	49,0
55	I gesta (1p)	não	não					termo	N	8.10	M	3,80	51,5
56	II gesta (2p)	rinite e asma	rinite	não	1 ^a	M	1º, 2º e 3º	termo	N	9.10	F	2,49	46,0
57	I gesta (1p)	rinite	rinite					termo	C	8.10	F	3,34	48,0
58	VII gesta (7p)	não	não					termo	N	10.10	M	2,44	44,5
59	III gesta (3p)	rinite	rinite	rinite				termo	C	9.10	F	2,84	49,0
60	I gesta (1p)	rinite	não		1 ^a	M	1º	termo	C	9.10	F	4,36	52,0
61	II gesta (2p)	dermatite	rinite	rinite				termo	C	9.10	F	4,19	51,5
62	IV gesta (4p)	não	não					termo	N	n.i	F	n.i	n.i
63	IV gesta (4p)	não	não					termo	N	9,1	M	3,57	49,7
64	I gesta (1p)	não	n.i		1 ^a	F	1º, 2º e 3º	termo	C	9.10	M	3,12	48,0
65	II gesta (2p)	rinite	não	alimentar				termo	N	8.10	M	3,60	48,7
66	III gesta (2p)	dermatite	não					termo	C	9.10	M	3,20	49,5
67	III gesta (3p)	rinite	não	asma				termo	N	9.10	F	3,74	53,0
68	I gesta (1p)	rinite	não		1 ^a	M	1º e 3º	termo	N	9.10	F	4,50	52,0
69	II gesta (2p)	rinite	não	outros				termo	C	9.10	M	3,50	50,0
70	II gesta (2p)	asma	asma	asma				termo	C	9.10	F	3,27	49,5
71	I gesta (1p)	rinite e asma	não					termo	C	10.10	F	3,50	n.i
72	I gesta (1p)	rinite	não		2 ^a	M	1º, 2º e 3º	termo	N	9.10	M	3,25	48,3
73	II gesta (2p)	não	não					termo	C	9.10	M	3,10	49,5
74	III gesta (4p)	não	não	rinite				termo	C	9.10	F	3,63	49,5

Dados obtidos através de questionário respondido pela própria voluntária 48hrs após o parto. (n.i) = não informado

Gesta: número de gestações; p= número de parto.

Anexo C: Dados do quarto que a mãe dormiu durante a gestação, região da moradia e classe social.

Mãe	Piso	Cortina	Travesseiro	Colchão	Idade colchão	Ambiente	Região	Classe Social
1	frio	ausente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	C
2	tapete	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	nc
3	frio	ausente	com capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	A2
4	frio	ausente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
5	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	D
6	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado sem sol	urbana	nc
7	frio	ausente	sem capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	D
8	frio	ausente	com capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	B2
9	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	C
10	frio	ausente	sem capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	B2
11	frio	presente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	B2
12	frio	ausente	sem capa*	com capa*	< 1 ano	arejado com sol	urbana	B2
13	frio	ausente	com capa*	com capa*	< 1 ano	arejado com sol	urbana	B1
14	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
15	frio	ausente	com capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	B1
16	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
17	frio	presente	com capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	nc
18	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	úmido	urbana	nc
19	frio	presente	com capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	C
20	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
21	frio	presente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
22	frio	presente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado sem sol	urbana	nc
23	frio	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	rural	B2
24	frio	ausente	com capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	D
25	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	A2
26	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	nc
27	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	nc
28	frio	ausente	sem capa*	com capa*	> 5 anos	arejado sem sol	urbana	nc
29	frio	ausente	com capa*	com capa*	< 1 ano	arejado sem sol	urbana	B2
30	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	C
31	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	úmido	urbana	D

	Piso	Cortina	Travesseiro	Colchão	Idade colchão	Ambiente	Região	Classe Social
32	frio	ausente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	D
33	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	C
34	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	B2
35	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	D
36	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	C
37	frio	ausente	sem capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	A2
38	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	úmido	urbana	D
39	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	C
40	frio	presente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
41	tapete	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	úmido	urbana	nc
42	carpete	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	úmido	rural	D
43	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	nc
44	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
45	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
46	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano		urbana	nc
47	frio	presente	sem capa*	com capa*	< 1 ano	arejado sem sol	urbana	D
48	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	úmido	urbana	D
49	frio	ausente	sem capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	D
50	frio	ausente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
51	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	nc
52	frio	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
53	tapete	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
54	frio	ausente	sem capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	C
55	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
56	frio	presente	com capa*	com capa*			rural	C
57	frio	presente	sem capa*	com capa*	1-4 anos	arejado com sol	urbana	C
58	frio	presente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	C
59	frio	ausente	com capa*	com capa*	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
60	frio	presente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	nc
61	frio	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	B2
62	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado sem sol	urbana	D
63	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	C
64	frio	presente	sem capa*	espuma	1-4 anos	úmido	urbana	D

Mãe	Piso	Cortina	Travesseiro	Colchão	Idade colchão	Ambiente	Região	Classe Social
65	frio	ausente	sem capa*	espuma	< 1 ano	arejado com sol	urbana	
66	frio	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
67	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	D
68	frio	presente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	nc
69	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	A2
70	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	C
71	frio	ausente	sem capa*	espuma	> 5 anos	arejado com sol	urbana	B1
72	frio	ausente	sem capa*	espuma	1-4 anos	arejado com sol	urbana	A2
73	frio	presente	com capa*	com capa*	< 1 ano	arejado sem sol	urbana	C
74	frio	ausente	com capa*	espuma	1-4 anos	arejado sem sol	urbana	

Dados obtidos através de questionário respondido pela própria voluntária 48hrs após o parto. (nc): não consta. Classe social determinada por renda média familiar: classe A = R\$ 6.620,00; classe B= R\$ 2.236,00; classe C= R\$ 927,00; classe D= R\$ 424,00 e classe E= R\$207,00. www.abep.org/codigosguias/Criterio_Brasil_2008

Anexo D: Questionário aplicado**I- Identificação da mãe**

Leito _____ identificação

☐

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos

Telefone: () _____

II- Gestações anteriores:

Número de gestações: _____

Número de ordem da criança: _____

III- Quadro alérgico da mãe:Já fez diagnóstico médico ou apresentou algum tipo de alergia?☐ Sim ☐ nãoQual?☐ Respiratória ☐ Alimentar ☐ Ocular☐ Dermatite atópica ☐ Medicamentosa;☐ OutrosSe for respiratória, especificar:☐ Asma

- Tosse principalmente na metade da noite e de manhã?

- Sente aperto no peito (“peito preso”)?

- Tem falta de ar (respiração incompleta)?

- Apresenta chiado no peito?

☐ Rinite alérgica

- Tem vários espirros em sucessão, especialmente pela manhã?

- Seu nariz escorre e fica obstruído?

- Ocorrem irritação e coceira no nariz, nos olhos e no céu da boca?

- Seu olfato fica prejudicado?

- Tem dores de cabeça juntamente com outros sintomas destes já mencionados?

Houve ocorrência de processo alérgico durante a gestação?☐ Sim ☐ NãoQual trimestre?☐ 1° ☐ 2° ☐ 3°Se a resposta for positiva, identificar:☐ Respiratória ☐ Alimentar ☐ Ocular☐ Dermatite atópica ☐ Medicamentosa;☐ OutrosSe for respiratória, especificar:☐ Asma ☐ Rinite alérgica**IV: Dados do recém nascido**Parto: ☐ cesárea ☐ normal ☐ fórcepsTempo gest.: ☐ termo ☐ pré-termo ☐ pós-termoPeso: _____ Comprimento: _____ Apgar 1-5: _____Ficou na UTI? ☐ Sim ☐ NãoSexo: ☐ Feminino ☐ Masculino**V- Quadro alérgico da família:**O pai da criança Já fez diagnóstico médico ou apresentou algum tipo de alergia?☐ Sim ☐ Não ☐ Não sabeSe a resposta for positiva, identificar:☐ Respiratória ☐ Alimentar ☐ Ocular☐ Dermatite atópica ☐ Medicamentosa;☐ OutrosSe for respiratória, especificar:☐ Asma ☐ Rinite alérgicaAlgun irmão da criança Já fez diagnóstico médico ou apresentou algum tipo de alergia?☐ sim ☐ não ☐ não sabeQual gestação e sexo?☐ 1ª gestação ☐ 2ª gestação ☐ 3ª gestação☐ 4ª gestaçãoSe a resposta for positiva, identificar:☐ Respiratória ☐ Alimentar ☐ Ocular☐ Dermatite atópica ☐ Medicamentosa;☐ OutrosSe for respiratória, especificar:☐ Asma ☐ Rinite alérgica**VI- Características do quarto:**Tipo de piso☐ Carpete ☐ Piso frio ☐ TapetesCortinas☐ não tem ☐ lava uma vez a cada 2 meses☐ demora mais de 2 meses para lavarTipo de travesseiro☐ espuma ☐ com capa adequada ☐ não sabeTipo de colchão:☐ Espuma ou mola ☐ Com capa adequadaIdade do Colchão:☐ menos de 1 ano ☐ 1 a 4 anos ☐ mais de 5 anosAmbiente☐ arejado com sol ☐ arejado sem sol ☐ úmidoRegião em que mora ☐ área rural ☐ área urbana

VII- Condição Sócio EconômicaGrau de instrução:

- ☐ ignorada ☐ analfabeta
☐ ensino fundamental: _____ ano
☐ ensino médio : _____ ano
☐ ensino superior: ☐ incompleto ☐ completo Curso _____

Convênio médico: ☐ sim ☐ não ☐ particular

Meio de transporte:

- ☐ ônibus ☐ carro próprio ☐ outro

Rendimento familiar:

Renda mensal _____ reais
 Nº moradores _____ Menores 12 anos: _____

VIII- Classificação por bens:

Posse de bens	0	1	2	3	4 ou mais
TV a cores					
Rádio					
Banheiro					
Automóvel					
Empregada					
Aspirador					
Máquina de lavar					
Videocassete					
Geladeira					
Freezer					

Moradia:

- ☐ própria
☐ alugada _____ reais
☐ financiada _____ reais
☐ agregada
☐ cedida

Tipo de casa:

- ☐ alvenaria ☐ madeira ☐ barraco (papelão,tábua...) ☐ outros

Número de cômodos:

- ☐ total
☐ quarto ☐ sala ☐ cozinha ☐ sanitário

Infra-estrutura básica:

- ☐ Esgoto ☐ água encanada ☐ energia elétrica ☐ coleta de lixo ☐ asfalto

Anexo E: Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos. Responsável: Patrícia Macchiaverni

O abaixo-assinado (nome completo) _____,
RG nº _____, nascido em (data) ____/____/____, (cidade) _____
(estado) _____, residente na Rua _____, nº _____,
Cidade _____, Estado _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do médico Dr Antônio Condino Neto, do Departamento de Imunologia do instituto de ciências biomédicas - USP. O abaixo-assinado está ciente que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

Este projeto visa o estudo relação materno-fetal e resposta anticórpica ao *Dermatophagoides pteronyssinus* considerando mães atópicas e mães normais. Serão quantificados os anticorpos da classe IgG no sangue de cordão, IgA no colostro e IgG e IgE no sangue periférico de mães atópicas sensibilizadas ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* e em mães normais. Além disso, serão analisados os padrões de reatividade dos anticorpos da classe IgG e IgA ao antígeno Der p 1. Serão colhidos aproximadamente 5ml de colostro por ordenha manual e 10ml de sangue por pulsão venosa, além de 10ml do sangue presente no cordão umbilical, colhido logo após o nascimento.

A participação neste estudo, não tem objetivo de submetê-lo a um tratamento terapêutico. Conseqüentemente, não se espera que a participação no estudo traga qualquer benefício em função do mesmo. Esse estudo não remunerará os voluntários.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador ou a um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento médico nesta instituição. Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo e não identificará o voluntário por ocasião da publicação dos resultados obtidos. Caso surja alguma intercorrência, poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética da USP apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Se você concorda com o exposto acima, leia e assine o documento abaixo:

Eu declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após, tive nova oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo o também sobre o Estudo e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmo estar livre e espontaneamente decidindo participar do Estudo. Ao assinar este Termo de Consentimento eu também estou certificando que toda a informação que eu prestei, incluindo minha história médica, é verdadeira e correta até onde é de meu conhecimento, e declaro estar recebendo uma cópia assinada deste documento. Ao assinar este Termo de Consentimento estou autorizando o acesso às minhas informações, conforme explicitado anteriormente.

Data: ____/____/200____.

Voluntária ou responsável legal (se menor de 21 anos)

Testemunha